Archi f SID

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد ششم، شماره دوم، ۱۳۹۷
http://ejrr.gau.ac.ir

اثر روش‌های مختلف یخ گشایی بر فراسنجه‌های اسپرم منجمد قوچ قزل

صدیقه وطن خواه[۱]، *حسین دقیق کیا[۲]، غلامعلی مقدم[۲] و مرضیه ابراهیمی[۳]

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد، [۲]استاد و [۳]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۱۸

چکیده

سابقه و هدف: امروزه عمل تلقیح مصنوعی از جایگاه ویژه‌ای در بهبود راندمان تولید، اصلاح و بهبود پیشرفت ژنتیکی برخوردار است. به منظور تحقق بخشیدن به بسیاری از مزایای بالقوه تلقیح مصنوعی، ذخیره‌سازی منی برای بلند مدت یک امر ضروری محسوب می‌شود. این امر توسط فرایند انجماد محقق می‌شود. مراحل انجماد از جمله فرایند یخ‌گشایی منجر به تغییرات مورفولوژیکی، آسیب به عملکردهای طبیعی اسپرم و در نهایت کاهش باروری می‌شود. بنابراین، بهبود روش یخ‌گشایی منی قوچ با شاخص‌های کیفی اسپرم ارتباط داشته و از اهمیت قابل‌توجهی برخورداراست. هدف از این مطالعه مقایسه اثرات دو روش یخ‌گشایی بر فراسنجه‌های میکروسکوپی، فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل منی قوچ پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، نمونه‌های منی از پنج رأس قوچ قزل (سن ۳ تا ٤ سال)، در فصل تولیدمثلی و با استفاده از مهبل مصنوعی، دو بار در هفته جمع‌آوری شدند. برای از بین بردن اثرات فردی دام‌های نر، نمونه‌های منی در هر بار اسپرم‌گیری با هم مخلوط شده و سپس مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌ها با رقیق‌کننده تریس حاوی ۱/۵ درصد لستین سویا و ۷ درصد گلیسرول رقیق شدند. نمونه‌های رقیق‌شده در پایوت ۰/۲۵ میلی‌لیتر پر و در معرض بخار ازت منجمد و تا زمان ارزیابی در تانک حاوی ازت مایع ذخیره شدند. پایوت‌های حاوی منی در حمام آب گرم توسط دو پروتکل: ۳۷°C به مدت ۳۰ ثانیه و ٦۰°C به‌مدت ٦ ثانیه یخ‌گشایی شدند. به دنبال فرایند انجماد- یخ‌گشایی، اثرات زمان و دمای یخ‌گشایی بر ویژگی‌های تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء پلاسمایی، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی، غلظت مالون‌دی‌آلدهید، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی **گلوتاتیون** پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان منی ارزیابی شدند. آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی انجام شد و مدل آماری شامل اثر دما و زمان یخ‌گشایی در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط برنامه آماری SAS و به کمک رویه GLM انجام شد و اختلاف میانگین‌ها به روش توکی مورد مقایسه قرار گرفتند. اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد گزارش شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که فراسنجه‌های حرکتی اسپرم از جمله درصد تحرک پیش‌رونده، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی در دمای ۳۷°C به ٦۰°C اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی از نظر عددی تغییراتی در آنها مشاهده شد. همچنین درصد زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء پلاسمایی در ۳۷°C به مدت ۳۰ ثانیه به ٦۰°C به مدت ٦ ثانیه از نظر عددی تغییر مثبتی یافت اما این افزایش نیز غیرمعنی‌دار بود. همچنین میزان اسپرم‌های ناهنجار در روش یخ‌گشایی٦۰°C برای ٦ ثانیه به ۳۷°C برای ۳۰ ثانیه بهبود نیافت. علاوه بر این نتایج حاصل از مقایسه پراکسیداسیون لیپید، فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در دو پروتکل یخ‌گشایی معنی‌دار نبود.

*نویسنده مسئول: daghighkia@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده از روش‌های یخ‌گشایی، شاخص تحرک، بقاء و وضعیت اکسیداتیو در روش یخ گشایی ٦٠°C به مدت ٦ ثانیه بهبود نیافت و نتوانست جایگزین مناسبی برای روش یخ‌گشایی ٣٧°C به مدت ٣٠ ثانیه باشد.

واژه‌های کلیدی: ***سرعت*** یخ‌گشایی، فراسنجه‌های کیفی، منی منجمد، قوچ

مقدمه

تلقیح مصنوعی به طور قابل توجهی می‌تواند میزان پیشرفت ژنتیکی را افزایش دهد (٣٠). حفاظت و نگهداری طولانی مدت مایع منی به علت استفاده گسترده از تلقیح مصنوعی و تأثیر مسائلی مانند فاصله بین مکان‌های جمع‌آوری و تلقیح، انتقال بیماری‌ها و تلقیح تعداد زیادی ماده در مدت زمان کوتاه، موضوعی است که همواره مورد توجه قرار داشته است (٤٠). برای موفقیت تلقیح مصنوعی و کسب باروری مطلوب، داشتن تحرک و زنده‌مانی بالای اسپرماتوزوئید پس از یخ‌گشایی عامل مهمی به شمار می‌آید (٢٧، ١٢). انجماد و یخ گشایی منی، درصد اسپرم‌های متحرک را کاهش داده و باعث آسیب‌های ساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی می‌شود (٥١). بنابراین، نه تنها انجماد بلکه یخ گشایی هم ممکن است به سلول اسپرم آسیب برساند (٢٢). یخ‌گشایی باعث بازگشت سلول اسپرم به دمای فیزیولوژیکی می‌شود، لذا به منظور جلوگیری از هرگونه آسیب به سلول اسپرم یخ‌گشایی باید با دقت انجام شود (٩). نرخ یخ‌گشایی بطور قابل توجهی در زنده مانی اسپرم مؤثر بوده و به نظر می‌رسد این امر تحت تأثیر عوامل متعددی همچون نوع رقیق کننده، غلظت گلیسرول، روش بسته‌بندی و نرخ انجماد است (٤٧). در فرایند انجماد–یخ‌گشایی، فاز گرم شدن دقیقاً به‌اندازه فاز انجماد، برای زنده مانی اسپرم مهم می‌باشد (٣١). همچنین به منظور جلوگیری از تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی در اسپرم، یخ‌گشایی سریع ضروری است (٤٩). اسپرماتوزوا که تا دمای ١٩٦°C- زنده مانده‌اند، اکنون با چالش گرم شدن و یخ‌گشایی روبه‌رو بوده و در نتیجه باید با دو برابر سرعت انجماد از منطقه بحرانی دما (١٥°C- به ٦٠°C-) عبور کند (٢٩، ٤٩). هر دو نرخ سردسازی و یخ‌گشایی بر روی غشاء پلاسمایی اسپرم و در نتیجه زنده مانی موثر هستند (٧، ٣١). به نظر می‌رسد برای بهبود عملکرد اسپرم، یخ‌گشایی سریع ضروری است، زیرا احتمالا کریستال یخ داخل سلولی که در طی انجماد شکل گرفته، ممکن است در طی یخ‌گشایی آهسته رشد کند (١٣، ١٤). بسیاری از محققان از دمای ٤٢°C–٣٨ برای یخ‌گشایی منی منجمد قوچ استفاده کرده اند. برخی دیگر یخ‌گشایی در دمای بالای ٧٥°C–٦٠ را گزارش کردند که با توجه به تحرک، یکپارچگی آکروزوم و باروری اسپرماتوزوا پس از یخ گشایی، با دماهای ٤٢°C–٣٨ قابل مقایسه بود (٤٩). مشاهده شده است که با افزایش دما (٧٠°C–٣٧) میزان تحرک بهبود یافته است (٤٩). اندرسن و آمدال (١٩٧٢) گزارش کردند که یخ‌گشایی در ٧٥°C بهتر از ٣٥°C است (٤). با اینحال، در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که یخ‌گشایی در ٤٠°C–٣٦ یا ٧٠°C–٥٠، بر تحرک و یکپارچگی آکروزوم اسپرماتوزوا اثرگذار نمی‌باشد (٤٤). چندین مطالعه دیگر به منظور ارزیابی تأثیر دمای یخ‌گشایی بالا بر روی زنده‌مانی و تحرک اسپرم با استفاده از نرخ های یخ‌گشایی متفاوت روی گاو (٣٨، ٣٩ و ٤٥). بز، قوچ و سگ انجام شده است (٧، ١٦، ٤١ و ٤٢). پلاسمای منی و اسپرماتوزوئید به منظور حفاظت از آسیب گونه‌های اکسیژن فعال[2]، حاوی تعدادی آنتی اکسیدان اندوژنوس (گلوتاتیون

2. Reactive oxygen species (ROS)

www.SID.ir

Archive of SID

پراکسیداز[3]/ ردوکتاز[4]، سوپراکسیددسموتاز[5] و کاتالاز[6]) هستند که می توانند اثر سمی بالقوه گونه-های اکسیژن فعال را خنثی کنند. ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پایین در پلاسمای منی نقش کلیدی در ناباروری مرد دارد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل[7]، مجموعه‌ی آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی را شامل می‌شود. آنتی اکسیدان‌های پلاسمای منی به عنوان آنزیم جاروب کننده‌ی[8] گونه‌های اکسیژن فعال، قادر به تخریب آنیون سوپراکسید، هیدرژن پراکسید و پراکسیدهای لیپیدی هستند. همچنین سوپراکسید دیسموتاز مسئول حفظ تعادل بین تولید و تخریب گونه‌های واکنشی اکسیژن است (۵۱). تولید بدون کنترل گونه‌های اکسیژن فعال که بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی است منجر به استرس اکسیداتیو[9] می‌شود که برای اسپرماتوزوئید مضر است (۵۸). پتانسیل مهاری در غدد جنسی و مایع منی به طور معمول با سطوح کافی از آنتی‌اکسیدان‌های اندوژنوس حفظ می‌شود. این تعادل را می‌توان به عنوان وضعیت استرس اکسیداتیو اشاره کرد و ارزیابی آن ممکن است نقش مهمی در نظارت بر آسیب اسپرم و ناباروری داشته باشد (۵۲). یکی از عوامل مهم در انجماد – یخ‌گشایی منی از دست دادن آنزیم-های اندوژنوس است که باعث از دست دادن تحرک و کاهش متابولیسم می‌شود (۲). لذا، بهبود روش یخ-گشایی منی قوچ با شاخص های کیفی اسپرم ارتباط داشته و از اهمیت قابل‌توجهی برخوردار است.

بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، مقایسه دو روش یخ‌گشایی منی قوچ در پایوت‌های غوطه‌ور شده در آب گرم با دمای ۳۷°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۰°C به مدت ٦ ثانیه و تاثیرآن بر روی فراسنجه‌های اسپرم و وضعیت اکسیداتیو پس از یخ‌گشایی است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه شامل: تریس (با شماره کاتالوگ۳۸۲۱۰۸) و اسید سیتریک (با شماره کاتالوگ۲٤٤۱۰۰) از شرکت مرک[10] و فروکتوز (با شماره کاتالوگ F۲۵٤۳) از شرکت سیگما[11] تهیه شد.

حیوانات و جمع آوری اسپرم: نمونه های منی از ۵ رأس قوچ قزل بالغ (٤-۳ سال)، با ژنتیک برتر و ظرفیت باروری بالا گرفته شد. دامها تحت شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان (جیره با ۲۰٪ کنسانتره (۷۵٪ جو و ۲۵٪ ذرت) و ۸۰٪ یونجه) بوده همچنین به آب و نمک لیسیدنی دسترسی آزاد داشتند. نمونه-گیری هفته‌ای دو بار، در فصل تولیدمثلی و با استفاده از مهبل مصنوعی (٤۲°C) انجام شد. برای از بین بردن اثرات فردی دام های نر، مقادیر مساوی از نمونه های منی از هر ۵ رأس قوچ، در هر تکرار آزمایشی با هم مخلوط شده و سپس مورد استفاده قرار گرفتند. در هر انزال نمونه‌های با حجم بیش از ۰/۷۵ میلی‌لیتر، غلظت بیش ۳×۱۰^{۹} اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک پیش‌رونده بیش از ۸۰٪ و اسپرم غیرطبیعی کمتر از ۱۰٪ به عنوان اسپرم طبیعی در نظر گرفته شدند (۳۲).

رقیق سازی، انجماد و یخ‌گشایی منی: از یک رقیق‌کننده بر پایه تریس ۲۲۳/۷۱ میلی‌مولار، فروکتوز ۵۵/۵۰ میلی‌مولار، اسید سیتریک ۷۲/۸۷ میلی‌مولار (۳۲۰ میلی‌اسمول/کیلوگرم، اسیدیته ۷/۲)، عوامل محافظ انجمادی با میزان ۷٪ گلیسرول و ۱/۵٪ (وزن/حجم) لستین سویا استفاده شد. قبل از شروع کار محیط های انجمادی در بن ماری ۳۷°C قرار داده

3. Glutathione peroxidase (GPx)
4. Glutathione reductase
5. Superoxidase dismutase (SOD)
6. Catalase
7. Total antioxidant capacity (TAC)
8. Scavenger
9. Oxidative stress

10. Merck (Darmstadt, Germany)
11. Sigma (St. Louis, MO, USA)

www.SID.ir

Archive of SID

شد. سپس ١/٥٪ لستین سویا و ٧٪ گلیسرول به محیط رقیق‌کننده بر پایه تریس اضافه شده و رقیق‌سازی نمونه‌های منی به نسبت ١ به ٢٠ و در دمای ٣٧°C انجام گرفت. سپس فالکون‌های حاوی نمونه منی در ظرف محتوی ١٠٠ میلی‌لیتر آب ٣٧°C به منظور رسیدن به تعادل و سرد سازی تا ٤°C در یخچال به مدت ٢ ساعت قرار داده شد. بلافاصله پس از سرد نمودن نمونه‌ها در داخل پایوت‌های انجماد ٠/٢٥ میلی‌لیتر (با غلظت نهایی ٤×١٠^{٨} اسپرم در میلی‌لیتر) کشیده شد و در نهایت نمونه های منی سرد شده به فاصله ٤ سانتی‌متری بالای سطح ازت به مدت ٧ دقیقه قرار گرفته و سپس سریعاً پایوت‌ها به داخل ازت مایع ١٩٦°C- غوطه‌ور شدند (٣٧). به منظور ارزیابی و مقایسه نمونه های منی در دو روش یخ-گشایی، پایوت‌های حاوی منی در حمام آب گرم ٣٧°C به مدت ٣٠ ثانیه و ٦٠°C به مدت ٦ ثانیه یخ-گشایی شد(١).

ارزیابی اسپرماتوزوئید پس از یخ‌گشایی

تحرک اسپرم: فراسنجه‌های تحرک اسپرم پس از یخگشایی با استفاده از سیستم کامپیوتری آنالیز اسپرم (Labomed LX400: Labomed Inc., Culver city CA, USA)[12] و یک دوربین دیجیتالی (M-Shot, MD50-5MP USP2.0) با تعداد ٥٣ فریم در دقیقه ارزیابی شدند. مقادیر فراسنجه‌های حرکتی به‌صورت زیر ثبت شد: تحرک کل[13] (درصد)، تحرک پیش‌رونده[14] (درصد)، سرعت میانگین حرکت اسپرم-ها[15] (میلی‌متردر ثانیه)، سرعت در مسیر منحنی[16] (میلی‌متردر ثانیه)، سرعت در مسیر مستقیم[17] (میلی‌متردر ثانیه)، تحرک عرضی سر[18] (میلی‌متر)، فرکانس حرکات جانبی[19] (هرتز)، راستی مسیر طی شده[20] (درصد)، خطی بودن تحرک[21] (درصد). برای ارزیابی وضعیت حداقل ٢٠٠ اسپرم مورد بررسی قرار گرفت.

زنده‌مانی اسپرم: زنده‌مانی اسپرم با روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین انجام شد (٣٦). ترکیبات رنگ شامل: ائوزین-Y ١/٦٧ گرم، نیگروزین ١٠ گرم و سیترات سدیم ٢/٩ گرم، در ١٠٠ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند. برای رنگ آمیزی، ١٠ میکرولیتر نمونه اسپرم رقیق شده با ٢٠ میکرولیتر از رنگ ائوزین-نیگروزین سریعاً روی لام مخلوط و گسترشی از آن تهیه شد و در مجاورت هوا خشک گردید. در بررسی میکروسکوپی لام، اسپرم‌های صورتی یا قرمز رنگ به عنوان اسپرم‌های مرده و اسپرم‌های سفید رنگ به عنوان اسپرم‌های زنده در نظر گرفته شد. تعداد ٢٠٠ اسپرم در هر لام با استفاده از میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی اسپرم های غیرطبیعی: به‌منظور بررسی درصد اسپرم‌های غیرطبیعی، نمونه‌های منی با استفاده از محلول‌هانکوک ارزیابی شد(٣٣). برای ارزیابی اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی، حداقل ١٥ میکرولیتر از هر نمونه اسپرم به لوله‌های حاوی ١٠٠٠ میکرو لیتر محلول‌هانکوک (با مخلوط کردن فرمالین ٦٢/٥ میلی لیتر، محلول سولفات سدیم ١٥٠ میلی لیتر، و آب مقطر دو بار تقطیر ٥٠٠ میلی‌لیتر) اضافه شد، سپس ١٠ میکرولیتر از نمونه منی بر روی لام قرار داده شد و با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست تعداد ٢٠٠ اسپرم در هر لام شمارش شده و درصد کل اسپرم های غیرطبیعی (ناهنجاری‌های سر، سرهای

12. CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)
13. Total motility (TM, %)
14. Progressive Motility (PM, %)
15. Average path velocity (VAP, µm/sec)
16. Curvilinear velocity (VCL, µm/sec)
17. Straight- line velocity (VSL, µm/sec)
18. Lateral head displacement (ALH, mm)
19. Beat-cross frequency (BCF, Hz)
20. Straightness (STR, %)
21. Linearity (LIN, %)

www.SID.ir

Archive of SID

جدا، ضخیم بودن قطعه میانی، خمیدگی قطعه میانی، دم بریده، دم پیچ‌خورده) تعیین شد.

یکپارچگی غشای اسپرم: یکپارچگی غشای پلاسمایی با استفاده از تست التهاب هیپواسموتیک[22]، بر پایه پیچش و تورم دم ارزیابی شد(۱۵). این عمل با انکوباسیون ۱۰ میکرولیتر منی با ۱۰۰ میکرولیتر از یک محلول‌هایپواسمتیک (فروکتوز ۹ گرم/ لیتر+ سیترات سدیم ٤/۹ گرم/ لیتر آب مقطر) در دمای ۳۷°C به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. پس از انکوباسیون ۲۰۰ اسپرم برسی شد و اسپرم‌های با دم پیچ‌خورده و متورم که به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم در نظر گرفته شدند، در هر نمونه در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤۰۰ ارزیابی شد.

ارزیابی تیوباربیتوریک اسید[23]: اساس روش اندازه گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید، استخراج با بوتانل نرمال، اندازه گیری جذب باروش اسپکتروفتومتری می باشد (١٤). واکنش باید در pH=۲-۳ در ۱۰۰-۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه انجام شود. در این شرایط ۱ مولکول مالون‌دی‌آلدهید با دو مولکول تیوباربیتوریک اسید واکنش داده و کمپلکس صورتی رنگی را ایجاد می‌کند. ابتدا پایوت‌ها یخ‌گشایی شدند. سپس اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید با حل کردن ۵۰۰ میکرولیتر نمونه در ۳ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۱٪ آغاز می‌گردد. پس از ورتکس کردن به میزان ۱ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/٦۷٪ به لوله آزمایش اضافه شده و پس از ورتکس کامل به مدت ٤۵ دقیقه در داخل یک بن ماری در حال جوش قرار داده می‌شود. پس از اتمام مدت لازم لوله‌های آزمایش را زیر آب سرد خنک کرده، به میزان ۳ میلی‌لیتر بوتانل نرمال اضافه نموده و به مدت ۱ الی ۲ دقیقه ورتکس نموده و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ نموده و پس از جدا کردن فاز آلی (محلول رویی) غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA)، با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) در طول موج ۵۳۲ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. در این تحقیق استانداردهای مالون دی آلدئید با استفاده از ۱و۱و۳و۳ تترامتوکسی پروپان ((C7H16O4 در پنج غلظت مختلف ۰/۵ ، ۱، ۲، ٤، ۸ نانو مول در میلی لیتر با استفاده از حل کردن در آب دیونیزه تهیه و برای رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

0.5	1	2	4	8
0.01	0.03	0.05	0.09	0.21

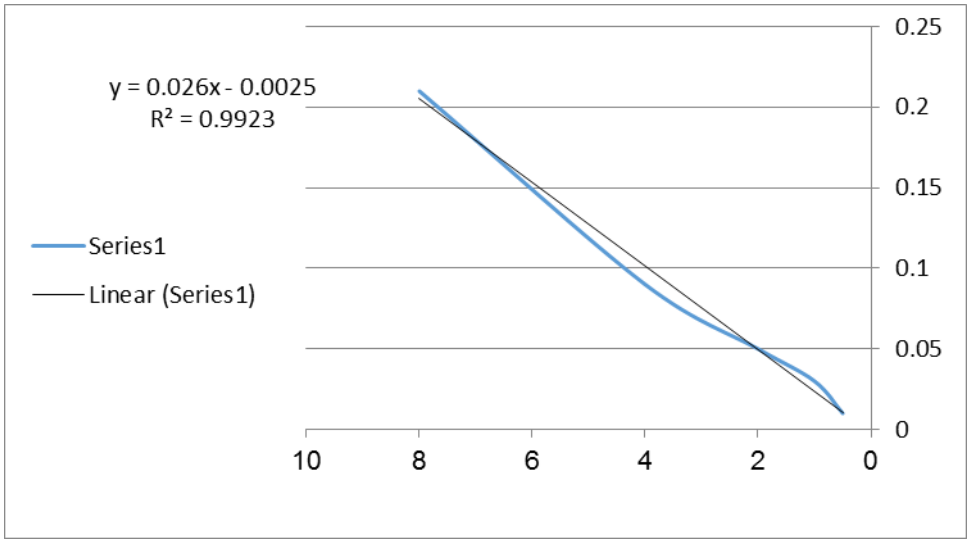
منحنی استاندارد رسم شد. جذب به شکل زیر بود.

سپس معادله رگرسیونی منحنی استاندارد محاسبه شد (نمودار ۱).

22. Hypo-osmotic swelling test (HOST)
23. Thiobarbituric acid (TBARS)

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ١: منحنی استاندارد MDA

فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز پلاسمای منی: برای اندازه‌گیری مقدار آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، از کیت‌های تجاری شرکت رندوکس استفاده شد. گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از کیومن هیدروپراکسید، اکسیداسیون گلوتاتیون را کاتالیز می‌کند. در حضور آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات[٢٤]، شکل اکسید شده گلوتاتیون نیز به فرم گلوتاتیون احیا تبدیل می‌شود. همزمان با آن نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات، اکسید می‌شود. کاهش جذب نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات در ٣٤٠ نانومتر با اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری می‌شود که متناسب با غلظت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز است و به صورت IU / گرم پروتئین گزارش شده است.

ارزیابی سوپر اکسیددیسموتاز پلاسمای منی: به‌منظور ارزیابی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز از کیت‌های تجاری رندوکس استفاده شد. با استفاده از گزانتین و آنزیم گزانتین اکسیداز رادیکال های آزاد سوپراکسید تولید شد. این رادیکال‌های آزاد سپس با کروموژن ٢- (٤- یدوفنیل)-٣- (٤-نیتروفنول) -٥- فنیل تترازولیم کلرید[٢٥] واکنش داده، تا رنگ ایجاد شود. میزان فعالیت آنزیم از طریق مهار این واکنش و جلوگیری از تشکیل رنگ قابل اندازه‌گیری است (٣١). یک واحد سوپراکسید دیسموتاز مقداری از آنزیم است که در شرایط آزمایش، از ٥٠ درصد میزان واکنش تولید رنگ جلوگیری نماید. جذب در ٥٠٥ نانومتر با اسپکتوفتومتر ثبت شد. فعالیت سوپر اکسیددیسموتاز به‌صورت U / میلی‌گرم پروتئین[٢٦] گزارش گردید.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پلاسمای منی: ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی با استفاده از کیت های تجاری شرکت رندوکس اندازه‌گیری شد. بر این اساس مایع منی در دمای ٣٧°C در مدت ٢٠ دقیقه یخ‌گشایی شد. سپس به منظور ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها، ABTS[٢٧] با پراکسیداز و آب‌اکسیژنه[٢٨] به منظور تولید

24. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)

25. 2- (4 – iodophenyl) -3- (4- nitrophenol)-5-phenyltetrazoliumchloride (I.N.T)

26. International unit /miligram protein

27. ABTS® = 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]

28. H_2O_2

www.SID.ir

Archive of SID

کاتیون رادیکال $ABTS^{+}$ انکوبه شد. این ترکیب دارای رنگ نسبتا پایدار سبز آبی است و جذب نمونه‌ها در ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتوفتومتراندازه‌گیری شد(۳۸). آنتی‌اکسیدان‌های اضافه شده به نمونه تا درجه‌ای که متناسب با غلظت‌شان است از تشکیل این رنگ جلوگیری می‌کنند. مقادیر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به صورت میلی‌مول در لیتر پروتئین در نمونه منی پلاسما گزارش شد.

تحلیل آماری

این تحقیق با دو نرخ یخ‌گشایی و هرکدام با شش تکرار انجام شد. داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی و مدل آماری شامل اثر دما و زمان یخ‌گشایی بود. داده‌ها به کمک رویه GLM نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و مقایسه میانگین‌ها به روش توکی انجام گرفت. اثر تیمار به عنوان اثر ثابت در نظر گرفته شد. اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد گزارش شد. مدل آماری این طرح عبارت بود از:

$$Y_{ij}=\mu+A_i + e_{ij}$$

Y_{ij}= داده مشاهده شده برای فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده

μ= میانگین جامعه

A_i= اثر تیمار iام

e_{ij}= اثر باقیمانده یا اشتباه آزمایشی

نتایج و بحث

نتایج حاصل از ارزیابی فراسنجه های حرکتی در جدول ۱ نشان داده شده است. درصد تحرک پیش‌رونده، سرعت در مسیر مستقیم و سرعت در مسیر منحنی اسپرم ها در دمای یخ گشایی ۳۷°C به مدت ۳۰ ثانیه به ۶۰°C به مدت ۶ ثانیه بهبود یافت ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌داری نبود.

جدول ۱: ویژگی‌های دینامیکی تحرک پس از یخ گشایی با روش‌های متفاوت

Table 1. Dynamic motion characteristics after thawing with different methods

P-Value	SEM	روش‌های یخ‌گشایی		فراسنجه‌های حرکتی Motion parameters	
		60°C to 6 s	37°C to 30 s		
0.2197	1.7	50.7	53.8	Total motility	تحرک کل (٪)
0.2315	1.1	21.1	22.9	Progressive motility	تحرک پیش‌رونده (٪)
0.4448	1.0	63.8	63.9	Average path velocity	میانگین سرعت در مسیر (µm/s)
0.3256	1.2	46.9	48.6	Straight-line velocity	سرعت در مسیر مستقیم (µm/s)
0.3818	2.5	106.3	109.4	Curvilinear velocity	سرعت در مسیر منحنی (µm/s)
0.7527	1.7	74.8	75.6	Straightness	راستی مسیر طی شده (٪)
0.9906	1.2	44.3	44.3	Linearity	خطی بودن تحرک (٪)
0.2448	0.3	8.1	7.6	Amplitude of lateral head displacement	تحرک عرضی سر (µm)
0.8508	0.7	16.8	17.0	Beat/cross frequency	فرکانس حرکات (HZ)

تحرک کل (TM)، تحرک پیش‌رونده (PM)، میانگین سرعت در مسیر (VAP)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL)، سرعت در مسیر منحنی (VCL)، راستی مسیر طی شده (STR)، خطی بودن تحرک (LIN)، تحرک عرضی سر (ALH)، فرکانس حرکات جانبی (BCF).

افزایش دما و کاهش زمان یخ‌گشایی تأثیر مثبتی بر دیگر فراسنجه‌های حرکتی نداشت. با توجه به نتایج مندرج در نمودار ۱، درصد زنده مانی و یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم ها نیز در دمای یخ گشایی۳۷°C به مدت ۳۰ ثانیه به ۶۰°C به مدت ۶ ثانیه بهتر بوده اما این افزایش معنی‌دار نبوده است. از نظر ریخت‌شناسی

www.SID.ir

Archive of SID

و میزان اسپرم‌های نابهنجار نرخ یخ‌گشایی بالا اثر معنی‌داری نسبت به یخ‌گشایی در دمای پایین‌تر نداشت (نمودار ٢).

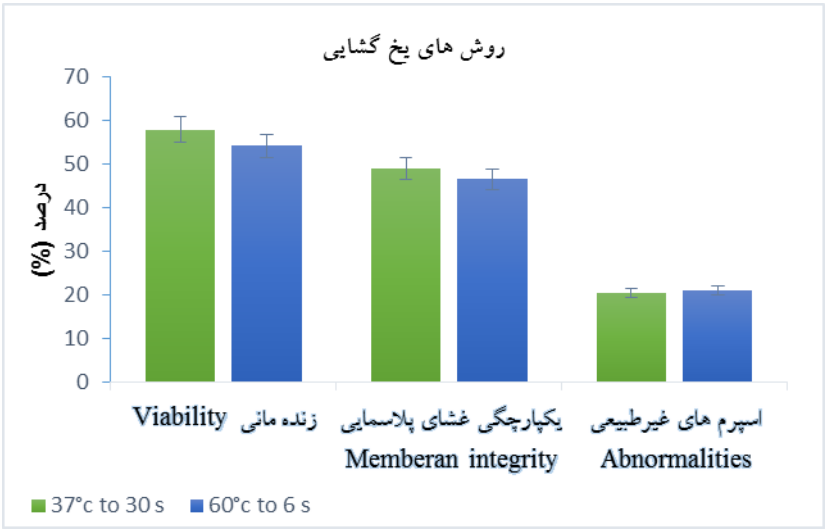
نتایج حاصل از ارزیابی پراکسیداسیون لیپید، فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نشان داد که بین دو نرخ یخ گشایی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. (جدول٢).

جدول ٢: اثر دما و زمان یخ گشایی بر وضعیت اکسیداتیو در منی رقیق شده

Table 2. Effect of temperature and thawing time on Oxidative status of diluted semen.

P-Value	SEM	روش یخ گشایی		وضعیت اکسیداتیو Oxidative status
		60 °c to 6 s	37 °c to 30 s	
0.8601	2.5	43.4	42.8	گلوتاتیون پراکسیداز (IU/g protein) Glutathione peroxidase
0.6486	2	74.3	75.7	سوپراکسید دیسموتاز (U/mg) Superoxide dismutase
0.7730	0.1	1.5	1.5	ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (mmol/l) Total antioxidant capacity
0.7054	0.1	2.9	2.8	غلظت مالوندی آلدهید (nmol/ml) Malondialdehyde

آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز (GP-X)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (TAC) و غلظت مالوندی آلدهید (MDA) در سلول اسپرم.



نمودار ٢ : اثر دما و زمان یخ گشایی بر زنده‌مانی، اسپرم‌های غیرطبیعی و یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها

Figure 1. Efftect of Temperature and thawing time on vlability, Abnormalities, and of memberan intrgrity sperm.

یخ‌گشایی سریع منی باعث کاهش اثرات مضر فرایند کریستاله شدن و هیدراتاسیون شده و از آسیب به سیتوپلاسم و غشاء اسپرم جلوگیری می‌کند (٥٥). در این حالت، هنگام عبور سلول اسپرم از محدوده دمایی خطرناک، کریستال‌های یخ زمان لازم برای تشکیل را نخواهند داشت و بنابر این اسپرم به طور

www.SID.ir

Archive of SID

مستقیم از حالت شیشه‌ای به حالت مایع منتقل می‌شود (٤٣). در حال حاضر پایوت‌های حاوی منی قوچ در حمام آب گرم با دمای ٣٨°C به مدت ٣٠-١٢ ثانیه یخ گشایی می‌شوند؛ این روش منجر به نتایج خوبی (٣٦/١٪ تحرک) در مقایسه با روش آهسته (١٨/٩٪ تحرک) شده است که در آن پایوت‌ها در حمام آب گرم ٥°C به مدت ٢ دقیقه یخ‌گشایی شده-اند (٢١). نتایج حاصل از یک بررسی نشان داد که دماهای بالاتر از ٧٠°C-٥٠ زمان قرار گرفتن اسپرم در معرض آسیب کریستاله شدن واسمزی را به حداقل می‌رساند (٢٥).

بررسی سالامون و ماکسول (٤٨) و اغلب محققین نشان داد که از دمای ٤٢°C-٣٨ و در برخی مطالعات ٧٥°C برای یخ گشایی پایوت حاوی منی منجمد قوچ استفاده شده است (١ و ٥). در برخی مطالعات منی را در ٧٠°C یخ‌گشایی کردند (٤، ١٢، ٢٠) . همچنین در برخی بررسی‌ها یخ‌گشایی بالاتر از ٦٠°C را گزارش کرده‌اند (١٧ و ١٨). سالیسبوری (٥٠) گزارش کرد که یخ‌گشایی باید با سرعت انجام شود زیرا یخ‌گشایی آهسته (٥°C) باعث تشکیل کریستال یخ داخل سلولی شده و منجر به از هم گسیختگی غشاء پلاسمایی می‌شود. مطالعه بر روی اسپرم خوک نشان داد زمانی که پایوت‌ها در حمام آب گرم ٨٠°C-٧٠ نسبت به ٤٠°C غوطه‌ور می‌شوند، اسپرماتوزوا به طور قابل توجهی از ناحیه بحرانی دما (١٥°C- به ٦٠°C-) سریع تر عبور می‌کند (٦, ٢٨). لازم به ذکر است که مدت زمان یخ‌گشایی منی باید کوتاه و دقیق باشد (١١)، این به ویژه در دمای بالا که در آن پروتئین دناتوره می‌شود مهم است. به عبارت دیگر، قرار گرفتن بیش از حد اسپرم در این دما باعث مرگ اسپرم می‌شود (٥٢).

در مطالعه حاضر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم همچون تحرک پیش‌رونده، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیرمنحنی در دمای ٣٧°C بهبود غیرمعنی داری داشت. همچنین سایر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم در دمای بالاتر نسبت به دمای ٣٧°C معنی‌دار نبودند. این نتایج مخالف با یافته‌های سایر محققان بود که بهبود فراسنجه‌های حرکتی اسپرم را در گونه گاو با یخ‌گشایی در دماهای بالاتر گزارش کردند (٢٨, ٥٣). با این حال دکا و رائو (١٩٨٧)، به طور قابل توجهی تحرک پیش‌رونده بالاتری پس از ذوب منی بز با سرعت یخ‌گشایی ٣٧°C به مدت ١٢-١٥ ثانیه نسبت به یخ‌گشایی آهسته در ٥°C به مدت ٢ دقیقه به دست آوردند (١٤). همچنین تعدادی از محققین گزارش کردند که تحرک اسپرم، سلامت آکروزوم و میزان زنده‌مانی سلول‌اسپرم، زمانی که پایوت‌ها در ٧٠°C به مدت ٥ ثانیه یخ‌گشایی می‌شوند در مقایسه با یخ-گشایی ٣٧°C به مدت ٣٠ ثانیه و ٥٠°C به مدت ١٥ ثانیه به طور قابل توجهی بالاتر است (٣٩,٣). جینودین و داس (١٩٨٢)، میزان بالایی از تحرک و یکپارچگی آکروزوم را در منی گاومیش پس از یخ‌گشایی با سرعت٥٠°C در مقایسه با ٥°C گزارش کردند (٢٣). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که فراسنجه‌های تحرکی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء پلاسمایی با غوطه‌ور شدن پایوت‌ها در حمام آب گرم با نرخ یخ‌گشایی ٣٧°C به مدت ٣٠ ثانیه در مقایسه با نرخ یخ‌گشایی ٦٠°C به مدت ٦ ثانیه بهبودیافته اما این افزایش معنی‌دار نبود. این نتایج موافق با نتایجی بود که توسط پنتبریان و همکاران (١٩٨٢) گزارش شد که تأثیر مثبتی از دمای یخ گشایی بر تحرک یا یکپارچگی آکروزوم اسپرم قوچ پس از یخ‌گشایی در٣٧°C به مدت ٢٠ ثانیه و دمای ٦٠°C به مدت ٨ ثانیه با استفاده از پایوت‌های ٠/٥ میلی لیتری پیدا نکردند (٤٤).

نتایج بدست‌آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که میزان اسپرم های غیرطبیعی با یخ‌گشایی در ٣٧°C به

www.SID.ir

Archive of SID

مدت ٣٠ ثانیه بهبود یافته اما این افزایش معنی‌دار نبود که مخالف با نتایج سایر محققین بود (٥٧،٤٦).

جیاندرن و همکاران (١٩٨٤) گزارش کردند که توانایی دم اسپرم نسبت به تورم در یک محلول‌هایپواسموتیک نشان‌دهنده انتقال آب از غشاء به طور طبیعی است؛ یعنی نشان‌دهنده یکپارچگی و عملکرد طبیعی غشاء است (٢٤). در مطالعه حاضر نیز عدم تأثیر روش‌های انجماد بر درصد اسپرم‌های با دم متورم شده موافق با نتایج سایر محققین بود (٥٤).

سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز به‌عنوان مکانیسم دفاعی در برابر پراکسیداسیون لیپیدی مایع منی انسان و گونه‌های متعدد حیوانی شناخته شده‌اند که در حفظ تحرک و زنده مانی اسپرم مهم هستند (١٩، ٥٦ و ٥٩). اختلال در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی منی فریز شده پستانداران ممکن است ناشی از حذف یا رقت بالای پلاسما در طی فرآیند انجماد و یخ‌گشایی باشد (١٠). لسو و همکاران (١٩٩٤)، دریافتند فعالیت سوپراکسید دیسموتاز نمونه اسپرم انسان پس از فرایند انجماد پایین تر از نمونه اسپرم تازه است (٢٦). این مطالعات نشان می‌دهد که از دست دادن بخشی از آنزیم های آنتی‌اکسیدانی در غشای پلاسمایی سلول‌های آسیب‌دیده اسپرم باعث مستعد شدن اسپرم به آسیب پراکسیداسیون پس از یخ‌گشایی می‌شود. در مطالعه حاضر اثر مقایسه دو نرخ یخ‌گشایی بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی شد و نتایج به دست‌آمده نشان داد که تفاوت معناداری بین دو نرخ یخ‌گشایی بر فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز وجود ندارد. همچنین نشان داده شده است که ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی منی، با قدرت تحمل اسپرم درطی انجماد مرتبط است (٨). در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری بین دو نرخ یخ‌گشایی در ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی منی به دست نیامد. تاکنون مقایسه اثر نرخ یخ‌گشایی بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های اسپرم و پلاسمای منی حیوانات انجام نشده است. در این تحقیق برای اولین بار این اثرات با دو نرخ یخ‌گشایی ارزیابی شد و هیچ تفاوت معناداری بین دو نرخ یخ‌گشایی مشاهده نشد.

تولید رادیکال‌های آزاد در طی فرآیند انجماد-یخ‌گشایی منجر به پراکسیداسیون لیپیدی غشاء اسپرم می‌شود (١٣). لذا شاخص تولید مالون‌دی‌آلدهید به طور گسترده برای تعیین پراکسیداسیون لیپید در انواع سلول ها از جمله اسپرم استفاده می‌شود (٢٧) . نایر و همکاران (٢٠٠٦) نشان دادند که مقدار مالون‌دی‌آلدهید تولید شده در اسپرم ارتباط منفی با تحرک و زنده‌مانی اسپرم دارد (٣٤). نجفی و همکاران (٢٠١٤) نشان دادند که بین پراکسیداسیون لیپیدی و تحرک اسپرم ارتباط معنی‌داری وجود دارد (٣٥). در مطالعه حاضر نیز تفاوت قابل توجهی بین سطوح مالون‌دی‌آلدهید میان دو نرخ یخ‌گشایی مشاهده نشد که ظاهرا نشان می دهد نرخ یخ‌گشایی عامل اصلی تاثیر گذار بر LPO و به دنبال آن کیفیت اسپرم پس از یخ گشایی نیست. بنابر این احتمالا نرخ متفاوت یخ‌گشایی در سیالیت غشاء پلاسمایی موثر نبوده و تاثیری بر حساسیت اسپرم نسبت به پراکسیداسیون لیپیدی ندارد.

نتیجه‌گیری کلی

این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات نرخ یخ‌گشایی بر کیفیت پس از ذوب اسپرم قوچ طراحی شد. نتایج بیانگر این نکته می‌باشند که نرخ یخ‌گشایی٦٠°C به مدت ٦ ثانیه نتوانسته جایگزین مناسبی برای نرخ یخ‌گشایی ٣٧°C به مدت ٣٠ ثانیه باشد و تفاوت معنی‌داری بین دو نرخ یخ‌گشایی وجود ندارد. با این حال لازم است با انجام آزمایش‌های عملکردی، پروتکل‌های مختلف یخ‌گشایی به ویژه دماهای پایین‌تر از

www.SID.ir

Archive of SID

۶۰°C بیشتر بررسی شده و تاثیر آن بـر بـاروری قـوچ ارزیابی شود.

منابع

1. Aamdal, J., and Andersen, K. 1968. Freezing of ram semen in straws. Int Congr Anim Reprod Artif Insemination. Anim Reprod Sci, Paris, France. 977-980.
2. Aboagla, E.M.E., and Terada, T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. J. Theriogenology. 62: 1160-1172.
3. Ahmad, K., 1984. Effect of thaw rates on survival of buffalo spermatozoa frozen in straws. J. Dairy. Sci. 67: 1535-1538.
4. Andersen, K., and Aamdal, J. 1972. Artificial insemination with frozen semen in sheep in Norway. Reprod Domest Anim. 26:27–30.
5. Andersen, V.K., Aamdal, J., and Fougner, J. 1973. Intrauterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep. Reprod Domest Anim. 8: 113-118.
6. Athurupana, R., Ioki, S., and Funahashi, H. 2015. Rapid thawing and stabilizing procedure improve postthaw survival and in vitro penetrability of boar spermatozoa cryopreserved with a glycerol-free trehalose-based extender. J. Theriogenology. 84(6): 940-947.
7. Athurupana, R., Ioki, S., and Funahashi, H. 2015. Rapid thawing and stabilizing procedure improve post-thaw survival and in vitro penetrability of boar spermatozoa cryopreserved with a trehalose-based extender. J. Reprod Dev. 61: 205–10.
8. Barranco, I., Tvarijonaviciute, A., Perez-Patiño, C., Parrilla, I., Ceron, J.J., Martinez, E.A., Rodriguez-Martinez, H. and Roca, J. 2015. High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. Sci. Rep. 5: 18538.
9. Bearden, H.J., Barranco, I., Tvarijonaviciute, A., Perez-Patiño, C., Parrilla, I., Ceron, J.J., Martinez, E.A., Rodriguez-Martinez, H., and Roca, J. 2015. High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. Sci. Rep. 5: 18538.
10. Barranco, I., Tvarijonaviciute, A., Perez-Patiño, C., Parrilla, I., Ceron, J.J., Martinez, E.A., RodriguezMartinez, H., and Roca, J. 2015. High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. Sci. Rep. 5: 18538.
11. Bearden, H. J., and Fuquay, J.W., Applied animal reproduction, Reston Publishing Company, Inc. 1980. Reston Publishing Company, Inc, Reston,Virginia. 337 .
12. Bilodeau, J.F., Chatterjee, S., Sirard, M.A., and Gagnon, C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Mol Reprod Dev. 55(3): 282-288.
13. Blackshaw, B.A. 1955. Factors affecting the revival of bull and ram spermatozoa after freezing to—79 C. J. Aust Vet. 31: 238-241.
14. Borah, B.K.D., Deka, B.C., Biswas, R.K., Chakravarty, P., Deori, S., Sinha, S., and Ahmed, K. 2015. Effect of thawing methods on frozen semen quality of yak (*Poephagus grunniens* L.) bulls. Vet World. 8 (7): 831.
15. Chatterjee, S., and Gagnon, C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. Mol Reprod Dev. 59: 451-458.
16. Dandekar, S.P., Nadkarni, G.D., Kulkarni, V.S., and Punekar, S. 2002. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. J. Postgraduate Medicine. 48(3): 186.
17. Deka, B., and Rao, A. 1987. Effect of extenders and thawing methods on post thawing preservation of goat semen.Vet World. 64: 591-594.
18. Dodaran, H.V., Zhandi, M., Sharafi, M., Nejati-Amiri, E., Nejati-Javaremi, A., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shehab-El, M.A., and Shakeri, M. 2015 . Effect of ethanol induced mild stress on

www.SID.ir

Archive of SID

post-thawed bull sperm quality. J. Cryobiology. 71: 12-17.

19. Eriksson, B.M., and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. Anim Reprod Sci. 63: 205-220.
20. Fiser, P., and Fairfull, R. 1989. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. J. Cryobiology. 26: 64-69.
21. Fiser ,P., Ainsworth, L., and Fairfull, R. 1987. Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. J. Theriogenology. 28: 599-607.
22. Gadea, J., Sellés, E., Marco, M.A., Coy, P., Matás, C., Romar, R., and Ruiz, S . 2004 . Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. J. Theriogenology. 62: 690-701.
23. Grøtte, O., Graffer, T. and Olesen, I., Artificial insemination with frozen ram semen in Norway, Proc. 12th Int. Congr. Anim Reprod, 1992, pp. 1557-1559.
24. Hashemi, A., Farhoomand, P., Pirmohammadi, R., Nayebpor, M., and Razzaghzadeh, S. 2007. Effect of extender and thawing methods on post thawing preservation. J. Anim. Vet Adv. 6: 1337-1339.
25. Holt, W., Head, M., and North, R. 1992. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. Biol Reprod. 46: 1086-1094.
26. Jainudeen, M., and Das, S. 1982. Effect of level of glycerol, rates of freezing and thawing on the survival of buffalo spermatozoa in straws. Asian-Australas J. Anim. Sci. Serdang, Malaysia. Penerbit University, Kuala Lumpur, Malaysia. 409-411.
27. Jeyendran, R., Van der Ven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B., and Zaneveld, L. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod Fertil. 70: 1.219-228.
28. Knox, R., Ringwelski, J., McNamara, K., Aardsma, M., and Bojko, M. 2015. The effect of extender, method of thawing, and duration of storage on in vitro fertility measures of frozen–thawed boar sperm. J. Theriogenology. 84: 407-412.
29. Lasso, J.L., Noiles, E.E., Alvarez, J.G., and Storey, B.T. 1994. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. Int J. Androl. 15: 255-265.
30. Lector ,C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front Biosci. 1: 78-86.
31. Lyashenko, A. 2015. Effect of different thawing procedures on the quality and fertility of the bull spermatozoa. Asian. Pac. J. Reprod. 4: 17-21.
32. Marshall, C. 1984. Considerations for cryopreservation of semen. Z Biol. 3: 343-356.
33. Masoudi, R., Shahneh, A.Z., Towhidi, A., Kohram, H., Akbarisharif, A., Sharafi, M., Zhandi, M., and Shahab-El-Deen, M. 2017. Cervical dilation and improvement of reproductive performance in fat-tailed ewes via cervical dilator treatments. Asian. Pac. J. Reprod. 6: 93.
34. Mazur, P. 1985. Basic concepts in freezing cells. Deep freezing of boar semen. Uppsala, Sweden. Agric. Sci. 37–60.
35. Mehdipour, M., DaghighKia, H., Nazari, M., and Najafi, A. 2017. Effect of lecithin nanoliposome or soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw flow cytometric, microscopic and oxidative parameters in ram semen. J. Cryobiology. 78: 34-40.
36. Mehdipour, M., Daghigh Kia, H., Najafi, A., Dodaran, H.V., and García-Álvarez, O. 2016. Effect of green tea (Camellia sinensis) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-

www.SID.ir

Archive of SID

different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. Theriogenology. 61: 9.1719-1727.

45. Peña, A., and Linde-Forsberg, C. 2000. Effects of Equex, one-or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. J. Theriogenology. 54: 859-875.
46. Perry, E.J. 1955. Artificial insemination of farm animals, Rutgers University Press: NB. 368.
47. Pontbriand, D., Howard, J., Schiewe, M., Stuart, L., and Wildt, D. 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa . J. Cryobiology. 26: 341-354.
48. Rastegarnia, A., Shahverdi, A., Topraggaleh, T.R., Ebrahimi, B., and Shafipour, V. 2013. Effect of different thawing rates on post-thaw viability, kinematic parameters and chromatin structure of buffalo (bubalus bubalis) spermatozoa. J. Cell (Yakhteh). 14: 306.
49. Rijsselaere, T., Pope, E., Wirtu, G., Filliers, M., Maes, D., Dresser, B., and Van Soom, A. 2007. Effect of thawing temperature on survival of cooled, cryopreserved epididymal cat spermatozoa, Proceedings of the 16th Congresso Nacional and the 5th Annual Symposium of EVSSAR (Estoril, Portugal). 106-106.
50. Robbins, R., Saacke, R., and Chandler, P. 1976. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. J. Anim. Sci. 42: 145-154.
51. Salamon, S., and Maxwell, W.M.C. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. J. Anim. Sci. 37: 185-249.
52. Salamon, S., and Maxwell, W. 2000. Storage of ram semen. J. Anim. Sci. 62: 77-111.
53. Salisbury, G.W., VanDemark, N., and Lodge, J.R., 1978. Physiology of reproduction and artificial insemination based extender. J. Cryobiology. 73: 297-303.
37. Nair, S.J., Brar, A., Ahuja, C., Sangha, S., and Chaudhary, K. 2006. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. Anim Reprod Sci. 96: 1-2.21-29.
38. Najafi, A., Daghigh Kia, H., Mohammadi, H., Najafi, M.H., Zanganeh, Z., Sharafi, M., Martinez-Pastor, F. and Adeldust, H. 2014. Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. Cryobiology. 69: 1.68-73.
39. Najafi, A., Najafi, M., Zanganeh, Z., Sharafi, M., Martinez- Pastor, F. and Adeldust, H. 2014. Cryopreservation of ram semen in extenders containing soybean lecithin as cryoprotectant and hyaluronic acid as antioxidant. Reprod Domest Anim. 49: 6.934-940.
40. Najafi, D., Taheri, R.A., Najafi, A., Rouhollahi, A.A. and Alvarez-Rodriguez, M. 2018. Effect of Achillea millefolium-loaded nanophytosome in the post-thawing sperm quality and oxidative status of rooster semen. Cryobiology. 69: 1.68-73.
41. Nur, Z., Ileri, I.K. and Ak, K. 2006. Effects of different temperature treatments applied to deep stored bull semen on post-thaw cold shocked spermatozoa. B Vet Ipulawy. 50: 1.79.
42. Nur, Z., Segirkaya, H., Dogan, I., Soylu, M., Ak, K. and Ileri, I. 2005. Effect of low temperature thawing procedure and post-thaw cold shock on frozen bull semen. Med Weter. 9: 61.
43. Ollero, M., Perez-Pe, R., Muino-Blanco, T. and Cebrian-Perez, J. 1998. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. Cryobiology. 37: 1.1-12.
44. Paulenz, H., Söderquist, L., Ådnøy, T., Nordstoga, A., Gulbrandsen, B. and Berg, K.A. 2004. Fertility results after

www.SID.ir

Archive of SID

of cattle.WH Freeman and Company. No.Ed. 798 .

54. Sarangi, A., Verma, A., Patel, R.N., Rath, A.P., Sahu, S., Virmani, M., and Devi, P . 2018. Vitamin E and Gluthathion as Antioxidant in Liquid Preservation of Semen: A Review. Int. J. Curr Microbiol. App. Sci. 7: 1680-1684.
55. Sawyer, D.E., Mercer, B.G., Wiklendt, A.M., and Aitken, R.J. 2003. Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. Mutat. Res. 529: 21-34.
56. Shah, S., Andrabi, S., and Qureshi, I. 2016. Effect of equilibration times, freezing, and thawing rates on post- thaw quality of buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa. J. Andrology. 4: 972-976.
57. Söderquist, L., Madrid-Bury, N., and Rodriguez-Martinez, H. 1997. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. J. Theriogenology. 48: 1115-1125.
58. Sukhato, P., Thongsodseang, S., Utha, A., and Songsasen, N. 2001. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. J. Anim. Sci . 67: 69-77.
59. Surai, P., Blesbois, E., Grasseau, I., Chalah, T., Brillard, J.-P., Wishart, G., Cerolini, S., and Sparks, N. 1998. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Bio. Mol. Educ. 120: 527-533.
60. Vazquez, J., Martinez, E., Martinez, P., Garcia-Artiga, C., and Roca, J. 1997. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. J. Theriogenology. 47: 913-922.
61. Verma, A., and Kanwar, K. 1999. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. Asian. J. Androl. 1: 151-154..
62. Wai-Sum, O., Chen, H., and Chow, P. 2006. Male genital tract antioxidant enzymes—their ability to preserve sperm DNA integrity. Mol Cell Endocrinol. 250: 80-83.

www.SID.ir

Archive of SID

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 6(2), 2018
http://ejrr.gau.ac.ir

Effect of different thawing procedures on frozen semen quality of Ghezel rams

S. Vatankhah[1], *H. Daghigh Kia[2], G. Moghaddam[2] and M. Ebrahimi[3]
[1]M.Sc. Gratuated, [2]Professor, and [3]Assistant Prof., Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
Received: 22/03/2018; Accepted: 09/09/2018

Abstract

Background and objectives: Today, artificial insemination has a special place in improving production efficiency and improving genetic progress. In order to realize many of the potential benefits of artificial insemination, semen storage for a long-term is considered a necessary step by freezing process. The freezing process, including the thawing process, leads to morphological changes, damage to the natural functions of the sperm and ultimately reduced fertility. Therefore, improving the thawing method of ram semen is related to the sperm quality indicators and is of considerable importance. The purpose of this study was to compare the effects of two thawing procedures on microscopic parameters, activity of Glutathione peroxidase and Superoxidase dismutase enzymes, and total antioxidant capacity of ram semen after freeze-thawing process.

Materials and methods: In this study, semen samples were collected from five Ghezel ram (3 and 4 years of age), during the breeding season, using an artificial vagina twice a week. To eliminate the individual effects of animals, semen samples were pooled after each sampling. Then diluted with Tris diluents having 1.5% soyben lecetin and 7% glycerol. The diluted semen's were filled at 0.25 ml straw and frozen in nitrogen vapor and stored in a tank containing liquid nitrogen until evaluation. The straws were thawed at water bath temperatures at (i) 37°C for 30 s and (ii) 60°C for 6 s. Following the freeze-thawing process, the effects of time exposure and thawing temperature on the kinematic features (CASA), viability, plasma membrane integrity, morphological abnormalities, malondialdehyde concentration, antioxidant activity, and total antioxidant capacity were evaluated. The experiment was conducted as a completely randomized and the statistical model includes the effect of temperature and thawing time. The data were analyzed by the general linear model (GLM) procedure and statistical differences between the various groups means were determined by Tukey's test. Significant differences were reported at the level of ($P<0.05$).

Results: The results showed that sperm motility parameters such as progressive motility, straight-line velocity, and curvilinear velocity at 37°C to 60 °c were not statistically significant difference, but, there were some changes in terms of numbers. The viability and plasma membrane integrity at 37°C for 30 s compared 60°C for 6 s were positively changed numerically, but it was no significant. Also, total abnormality did not improve at high thawing rates than low rates. In addition, the results of the comparison of lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and total antioxidant capacity were no significant at two thawing procedures.

Conclusion: According to the results obtained from thawing methods, the motility index, viability, and oxidative status at thawing rate 60°C for 6 s cannot be a suitable alternative for semen thawing at 37°C for 30 seconds.
***Keywords*:** Thawing rates, Quality parameters, Frozen semen, Ram

*Coresponding Author: daghighkia@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir