Archive of SID

اثر زمان‌های مختلف تعادل بر انجمادپذیری اسپرم بز با استفاده از رقیق‌کننده‌ی مکمل شده با لسیتین سویا

مهدی ژندی[۱*]، ملک شاکری[۲]، رضا نوعی‌رازلیقی[۳]، آرمین توحیدی[۴]، مجتبی امام‌وردی[۵]، افشین سیفی‌جمادی[۵] و رضا معصومی[۶]

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۲

چکیده

هدف از اجرای آزمایش حاضر، مطالعه‌ی زمان‌های تعادل مختلف (۲، ۴ و ۶ ساعت) قبل از انجماد بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی بود. در این آزمایش، از چهار رأس بز نر نژاد مهابادی اسپرم‌گیری شد. پس از ارزیابی‌های اولیه، نمونه‌ها با هم مخلوط و به سه قسمت مساوی تقسیم گردید، سپس در رقیق‌کننده‌ی حاوی لسیتین سویا رقیق و بعد از گذراندن زمان‌های مختلف تعادل، منجمد شدند. پس از یخ‌زدایی، ویژگی‌های حرکتی اسپرم، یکپارچگی و فعالیت غشای پلاسمایی، ناهنجاری‌های اسپرم و میزان پراکسیداسیون لیپیدی ارزیابی شدند. بر اساس نتایج به دست آمده زمان تعادل شش ساعت بالاترین جنبایی پیش‌رونده را (۱/۳۹±۲۵/۶ درصد) در مقایسه با زمان تعادل دو و چهار ساعت داشت ($P\leq ۰/۰۵$). سایر فراسنجه‌های کیفی اسپرم تحت تأثیر زمان‌های تعادل مختلف قرار نگرفتند. در نتیجه، زمان تعادل قبل از انجماد اسپرم بز به مدت شش ساعت می‌تواند جنبایی پیش‌رونده را بهبود بخشد هرچند توصیه می‌شود سایر ارزیابی‌های تخصصی و باروری نیز مورد سنجش قرار گیرند.

کلمات کلیدی: اسپرم بز، زمان تعادل، انجمادپذیری، لسیتین سویا

مقدمه

فرآیند انجماد اسپرم فناوری دقیق و ماهرانه‌ای است که طی چند دهه‌ی اخیر فعالیت‌های عمده‌ای برای بهبود آن صورت گرفته است، اما کماکان میزان بازیافت اسپرم پس از انجماد پایین بوده و باید بهبود یابد. فرآیند انجماد با ایجاد کریستال‌های یخ در سلول اسپرم می‌تواند برای اسپرم زیان‌بار باشد. اما مقدار و آثار منفی این فرآیند در گونه‌های مختلف متفاوت است (O'connell et al. 2002, Oberoi et al. 2014). غشای اسپرم نقش مهمی در مقاومت به سرما و زنده‌مانی اسپرم پس از ذوب و نیز فرآیند لقاح و بارورسازی ایفا می‌نماید. فرآیند انجماد اسپرم باعث آسیب‌های شیمیایی و فیزیکی زیادی به غشای اسپرم می‌شود که به تغییرات در انتقال از فاز لیپیدی، افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا توسط گونه-های اکسیژنی فعال (ROS) تنش‌های مکانیکی به غشا در اثر تنش اسمزی و تغییرات دمایی نسبت داده می‌شود (Salmani et al. 2013). گزارش شده است که ROS ها، با احیای اکسیژن تک ظرفیتی تولید می‌شوند (Bilodeau et al. 2000, Misra and Fridovich 1972) و مسئول حفظ

[۱*] دانشیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج E-mail: mzhandi@ut.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] دانشیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
[۳] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
[۴] استاد گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
[۵] دانشجوی دکتری فیزیولوژی دام، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
[۶] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه زنجان

www.SID.ir

Archive of SID

فرآیندهای فیزیولوژیکی در اسپرم مانند ظرفیت‌دار شدن و واکنش آکروزومی هستند. از طرف دیگر، مقادیر بالای گونه‌های اکسیژنی فعال زنده‌مانی اسپرم منجمد را کاهش داده و به خاطر وجود اسیدهای چرب غیراشباع در غشای پلاسمایی اسپرم باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شوند. شرط لازم برای انجماد بهینه و کاهش آسیب‌های انجمادی استفاده از ترکیباتی در رقیق‌کننده است که بتواند از آسیب‌های گفته شده جلوگیری کرده و نیز مواد غذایی مورد نیاز اسپرم را فراهم نماید (Seifi-Jamadi et al. 2016).

روش‌های زیادی برای افزایش زنده‌مانی اسپرم پس از فرآیند انجماد- ذوب به کار گرفته شده است که شامل تغییر در زمان‌های سردسازی، نرخ رقیق‌سازی، غلظت سرما محافظ، زمان تعادل و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مختلف است. تا به امروز گلیسرول و زرده‌ی تخم‌مرغ ترکیبات رایج در انجماد اسپرم گونه‌های مختلف بوده است، اما اخیراً استفاده از منابع غیرحیوانی نظیر لسیتین سویا برای انجماد گونه‌های مختلف گسترش پیدا کرده است (Shahverdi et al. 2014).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که لسیتین سویا می‌تواند جایگزین خوبی برای زرده تخم‌مرغ باشد. در یک مطالعه روی اسپرم بز، محیط تجاری آندرومد (AndroMed) که حاوی لسیتین سویا می‌باشد با زرده‌ی تخم‌مرغ مورد مقایسه قرار گرفت و گزارش شد که اختلاف معنی‌داری بین زرده‌ی تخم‌مرغ و محیط آندرومد وجود ندارد (Becker-Silva and Holtz 2008). همچنین، در مطالعه‌ای دیگر روی اسپرم قوچ، مشخص شد که اختلاف معنی‌داری بین محیط حاوی یک درصد لسیتین سویا و زرده تخم‌مرغ وجود ندارد (Forouzanfar et al. 2010).

زمان تعادل فاصله‌ی زمانی بین افزودن گلیسرول و انجماد اسپرم می‌باشد و به دلیل این که باعث ایجاد تعادل اسمزی مناسب پس از برهم‌کنش اسپرم با سرما محافظ می‌شود انتظار می‌رود که در روند انجماد اسپرم سودمند باشد (Camara et al. 2011). مطالعات انجام شده در گذشته (Sullivan and Mixner 1963) و مطالعات اخیر (Leite et al. 2010) اثرات سودمند زمان تعادل در اسپرم گاو را نشان داده‌اند. افزایش زمان تعادل قبل از انجماد با افزایش درصد اسپرم‌های جنبا پس از ذوب همراه می‌شود (Van der Westhuysen, 1978). در پژوهشی که روی اسپرم بز انجام شد، زمان‌های تعادل ۱، ۳ و ۵ ساعت قبل از انجماد اسپرم، مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که زمان تعادل ۵ ساعت اثرات بهتری را در بر دارد (Deka and Rao 1986). مطالعات اندکی در این خصوص به ویژه در نشخوارکنندگان صورت گرفته است، اما برخی از این مطالعات گزارش کرده‌اند که افزایش زمان تعادل باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی و باروری اسپرم پس از یخ‌گشایی در گاو (Foote and Kaproth 2002) و گاومیش (Sukhato et al. 2001) شده است. اثرات زمان تعادل و برخی فراسنجه‌های دیگر در بهبود انجماد اسپرم گاومیش در مطالعه‌ای توسط Andrabi در سال ۲۰۰۹ گزارش شده است و در آن مطالعه نرخ سردسازی بالا از طریق کاهش تبدیل فروکتوز به پیش سازهای انرژی، برداشت اکسیژن و تولید ATP، باعث کاهش میزان جنبایی اسپرم گردید.

با توجه به این که اثر زمان‌های مختلف تعادل در رقیق‌کننده بر پایه لسیتین سویا بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز مطالعه نشده است، هدف اصلی این پژوهش بررسی اثر زمان‌های مختلف تعادل (۲، ۴ و ۶ ساعت) در رقیق‌کننده‌ی حاوی لسیتین سویا، برای جلوگیری و یا کاهش آسیب‌های انجمادی و بهبود احتمالی کیفیت اسپرم در طی فرآیند انجماد–یخ‌گشایی بود.

مواد و روش کار

در این پژوهش از منی چهار رأس بز نر نژاد مهابادی با سن ۳ تا ۴ سال استفاده شد. بزها در ایستگاه پرورشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در شهر کرج و تحت شرایط یکسان پرورشی نگه‌داری شده بودند. نمونه‌های منی هفته‌ای دو بار و به مدت ۴ هفته و

www.SID.ir

Archive of SID

در ماه‌های اردیبهشت تا آخر خرداد و با استفاده از واژن مصنوعی (دمای درونی ۴۰ تا ۴۳ درجه‌ی سانتی‌گراد) از بزهای نر آموزش دیده، جمع‌آوری شدند.

بلافاصله پس از جمع‌آوری منی و انتقال آن به آزمایشگاه، ارزیابی‌های اولیه روی آن انجام شد. نمونه منی در هر انزال که دارای حجم بین ۰/۷۵-۲ میلی‌لیتر، غلظت بیش‌تر از $۲/۵\times۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر، جنبایی بیش‌تر از ۸۵ درصد و اسپرم‌های ناهنجار کم‌تر از ۱۵ درصد بود به عنوان نمونه واجد شرایط برای ارزیابی‌های بعدی در نظر گرفته شد.

پس از آماده‌سازی محیط پایه‌ی تریس پنج درصد حجمی / حجمی گلیسرول، یک درصد وزنی/حجمی لسیتین به آن افزوده شد. پس از حل کردن لسیتین در محیط محلول به دست آمده به منظور شفاف شدن محیط با فیلترهای ۰/۲ میکرومتر فیلتر شد.

پس از جمع‌آوری منی و انتقال آن به آزمایشگاه و ارزیابی‌های اولیه، نمونه‌های منی حاصل از چهار بز با هم مخلوط شده و به سه بخش مساوی تقسیم شدند و رقیق کننده‌های حاوی لسیتین سویا به نمونه‌های منی اضافه شد پس از قرار گرفتن نمونه‌ها در بشر حاوی آب هم دما با محیط نمونه‌ها به داخل یخچال منتقل شدند و پس از گذشت ۲ (گروه شاهد)، ۴ و ۶ ساعت (زمان‌های مختلف تعادل) انجماد نمونه‌های منی بر اساس یک روش استاندارد انجام شد. در این روش نمونه‌های سرد شده پس از کشیده شدن به پایوت‌ها، در فاصله‌ی چهار سانتی-متری از بخار ازت مایع قرار داده شده و پس از گذشت ۱۰ دقیقه در ازت مایع شناور شدند (Salmani et al. 2013). این آزمایش در قالب ۶ تکرار انجام و در هر تکرار ۱۵ پایوت برای هر تیمار در نظر گرفته شد. یخ‌گشایی نمونه‌های اسپرم در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی-گراد و به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت.

پس از یخ‌گشایی، جنبایی اسپرم با استفاده از سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (*CASA, Version 12 IVOS, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA*)، ارزیابی شد که شامل فراسنجه‌های سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده (VCL)، سرعت اسپرم در خط مستقیم (VSL)، میانگین سرعت در مسیر مستقیم (VAP)، معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد است (LIN)، معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد (STR)، حداکثر دامنه‌ی حرکات جانبی بر حسب میکرومتر (ALH)، فرکانس حرکات جانبی بر حسب هرتز (BCF) است.

زنده‌مانی با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین اندازه‌گیری شد. برای این کار حدود ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ی اسپرم را برداشته و روی لام قرار داده شد سپس حدود ۲۰ میکرولیتر نیز از رنگ آماده شده ائوزین-نیگروزین روی نمونه ریخته و با سمپلر به آرامی نمونه هم زده شد تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از تهیه گسترش نازک و خشک شدن نمونه، لام در زیر میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی X ۴۰۰ مشاهده شده و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شده و درصد اسپرم‌های مرده (رنگ گرفته) و زنده (بی رنگ) محاسبه گردید. اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کم رنگ به خود گرفته بودند و یا تنها بخشی از آن‌ها رنگ گرفته بود به عنوان اسپرم زنده و اسپرم‌هایی که کاملاً رنگ گرفته بودند به عنوان اسپرم مرده در نظر گرفته شدند (Evans and Maxwell 1987).

یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم به وسیله‌ی آزمون تورم هایپواسمتیک (HOS Test) اندازه‌گیری شد. با توجه به این که اسمولاریتی محیط HOS حدود ۱۰۰ میلی‌اسمول و اسمولاریته مورد نیاز برای اسپرم بز حدود ۳۲۵ تا ۳۶۰ میلی‌اسمول است، بنابراین اسپرم‌های سالم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. برای این کار ۱۰ میکرولیتر از منی با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از گذشت این زمان نمونه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰۰، ارزیابی و در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شده و درصد اسپرم‌های سالم (دم گره خورده) نسبت به اسپرم‌های مرده محاسبه شد (Revell and Mrode 1994).

ناهنجاری‌های کل اسپرم با استفاده از محیط هانکوک [شامل: فرمالین (۱۲/۵ درصد حجمی–حجمی)، محلول سالین (۳۰ درصد حجمی–حجمی)، محلول بافر (۳۰ درصد حجمی–حجمی) در آب دو بار تقطیر] ارزیابی شد. در این روش برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی نیز، حدود ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط هانکوک افزوده شد. پس از تهیه‌ی اسلاید، با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوئید زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی (اختلالات آکروزوم و سر، سر جدا شده، قطعه‌ی میانی غیرطبیعی و ناهنجاری دم) محاسبه شد (Najafi et al. 2013).

میزان پراکسیداسیون لیپید با استفاده از اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدهید (MDA) تولیدی ارزیابی شد (Salmani et al. 2013). در این روش، یک میلی‌لیتر از نمونه‌ی اسپرم درون لوله فالکون ریخته شده، سپس به ترتیب یک میلی‌لیتر BHT، یک میلی‌لیتر EDTA و ۲ میلی‌لیتر TCA به نمونه اضافه شد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شدند. یک میلی-لیتر از مایع رویی که فاقد هرگونه مواد درشت موجود در محیط باشد برداشته شد و به درون یک میکروتیوپ ریخته شد و یک میلی‌لیتر TBA به آن افزوده شد، درب میکروتیوب‌ها کاملاً بسته و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شدند. سپس به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگه داشته شدند تا سرد شوند. سپس، یک میلی‌لیتر از نمونه‌ی حاصل درون کوت ریخته و غلظت MDA موجود در نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد.

داده‌های به دست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار توسط رویه‌ی GLM نرم‌افزار SAS 9.1 آنالیز شد. مدل آماری استفاده شده به شکل زیر است:

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

در مدل بالا Y_{ij} مقدار هر مشاهده، μ میانگین جامعه برای صفت مورد نظر، A_i اثر تیمار و e_{ij} اثر خطای آزمایشی هستند.

نتایج

جنبایی اسپرم و پارامترهای حرکتی

درصد جنبایی کل و پیش‌رونده و سایر پارامترهای حرکتی شامل سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده (VCL)، سرعت اسپرم در خط مستقیم (VSL)، میانگین سرعت در مسیر مستقیم (VAP)، معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد است (LIN)، معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد (STR)، متوسط زاویه‌ی چرخش بر حسب درجه (WOB)، حداکثر دامنه‌ی حرکات جانبی بر حسب میکرومتر (ALH)، متوسط زاویه‌ی چرخش بر حسب درجه (MAD)، فرکانس حرکات جانبی بر حسب هرتز (BCF)، در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد که زمان تعادل ۶ ساعت قبل از انجماد باعث افزایش معنی‌دار در درصد جنبایی پیش‌رونده (۱/۳۹±۲۵/۶) نسبت به زمان تعادل ۲ و ۴ ساعت (به ترتیب ۱/۳۹±۱۹/۲ و ۱/۳۹±۱۸/۸) شد ($P\leq$۰/۰۵). با این حال افزایش زمان تعادل جنبایی کل را تحت تأثیر قرار نداد ($P\geq$۰/۰۵). همچنین VAP، VSL و ALH نیز با تغییر زمان تعادل به طور معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵) کاهش پیدا کرد. با افزایش زمان تعادل هیچ تغییر معنی‌داری در VCL، BCF، STR، LIN مشاهده نشد ($P\geq$۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: میانگین درصد فراسنجه‌های حرکتی اسپرم بز در رقیق‌کننده‌های حاوی یک میلی‌مول گلوتاتیون و زمان‌های مختلف تعادل پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی (LSmeans ± SEM)

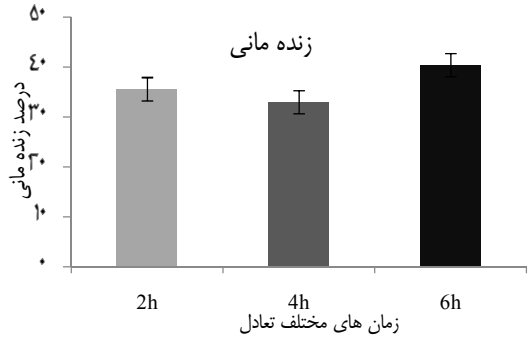
فراسنجه	زمان تعادل (ساعت)			SEM
	۲ (گروه شاهد)	۴	۶	
جنبایی کل (٪)	۳۲/۲	۳۱/۸	۳۵/۸	۲/۵۲
جنبایی پیش رونده (٪)	۱۹/۲^{b}	۱۸/۸^{b}	۲۵/۶^{a}	۱/۳۹
(µm/s) VAP	۸۴/۷^{a}	۷۵/۹۸^{ab}	۷۱/۵۸^{b}	۲/۷۷
(µm/s) VSL	۶۴/۰۸^{a}	۶۰/۵^{ab}	۵۳/۸^{b}	۲/۱۹
(µm/s) VCL	۱۵۰/۵۲	۱۳۴/۷	۱۳۲/۲۸	۴/۵۶
(µm) ALH	۷/۵۶^{a}	۶/۵^{b}	۶/۶۸^{b}	۰/۲۱
(Hz) BCF	۳۰/۲	۲۹/۳۶	۲۸/۴	۱/۱۷
(٪) STR	۷۲/۶	۷۷/۴	۷۲/۸	۱/۷۲
(٪) LIN	۴۱/۸	۴۳	۴۰/۲	۱/۴۷

a و b: میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرهمسان اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

VCL: سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده، VSL: سرعت اسپرم در خط مستقیم، VAP: میانگین سرعت در مسیر مستقیم، LIN: معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد است، STR: معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد، WOB: متوسط زاویه‌ی چرخش بر حسب درجه، ALH: حداکثر دامنه‌ی حرکات جانبی بر حسب میکرومتر، MAD: متوسط زاویه‌ی چرخش بر حسب درجه، BCF: فرکانس حرکات جانبی بر حسب هرتز، SEM: خطای استاندارد میانگین.

زنده‌مانی اسپرم

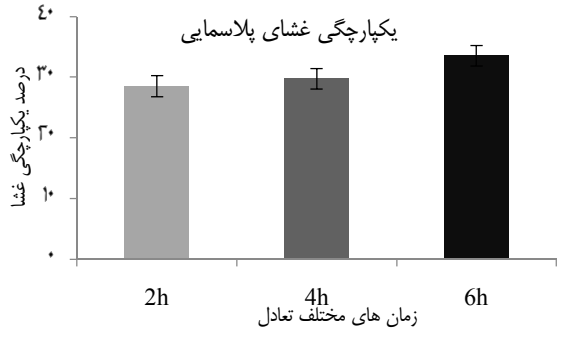
نتایج ارزیابی زنده‌مانی اسپرم در زمان‌های تعادل مختلف قبل از انجماد در نمودار ۱ آورده شده است. با افزایش زمان تعادل هیچ تغییر معنی‌داری در زنده‌مانی اسپرم مشاهده نشد (P≥۰/۰۵).



نمودار ۱: اثر زمان‌های مختلف تعادل (۲ (گروه شاهد)، ۴ و ۶ ساعت) بر زنده‌مانی اسپرم بز پس از فرایند انجماد و ذوب (Lsmeans ± SEM)

یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم

همچنین نتایج نشان می‌دهد که افزایش زمان تعادل قبل از انجماد هیچ تأثیر معنی‌داری بر یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم نداشت. نتایج در نمودار ۲ ارائه شده است (P≥۰/۰۵).



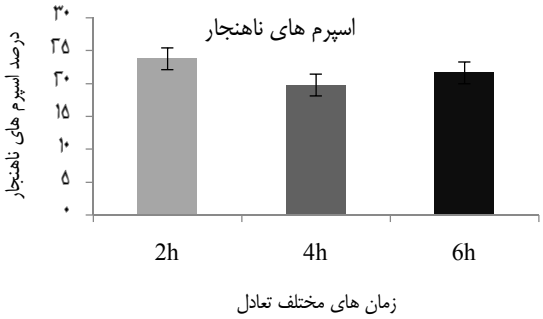
نمودار ۲: اثر زمان‌های مختلف تعادل (۲ (گروه شاهد)، ۴ و ۶ ساعت) بر یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم بز پس از فرایند انجماد و ذوب (Lsmeans ± SEM)

www.SID.ir

Archive of SID

درصد کل اسپرم‌های ناهنجار

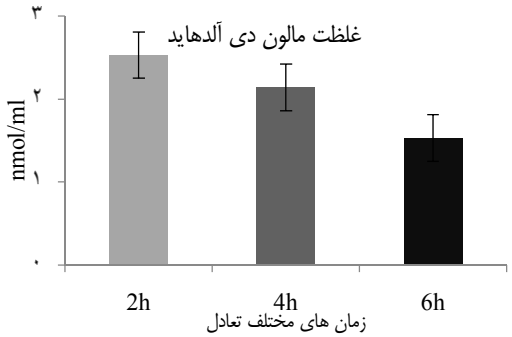
نتایج ارزیابی میانگین درصد کل اسپرم‌های ناهنجار در بین زمان‌های تعادل مختلف قبل از انجماد، تفاوت معنی-داری نشان نداد (P≥۰/۰۵) که این نتایج در نمودار ۳ نشان داده شده است.



نمودار ۳: اثر زمان‌های مختلف تعادل (۲ (گروه شاهد)، ۴ و ۶ ساعت) بر ناهنجاری‌های کل اسپرم بز پس از فرایند انجماد و ذوب (Lsmeans ± SEM)

غلظت مالون دی آلدهاید

در مورد غلظت MDA که بیان‌گر نرخ پراکسیداسیون لیپیدی است نیز هیچ تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های تعادل مختلف قبل از انجماد مشاهده نشد (P≥۰/۰۵). سطوح MDA در بین زمان‌های تعادل مختلف قبل از انجماد در نمودار ۴ ارائه شده است.



نمودار ۴: اثر زمان‌های مختلف تعادل (۲ (گروه شاهد)، ۴ و ۶ ساعت) بر میزان مالون دی آلدهاید تولیدی اسپرم بز پس از فرآیند انجماد و ذوب (Lsmeans ± SEM)

بحث

انجماد و یخ‌گشایی اسپرم پس از یک زمان تعادل منجر به آسیب‌های فیزیکی و شیمیایی گسترده‌ای به غشای اسپرم شده و باعث ایجاد تغییراتی در ساختار و عمل اسپرم می‌شود. طی فرآیند سردسازی، انجماد و ذوب، اسپرم در معرض تغییرات زیادی در محیط خود قرار می-گیرد که منجر به از دست رفتن زنده‌مانی و باروری این سلول‌ها می‌شود. افزایش زمان تعادل با کاهش یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم باعث افزایش نفوذپذیری سرما محافظ می‌شود (Shahverdi et al. 2014). علی‌رغم این که گستره‌ی زمانی متنوعی از زمان تعادل برای گونه‌های مختلف دامی گزارش شده است، بسیاری از مطالعات زمان تعادل ۲ تا ۴ ساعته را به عنوان زمان تعادل مناسب برای اسپرم قوچ و بز نر گزارش کرده‌اند (Mehdipour et al. 2016, Razliqi et al. 2015) که بسته به نوع سرما محافظ و نرخ سردسازی متفاوت است (Ahmad et al. 2015).

در این مطالعه، پارامترهای حرکتی اسپرم، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، درصد کل اسپرم‌های ناهنجار و غلظت مالون دی آلدئید برای بررسی کیفیت اسپرم بز بعد از فرآیند انجماد-ذوب مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آنالیز داده‌های این آزمایش نشان داد که زمان تعادل شش ساعت به طور معنی‌داری باعث بهبود جنبایی پیش‌رونده‌ی اسپرم شده اما تأثیر چندانی بر سایر فراسنجه‌ها نداشت.

جنبایی اسپرم یکی از مهم‌ترین خصوصیاتی است که با باروری مرتبط می‌باشد (Hirano et al. 2001). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که داده‌های جنبایی اسپرم به دست آمده از CASA می‌توانند برای پیش‌بینی باروری مورد استفاده قرار گیرند. Cox و همکاران در سال ۲۰۰۶ به بررسی ارتباط بین فراسنجه‌های حرکتی اسپرم و انتقال آن در مخاط سرویکس بز پرداخته و گزارش کردند که پارامتر-های سرعتی اسپرم به خصوص VCL و VAP کارایی

www.SID.ir

Archive of SID

حرکت اسپرم در مخاط سرویکس را تعیین می‌کنند همچنین LIN و VSL نیز می‌توانند مهم باشند اما ALH هیچ تأثیری در انتقال اسپرم در مخاط سرویکس ندارد. Hirano و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مطالعه‌ای – بر لقاح آزمایشگاهی گزارش کردند که جنبایی پیش‌رونده‌ی اسپرم به طور قابل ملاحظه‌ای با لقاح آزمایشگاهی در ارتباط است.

همچنین Lopez-Urueña و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که نرخ پایین کاهش دما باعث بهبود زنده‌مانی، جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم خرس قهوه‌ای نسبت به گروه‌های تیماری که قبل از انجماد نرخ کاهش دمایی بالاتری را تجربه کرده بودند بالاترین میزان بوده و تفاوت معنی‌داری ایجاد کرده بود که این نتایج با نتایج پژوهش حاضر همخوانی نداشت. همچنین، Fleisch و همکاران در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که افزایش زمان تعادل از ۴ به ۲۴ تا ۷۲ ساعت باعث بهبود جنبایی و زنده‌مانی اسپرم گاو شد اما این افزایش تأثیری بر افزایش باروری اسپرم-های تلقیح شده نداشت.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با افزایش زمان تعادل از دو به شش ساعت جنبایی پیش‌رونده به طور معنی‌داری افزایش یافت که این نتیجه با نتایج Camara و همکاران در سال ۲۰۱۱ که افزایش جنبایی اسپرم گوسفند در رقیق‌کننده‌ی حاوی یک میلی مول گلوتاتیون با زمان تعادل ۱۲ ساعت نسبت به زمان تعادل صفر را گزارش کرده بودند، هم‌خوانی دارد. همچنین Ahmad و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که افزایش زمان تعادل به بیش از ۴ ساعت باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز می‌شود.

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، زمان‌های مختلف تعادل هیچ تأثیر معنی‌داری در غلظت مالون دی آلدئید که نشانه‌ای از پراکسیداسیون لیپیدی است نداشتند، این نتایج با نتایج Bucak و همکاران در سال ۲۰۰۸ همخوانی دارد.

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی در این پژوهش با استفاده از آزمون هاس انجام شد. این آزمون علاوه بر این که یک آزمون کارآمد برای ارزیابی عملکرد و وضعیت ساختاری غشای پلاسمایی اسپرم است بلکه به طور قابل ملاحظه‌ای با نرخ‌های لقاح آزمایشگاهی نیز در ارتباط است (Tartaglione and Ritta 2004). در این پژوهش افزایش زمان تعادل به چهار و شش ساعت نسبت به دو ساعت باعث بهبود درصد اسپرم‌های دارای غشای یکپارچه نشد. نتایج مطالعه‌ی حاضر با پژوهش Uysal و Bucak در سال ۲۰۰۷ هم‌خوانی دارد. همچنین Camara و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای که روی اسپرم قوچ انجام دادند گزارش کردند که افزودن نیم، یک، یک ونیم و دو میلی مول گلوتاتیون هیچ تأثیر معنی‌داری بر یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم ندارد و در مطالعه‌ی آن‌ها نیز افزایش زمان تعادل به ۱۲ و ۲۴ ساعت نیز باعث بهبود یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم نشد.

بررسی نتایج ارزیابی مورفولوژی (درصد کل اسپرم-های ناهنجار) تفاوت معنی‌داری را بین زمان‌های مختلف تعادل نشان نداد. از طرف دیگر، در مطالعه‌ای که به منظور بررسی رابطه‌ی بین ارزیابی‌های آزمایشگاهی با باروری انجام شد، پژوهش‌گران گزارش کردند که ارزیابی مورفولوژی اسپرم معیار مناسبی برای پیش‌بینی نرخ باروری نیست (Tartaglione and Ritta 2004).

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت افزایش زمان تعادل قبل از انجماد اسپرم بز به شش ساعت می‌تواند جنبایی پیش‌رونده را بهبود بخشد اما تأثیر به سزایی در سایر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز ندارد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Ahmad, M.; Nasrullah, R. and Ahmad, N. (2015). Effect of cooling rate and equilibration time on pre-freeze and post-thaw survival of buck sperm. Cryobiology, 70: 233-238.

Andrabi, S.M. (2009). Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals, 44: 552-569.

Becker-Silva, S.C. and Holtz, W.H. (2008). Freezing of goat semen in AndroMed (R), a soybean lecithin based extender, Reproduction in Domestic Animals, Wiley-Blackwell Publishing, inc Commerce Place, 350 main st, malden 02148, MA USA, Pp: 72-72.

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. Molecular Reproduction and Development, 55: 282-288.

Bucak, M.N.; Ateşşahin, A. and Yüce, A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. Small Ruminant Research, 75(2), 128-134.

Câmara, D.R.; Silva, S.V.; Almeida, F.C.; Nunes, J.F. and Guerra, M.M. (2011). Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. Theriogenology, 76: 342-350.

Cox, J.F.; Alfaro, V.; Montenegro, V. and Rodriguez-Martinez, H. (2006). Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. Theriogenology, 66: 860-867.

Deka, B.C. and Rao, A.R. (1986). Effect of glycerol level in Tris-basek extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. Theriogenology, 26(2), 231-238.

Evans, G. and Maxwell, W.C. (1987). Salamons' artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, P: 194.

Fleisch, A.; Malama, E.; Witschi, U.; Leiding, C.; Siuda, M.; Janett, F. and Bollwein, H. (2017). Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen. Theriogenology, The riogenology, 89: 255-262.

Foote, R.H. and Kaprotht, M.T. (2002). Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. Journal of Dairy Science, 85: 453-456.

Forouzanfar, M.; Sharafi, M.; Hosseini, S.; Ostadhosseini, S.; Hajian, M.; Hosseini, L. et al. (2010). In vitro comparison of egg yolk–based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen. Theriogenology, 7: 480-487.

Hirano, Y.; Shibahara, H.; Obara, H.; Suzuki, T.; Takamizawa, S.; Yamaguchi, C. et al. (2001). Andrology: Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. Journal of Assisted Reproduction And Genetics, 18: 215-220.

Leite, T.G.; do Vale Filho, V.R.; de Arruda, R.P.; de Andrade, A.F.C.; Emerick, L.L.; Zaffalon, F.G. et al. (2010). Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. Animal Reproduction Science, 120: 31-38.

López-Urueña, E.; Alvarez, M.; Gomes-Alves, S.; Martínez-Rodríguez, C.; Borragan, S.; Anel-López, L. et al. (2014). Tolerance of brown bear spermatozoa to conditions of pre-freezing cooling rate and equilibration time. Theriogenology, 81: 1229-1238.

Mehdipour, M.; Daghigh Kia, H.; Najafi, A.; Vaseghi Dodaran, H. 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-based extender. Cryobiology, 73: 297-303.

Misra, H.P. and Fridovich, I. (1972). The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. Journal of Biological Chemistry, 247: 188-192.

Najafi, A.; Zhandi, M.; Towhidi, A.; Sharafi, M.; Akbari Sharif, A.; Khodaei-Motlagh, M. et al. (2013). Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. Cryobiology, 66: 282-285.

Noei Razliqi, R.N.; Zhandi, M.; Shakeri, M.; Towhidi, A.; Sharafi, M.; Emamverdi, M. and Motlagh, M.K. (2015). Protective role of glutathione in buck semen cryopreservation. Iranian Journal of Veterinary Research, 16: 298-300.

www.SID.ir

Archive of SID

O'Connell, M.; McClure, N. and Lewis, S.E.M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Human Reproduction, 17(3), 704-709.

Oberoi, B.; Kumar, S. and Talwar, P. (2014). Study of human sperm motility post cryopreservation. Medical Journal Armed Forces India, 70(4), 349-353.

Revell, S.G. and Mrode, R.A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science, 36: 77-86.

Salmani, H.; Nabi, M.M.; Vaseghi-Dodaran, H.; Rahman, M.B.; Mohammadi-Sangcheshmeh, A.; Shakeri, M. et al. (2013). Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. Small Ruminant Research, 112: 123-127.

Seifi-Jamadi, A.; Kohram, H.; Zareh-Shahne, A.; Dehghanizadeh, P. and Ahmad, E. (2016). Effect of various concentrations of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on freezing capacity of Turkman stallion sperm. Animal Reproduction Science, 170: 108-113.

Shahverdi, A.; Rastegarnia, A. and Rezaei Topraggaleh, T. (2014). Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. Cell Journal, 16: 279-288.

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. Animal Reproduction Science, 67: 69-77.

Sullivan, J. and Mixner, J. (1963). Effects of method of egg yolk addition and of glycerol equilibration time upon post-thawing motility and metabolic activity of frozen bull semen. Journal of Dairy Science, 46: 463-467.

Tartaglione, C. and Ritta, M. (2004). Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. Theriogenology, 62: 1245-1252.

Uysal, O. and Bucak, M.N. (2007). Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. Acta Veterinaria Brno, 76(3): 383-390.

Van der Westhuysen, J.M. (1978). Observations on the deep freezing of Angora goat semen. South African Journal of Animal Science, 8: 111-113.

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of different equilibration times on buck semen cryopreservation using soybean lecithin supplemented extender

Zhandi, M.[1]; Shakeri, M.[1]; Noei Razliqi, R.[2]; Towhidi, A.[3]; Emamverdi, M.[4]; Seifi-Jamadi, A.[4] and Masoumi, R.[5]

Received: 29.11.2016 Accepted: 22.04.2017

Abstract

The aim of this study was to determine the effects of different pre-freezing equilibration times (2, 4 and 6 hour) on post-thawed buck semen quality parameters using soybean lecithin supplemented extender. Semen samples were collected from four Mahabadi bucks, primarily evaluated and pooled together. Afterward, pooled semen samples were divided into three equal parts and diluted in semen extender containing soybean lecithin. After spending different equilibration times, diluted semen samples were frozen. After thawing, sperm motility characteristics, plasma membrane integrity and functionality, abnormality and lipid peroxidation were evaluated. Base on the obtained results, six hour equilibration time resulted in higher progressive motility (25.6 ± 1.39 %) compared to other groups ($P<0.05$). The other sperm quality parameters did not alter by different equilibration times. In conclusion, spending six hour equilibration time improved only sperm progressive motility.

Key words: Goat semen, Equilibration time, Cryopreservation, Soybean lecithin

1- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2- MSc Graduated of Animal Physiology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4- PhD Student of Animal Physiology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
5- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
Corresponding Author: Zhandi, M., E-mail: mzhandi@ut.ac.ir

www.SID.ir