Archive of SID

ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف گلیسرول و دمای ذوب در فرایند انجماد و ذوب اسپرم‌های اپیدیدیمی قوچ

ابراهیم احمدی[1*]، حسن نظری[1]، نجمه داودیان[1]

۱. استادیار، پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

دریافت: ۲ بهمن‌ماه ۹۶ **پذیرش:** ۲۸ آبان‌ماه ۹۷

چکیده

انجماد اسپرم اپیدیدیمی اهمیت فراوانی در برنامه‌های حفاظت از گونه‌های اهلی و وحشی در معرض خطر و نیز دام‌های نر پر ارزش در معرض حذف دارد. در مطالعه حاضر با هدف دست‌یابی به یک روش بهینه‌ی انجماد و ذوب اسپرم اپیدیدیمی گوسفند، اسپرم‌های استخراج شده از ناحیه دم اپیدیدیم بیضه‌ی قوچ‌های کشتار شده در رقیق‌کننده‌ی حاوی غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ درصد گلیسرول منجمد گردیدند و در دماهای ۳۷ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد ذوب شدند. پس از ذوب، شاخص‌های حرکتی اسپرم‌ها با دستگاه CASA سنجیده شد. داده‌ها با مدل آماری factorial ANOVA به منظور یافتن اختلاف آماری بین اثرات اصلی غلظت گلیسرول و دمای ذوب و همچنین میان‌کنش بین اثرات اصلی (غلظت گلیسرول×دمای ذوب) تحلیل آماری و به دلیل نبود یک میان‌کنش معنی‌دار، اثرات اصلی تفسیر شدند. تأثیر غلظت گلیسرول بر همه‌ی شاخص‌های حرکتی و تأثیر دمای ذوب بر اکثر این شاخص‌ها معنی‌دار بود ($P<0/05$). در بین غلظت‌های مختلف گلیسرول، کمترین تحرک مربوط به غلظت ۲ درصد و بیشترین تحرک مربوط به غلظت ۴ درصد بود ($P<0/05$). بین دو دمای مختلف ذوب، دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نسبت به دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بهبود معنی‌داری در اغلب شاخص‌های اندازه‌گیری شده، ایجاد کرده بود ($P<0/05$). انجماد اسپرم‌ها در رقیق‌کننده‌ی حاوی ۴ درصد گلیسرول و ذوب اسپرم‌های منجمد شده در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بهترین نتیجه را به دنبال داشت.

واژه‌های کلیدی: اسپرم اپیدیدیمی، غلظت گلیسرول، دمای ذوب، انجماد.

مقدمه

اسپرم اپیدیدیمی بعد از مرگ دام تا مدت قابل توجهی قابلیت باروری تخمک را دارد از این‌رو می‌توان از آن در حفاظت از نژادهای اهلی نادر و گونه‌های در معرض انقراض استفاده کرد (۱۸)؛ همچنین از اسپرم اپیدیدیمی دام‌های نر پرارزشی که دچار مرگ ناگهانی می‌شوند نیز می‌توان برای حفظ پتانسیل ژنتیکی آن‌ها استفاده کرد. به منظور حفظ قابلیت باروری، اسپرم اپیدیدیمی جمع‌آوری شده باید بلافاصله در رقیق‌کننده‌ی مناسب رقیق شود (۱۱). از این اسپرم رقیق شده می‌توان به صورت تازه یا پس از یک ذخیره سازی کوتاه مدت در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای تلقیح مصنوعی یا تولید آزمایشگاهی جنین استفاده کرد. نگه‌داری طولانی‌مدت این نمونه‌های اسپرم همانند اسپرم انزالی تنها در صورت منجمد کردن آن‌ها امکان پذیر است. اسپرم اپیدیدیمی دام‌های کشتار شده به دلیل در دسترس بودن و سهولت تهیه می‌تواند در پژوهش‌های گوناگون مرتبط با فیزیولوژی و یا کرایوبیولوژی اسپرم کار گرفته شود. از این‌رو بهبود روند انجماد اسپرم اپیدیدیمی می‌تواند به حفظ گونه‌های تحت خطر انقراض و گونه‌های با ارزش و ممتاز از لحاظ

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: eahmadi@sku.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

اقتصادی کمک زیادی کند (۳ و ۱۹). انجماد اسپرم اپیدیدیمی همچنین امکان استفاده از اسپرم دام‌های نر با میل جنسی پایین و یا دام‌های با مسیر تناسلی آسیب‌دیده را نیز فراهم می‌کند (۱۱).

در خلال بلوغ اپیدیدیمی و اضافه شدن مایع منی تغییرات قابل توجه سلولی، بیوشیمیایی و اسمزی در سلول اسپرم رخ می‌دهد (۲۱). این تغییرات شامل دگرگونی‌هایی در اجزای غشای پلاسمایی اسپرم قوچ است (۹) که در نهایت خصوصیات انجمادپذیری اسپرم را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از این‌رو به نظر می‌رسد از روش‌هایی که برای انجماد اسپرم انزالی استفاده می‌شود نمی‌توان بدون انجام تغییرات مناسب برای انجماد اسپرم اپیدیدیمی استفاده کرد. علی‌رغم افزایش طول عمر عملکردی اسپرم در دماهای پایین، کاهش دما و فرآیند انجماد دو استرس بسیار آسیب‌رسان به اسپرم محسوب می‌شوند (۱۵). این استرس‌ها به کاهش زنده‌مانی، عملکرد و قابلیت باروری سلول اسپرم منجر می‌شوند (۲۰). به منظور کاهش پیامدهای مضر انجماد، افزودن ترکیبات موسوم به ضد یخ به محلول‌های رقیق‌کننده اسپرم اهمیت فراوانی دارد (۱۵). گلیسرول با وزن مولکولی ۹۲/۱ یک ضدیخ نفوذپذیر به داخل سلول است که به صورت عمومی برای انجماد اسپرم در گونه‌های مختلف استفاده می‌شود. با این همه تعیین غلظت مناسب گلیسرول برای انجماد اسپرم به دلیل سمیت آن در غلظت‌های بالا برای اسپرم قوچ (۱۵) و عدم تأثیرگذاری مناسب در غلظت‌های پایین اهمیت فراوانی دارد.

در روند انجماد و ذوب، مرحله‌ی گرم کردن نیز به اندازه مرحله سرد کردن نمونه، برای بقای سلول اسپرم اهمیت دارد. اسپرم‌هایی که پس از سرد شدن تا دمای ۱۹۶- درجه‌ی سانتی‌گراد زنده مانده‌اند، با چالش گرم شدن و ذوب مواجه هستند و باید مجدداً فاصله دمایی بحرانی ۶۰- تا ۱۵- درجه‌ی سانتی‌گراد را طی کنند. مشخص شده است که هم سرعت سرد شدن و هم سرعت ذوب می‌تواند بقای اسپرم‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. عقیده‌ی کلی در این زمینه این است که سرعت ذوب باید به حدی باشد که از تشکیل کریستال‌های یخ آسیب زننده به ساختارهای سلولی جلوگیری شود و همچنین متناسب با سرعت انجماد و تغلیظ نمک‌های داخل سلولی، اجازه آب‌گیری مجدد مناسب اسپرم و جلوگیری از آسیب اسمزی را بدهد (۷). تنظیم سرعت ذوب با تغییر دمای آبی که نی‌های اسپرم منجمد در آن ذوب می‌شود امکان‌پذیر است. دمای ذوب بین ۱۵ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای ذوب اسپرم‌های منجمد گونه‌های مختلف پستانداران مورد آزمایش قرار گرفته است که معمول‌ترین دما ذوب در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد است؛ لیکن بهبود کلی در میزان تحرک اسپرم‌ها پس از ذوب در دماهای بالاتر و زمان‌های کوتاه‌تر مشاهده است (۱۵).

با توجه به اهمیت انجماد اسپرم در صنعت دامپروری و اصلاح نژاد دام‌ها و همچنین اهمیت انجماد اسپرم اپیدیدیمی در حفاظت از گونه‌های در معرض خطر، حراست از نژادهای کمیاب دام و حفظ پتانسیل دام‌های نر پرارزش و نیز حفاظت از تنوع ژنتیکی دام‌های اهلی، هدف از مطالعه‌ی حاضر مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف گلیسرول و نیز تأثیر دو دمای مختلف ذوب بر نتایج انجماد اسپرم اپیدیدیمی گوسفند به منظور دست‌یابی به پروتکل بهینه‌ی انجماد و ذوب این نوع اسپرم بود.

مواد و روش کار

بیضه‌های ۳ قوچ بالغ کشتارشده در کشتارگاه صنعتی شهر جونقان (شهرستان فارسان، چهارمحال و بختیاری) در دمای محیط در مدت زمان حداکثر یک ساعت پس از کشتار به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه پس از کنار زدن غشای تونیکا واژینالیس با تیغ اسکالپل روی نواحی عاری از عروق دم اپیدیدیم یک برش ایجاد شد و سوسپانسیون اسپرم خارج شونده از این برش به محلول پایه انجماد (۳۰۰ میلی‌مول تریس، ۹۴/۷ میلی‌مول

www.SID.ir

Archive of SID

اسید سیتریک و ۲۷/۸ میلی مول گلوکز، PH حدود ۶/۸-۶/۹ و اسمولالیته حدود ۳۴۵-۳۵۰ میلی‌اسمول) حاوی ۲۰ درصد زرده‌ی تخم‌مرغ منتقل و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگه‌داری شد، سپس تحرک اسپرم‌ها به کمک سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (CASA) ارزیابی شد و در صورت مناسب بودن تحرک کلی (بیش از ۶۰ درصد)، به منظور کاهش اثر فردی بر نتیجه انجماد، نمونه اسپرم اپیدیدیمی استخراج شده از سه بیضه مختلف با هم مخلوط و پس از شمارش در فرآیند انجماد استفاده شد.

برای انجماد اسپرم‌ها، ۳ رقیق کننده‌ی مختلف با افزودن غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ گلیسرول به محیط پایه‌ی انجماد حاوی ۲۰ درصد زرده‌ی تخم‌مرغ آماده شد. سوسپانسیون اسپرم با غلظت ۵×۱۰^{۷} سلول اسپرم در هر میلی‌لیتر به رقیق‌کننده‌های آماده شده اضافه گردید؛ سپس سوسپانسیون به دست آمده در نی‌های انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شد و انتهای نی‌ها با پودر PVA مسدود گردید و پس از قرار دادن آن‌ها در کیسه نایلونی در ظرف حاوی آب در یخچال قرار داده شدند، پس از سپری شدن ۳ ساعت نی‌ها به فاصله ۳ سانتی‌متر از سطح ازت مایع به مدت ۱۰ دقیقه در بخار ازت قرار داده شد و سپس مستقیما در ازت مایع فرو برده شدند. ذوب نی‌های اسپرم منجمد شده حداقل ۱ هفته پس از انجماد و در دمای ۳۷ و ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. برای ذوب در دمای نخست، نی‌ها بلافاصله پس از خروج از ازت مایع در ظرف حاوی آب ۳۷ درجه به مدت ۲۰ ثانیه فرو برده شدند و پس از خشک کردن و بریدن دو انتهای آن‌ها، محتویات آن‌ها در یک میکروتیوب تخلیه شد. برای ذوب در دمای دوم، نی‌ها بلافاصله پس از خروج از ازت مایع در ظرف حاوی آب ۶۵ درجه به مدت ۶ ثانیه فرو برده شدند و سپس به سرعت خارج گردیدند و در ادامه همانند دمای اول عمل شد. در این آزمایش در هر تکرار برای هر غلظت گلیسرول ۴ نی آماده و منجمد شد (برای هر دمای ذوب ۲ نی در نظر گرفته شده بود). هر کدام از این نی‌های منجمد شده به صورت جداگانه ذوب شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند. میانگین نتایج حاصل از این دو ارزیابی به عنوان نتیجه‌ی هر تکرار در نظر گرفته شد.

بررسی تحرک اسپرم‌ها پیش از انجماد و پس از ذوب با سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (CASA، ساخت شرکت هوشمند فن‌آور، ایران) انجام شد. بدین‌منظور ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم روی لام گرم شده آنالیز تحرک اسپرم (Spermmeter، ساخت شرکت Sperm Processor Pvt Ltd، هندوستان) قرار داده شده و لامل مخصوص روی آن قرار داده شد. این لام با داشتن پایه‌های مخصوص، فاصله ۱۰ میکرومتری بین لام و لامل ایجاد می‌کند. برای هر نمونه، ۶ محدوده دید و با سرعت ۲۰ فریم در ثانیه در زیر میکروسکوپ (با بزرگ‌نمایی ۴×) بررسی شد. شاخص‌های حرکتی به دست آمده با سیستم CASA به شرح ذیل بود: حرکت کلی (TM، ٪)، حرکت پیش‌رونده (PM، ٪)، سرعت خطی- منحنی (VCL، µm/s)، سرعت خطی (VSL، µm/s)، سرعت مسیر متوسط (VAP، µm/s)، متوسط جابجایی زاویه‌ای (MAD، درجه)، متوسط شدت جابجایی جانبی سر (ALH، µm)، فرکانس جابجایی سر (BCF، هرتز)، ضریب خطی بودن (LIN، ٪)، ضریب جنبش (WOB، ٪) و ضریب مستقیم بودن (STR، ٪).

آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ انجام شد. داده‌های نسبی ابتدا با تبدیل آرکسینوسی نرمال و سپس تحلیل شدند. داده‌ها با مدل آماری factorial ANOVA به منظور یافتن اختلاف آماری بین اثرات اصلی (main effects) غلظت گلیسرول و دمای ذوب و همچنین میان‌کنش بین اثرات اصلی (غلظت گلیسرول×دمای ذوب) تحلیل آماری شدند و اثرات اصلی به دلیل نبود یک میان‌کنش معنی‌دار تفسیر گردیدند. اثر اصلی غلظت گلیسرول میانگین نتایج حاصل از انجماد اسپرم در غلظت‌های ۲ و ۴ درصد گلیسرول بدون در نظر گرفتن دمای ذوب بود (مثلا میانگین نتایج غلظت ۲

www.SID.ir

Archive of SID

درصد ذوب شده در دمای ۳۹ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد). اثر اصلی دمای ذوب نتایج حاص از ذوب اسپرم‌ها در دماهای ۳۹ و ۶۵ درجه بدون در نظر گرفتن غلظت گلیسرول بود (مثلاً میانگین غلظت ۲ و ۴ درصد در دمای ۳۹ ذوب درجه). مقایسه میانگین بین گروه‌های آزمایشی با روش آماری one-way ANOVA و تست تکمیلی توکی ارزیابی شد. داده‌ها به صورت mean±SEM گزارش شدند.

نتایج

نتایج تحرک کلی و تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی در جدول ۱ و نتایج شاخص‌های کینماتیک در جدول ۲ درج شده‌است.

همان‌گونه که مشاهده می‌شود تأثیر غلظت گلیسرول بر همه‌ی شاخص‌ها و تأثیر دمای ذوب بر اکثر شاخص‌ها معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$)؛ لیکن میان‌کنش بین اثرات اصلی معنی‌دار نبود. بین غلظت‌های مختلف گلیسرول، کمترین تحرک مربوط به غلظت ۲ درصد و بیشترین تحرک مربوط به غلظت ۴ درصد بود. بین دو دمای مختلف ذوب، دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نسبت به دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بهبود معنی‌داری در اغلب شاخص‌های اندازه‌گیری شده، ایجاد کرده بود ($P<۰/۰۵$). انجماد اسپرم‌ها در رقیق‌کننده‌ی حاوی ۴ درصد گلیسرول و ذوب اسپرم‌های منجمد شده در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بهترین نتیجه را به دنبال داشت.

جدول ۱- میانگین ± SEM شاخص‌های تحرک کلی و حرکت پیش‌رونده‌ی اسپرم‌های منجمد شده پس از ذوب در رقیق‌کننده‌های حاوی غلظت‌های مختلف گلیسرول و ذوب شده در دو دمای مختلف

گروه‌ها		حرکت کلی (درصد)	حرکت پیش‌رونده (درصد)
غلظت (درصد)	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)		
۲	۳۹	۲۴/۹±۲/۹۰^{a}	۱۳/۰±۱/۸۱^{a}
۲	۶۵	۳۱/۲±۲/۵۹^{ac}	۱۹/۲±۱/۷۷^{ac}
۴	۳۹	۳۵/۸±۴/۲۲^{bcd}	۲۳/۵±۳/۱۵^{bc}
۴	۶۵	۴۳/۴±۴/۴۲^{b}	۲۸/۷±۳/۲۶^{b}
۶	۳۹	۳۰/۳±۲/۵۵^{ad}	۲۰/۲±۲/۲۷^{acd}
۶	۶۵	۳۹/۹±۲/۹۵^{bc}	۲۶/۷±۲/۹۱^{bd}
۲†		۲۸/۱±۲/۰۵^{A}	۱۶/۱±۱/۳۶^{A}
۴†		۳۹/۶±۳/۷۰^{B}	۲۶/۱±۲/۵۴^{B}
۶†		۳۵/۱±۲/۲۹^{AB}	۲۳/۵±۱/۸۳^{AB}
	۳۹‡	۳۰/۳±۱/۶۸$^{\times}$	۱۸/۹±۱/۳۲$^{\times}$
	۶۵‡	۳۸/۲±۱/۶۶	۲۴/۹±۱/۴۶
	P-value		
	غلظت	۰/۰۰۵۶	۰/۰۰۱۳
	دمای ذوب	۰/۰۰۶۸	۰/۰۰۸۱
	غلظت ×دمای ذوب	۰/۸۸۷۵	۰/۹۶۸۸

$^{a-d}$ در هر ستون جدول نمایانگر اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های غلظت گلیسرول ذوب شده در دماهای مختلف است. ^{AB} در هر ستون جدول نمایانگر اختلاف آماری معنی‌دار بین اثرات اصلی غلظت گلیسرول است. $^{\times}$ در هر ستون جدول نمایانگر اختلاف آماری معنی‌دار بین اثرات اصلی دمای ذوب است. † میانگین شاخص‌ها در غلظت گلیسرول بدون توجه به دمای ذوب (اثرات اصلی غلظت گلیسرول). ‡ میانگین شاخص‌ها در هر دمای ذوب بدون توجه به غلظت گلیسرول (اثرات اصلی دمای ذوب).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- میانگین ± SEM شاخص‌های کینماتیک اسپرم‌های منجمد شده پس از ذوب در رقیق‌کننده‌های حاوی غلظت‌های مختلف گلیسرول و ذوب شده در دو دمای مختلف

گروه‌ها										
غلظت (درصد)	دمای ذوب	VCL	VSL	VAP	MAD	ALH	BCF	LIN	WOB	STR
۲	۳۹	۳۱/۸±۳/۷۱^{a}	۷/۰±۰/۹۳^{a}	۱۲/۸±۱/۴۳^{a}	۷/۱±۱/۰۹^{a}	۲/۷±۰/۱۳^{a}	۰/۶±۰/۱۲^{a}	۱۷/۰±۱/۵۰^{a}	۳۷/۰±۱/۳۷^{a}	۴۱/۷±۲/۴۸^{a}
۲	۶۵	۳۹/۲±۳/۸۳^{ac}	۱۰/۲±۱/۱۹^{ab}	۱۷/۳±۱/۶۳^{ab}	۱۱/۳±۱/۶۳^{ab}	۳/۰±۰/۱۳^{ab}	۱/۰±۰/۱۴^{ab}	۱۸/۱±۰/۹۴^{ac}	۳۸/۲±۰/۹۹^{ac}	۴۲/۶±۱/۵۳^{ac}
۴	۳۹	۴۰/۴±۱۱/۳^{ac}	۱۳/۴±۱/۸۸^{bd}	۲۰/۲±۲/۱۹^{bd}	۱۱/۲±۱/۴۰^{ab}	۳/۱±۰/۱۴^{bc}	۱/۱±۰/۱۹^{bd}	۲۲/۰±۱/۷۱^{ab}	۴۲/۳±۱/۴۳^{bc}	۴۶/۷±۲/۵۵^{acd}
۴	۶۵	۵۱/۳±۴/۴۴^{b}	۱۸/۵±۲/۴۴^{c}	۲۶/۵±۲/۹۱^{c}	۱۵/۱±۱/۹۹^{b}	۳/۴±۰/۱۸^{b}	۱/۷±۰/۱۹^{c}	۲۴/۰±۱/۸۱^{b}	۴۲/۷±۲/۴۱^{bc}	۴۹/۹±۲/۲۱^{bd}
۶	۳۹	۳۵/۱±۲/۹۳^{a}	۱۰/۶±۱/۲۶^{ab}	۱۶/۷±۱/۶۱^{ab}	۸/۲±۱/۰۳^{a}	۲/۹±۰/۰۷^{ac}	۰/۹±۰/۱۴^{ad}	۲۱/۹±۲/۰۸^{ab}	۴۲/۲±۱/۷۴^{bc}	۴۷/۴±۲/۹۳^{ab}
۶	۶۵	۴۷/۴±۲/۶۱^{bc}	۱۵/۹±۲/۰۰^{cd}	۲۳/۳±۲/۰۱^{cd}	۱۲/۹±۱/۵۷^{b}	۳/۲±۰/۱۲^{bc}	۱/۴±۰/۱۹^{bc}	۲۲/۳±۲/۲۰^{bc}	۴۱/۳±۱/۸۸^{ab}	۴۸/۸±۲/۷۷^{bc}
۲†		۳۵/۵±۲/۴۱^{A}	۸/۶±۰/۷۶^{A}	۱۵/۰±۱/۰۷^{A}	۹/۲±۰/۹۰	۲/۹±۰/۱۰	۰/۸±۰/۰۹^{A}	۱۷/۶±۰/۷۷^{A}	۳۷/۶±۰/۵۷^{A}	۴۲/۱±۱/۶۱
۴†		۴۵/۹±۳/۵۰^{B}	۱۶/۰±۱/۶۴^{B}	۲۳/۴±۱/۹۹^{B}	۱۳/۱±۱/۵۱	۳/۲±۰/۱۵	۱/۴±۰/۱۷^{B}	۲۳/۰±۱/۲۹^{B}	۴۲/۵±۱/۲۲^{B}	۴۸/۳±۲/۱۲
۶†		۴۱/۲±۲/۵۳^{AB}	۱۳/۲±۱/۳۸^{AB}	۲۰/۰±۱/۶۰^{AB}	۱۰/۶±۱/۱۶	۳/۱±۰/۰۹	۱/۱±۰/۱۵^{AB}	۲۲/۰±۱/۰۵^{B}	۴۱/۸±۱/۰۱^{B}	۴۸/۱±۱/۶۲
	۳۹‡	۳۵/۸±۲/۲۵$^{\times}$	۱۰/۳±۰/۸۶$^{\times}$	۱۶/۶±۱/۰۶$^{\times}$	۸/۸±۰/۸۶$^{\times}$	۲/۹±۰/۰۸$^{\times}$	۰/۹±۰/۱۱$^{\times}$	۲۰/۳±۰/۸۴	۴۰/۵±۰/۸۴	۴۵/۲±۱/۱۷
	۶۵‡	۴۶/۰±۱/۹۳	۱۴/۹±۱/۴۵	۲۲/۴±۱/۶۱	۱۳/۱±۱/۰۷	۳/۲±۰/۰۹	۱/۳±۰/۱۲	۲۱/۵±۱/۲۲	۴۰/۷±۱/۲۴	۴۷/۱±۱/۴۶
P-value										
ضدیخ	۰/۰۱۹۴	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۹	۰/۰۳۹۵	۰/۰۳۷۲	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۸۷	۰/۰۱۳۳	۰/۰۲۵۲	
دمای ذوب	۰/۰۰۱۰	۰/۰۰۲۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۵۹	۰/۰۰۱۵	۰/۴۲۱۵	۰/۸۷۷۳	۰/۳۵۱۶	
ضدیخ ×دمای ذوب	۰/۷۷۸۶	۰/۸۰۴۶	۰/۸۵۴۹	۰/۹۶۴۰	۰/۹۱۵۱	۰/۸۲۱۹	۰/۸۹۳۰	۰/۸۲۰۹	۰/۸۹۱۴	

$^{a-d}$ در هر ستون جدول نمایانگر اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های غلظت گلیسرول ذوب شده در دماهای مختلف است.

^{AB} در هر ستون جدول نمایانگر اختلاف آماری معنی‌دار بین اثرات اصلی غلظت گلیسرول است.

$^{\times}$ در هر ستون جدول نمایانگر اختلاف آماری معنی‌دار بین اثرات اصلی دمای ذوب است

† میانگین شاخص‌ها در غلظت گلیسرول بدون توجه به دمای ذوب (اثرات اصلی غلظت گلیسرول).

‡ میانگین شاخص‌ها در هر دمای ذوب بدون توجه به غلظت گلیسرول (اثرات اصلی دمای ذوب).

VCL: سرعت خطی-منحنی (µm/s)؛ VSL: سرعت خطی (µm/s)؛ VAP: سرعت مسیر متوسط (µm/s)؛ MAD: متوسط جابجایی زاویه‌ای (درجه)؛ ALH: متوسط شدت جابجایی جانبی سر (µm)؛ BCF: فرکانس جابجایی سر (هرتز)؛ LIN: ضریب خطی بودن (٪)؛ WOB: ضریب جنبش (٪) و STR: ضریب مستقیم بودن (٪).

بحث

با توجه به اهمیت و کاربرد انجماد اسپرم اپیدیدیمی در حفاظت از گونه‌ها و نژادهای دامی در معرض خطر انقراض و نیز حفظ پتانسیل ژنتیکی دام‌های نر پرارزش (۱۰)، هدف از مطالعه‌ی حاضر بهبود روش‌های انجماد این نوع اسپرم در گوسفند بود. در این زمینه تعیین بهترین غلظت ضد یخ گلیسرول در رقیق‌کننده و نیز بهترین دمای ذوب اسپرم‌ها به عنوان متغیرهای این مطالعه مشخص شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در شرایط مطالعه‌ی حاضر، غلظت ۴ درصد گلیسرول در رقیق‌کننده بهترین

www.SID.ir

Archive of SID

عملکرد را در حفظ قابلیت حرکتی اسپرم‌ها پس از ذوب دارد؛ همچنین ذوب اسپرم‌های منجمد شده اپیدیدیمی گوسفند در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به صورت معنی‌داری بر حفظ قابلیت حرکتی اسپرم‌های منجمد شده نسبت به ذوب در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد مؤثرتر است.

امروزه روش‌های معمول انجماد ارگانیسم‌های زنده به منظور ذخیره‌ی طولانی مدت آن‌ها وابسته به استفاده از ترکیبات ضد یخ است. مکانیسم عملکرد این ترکیبات در محافظت از سلول‌ها در دماهای پایین هنوز به درستی مشخص نشده است؛ لیکن گمان می‌رود این ترکیبات با جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی آسیب‌زننده به ساختارهای سلولی، جلوگیری از تغلیظ نمک‌ها در داخل سلول به دلیل انجماد پیش‌رونده‌ی بخش آبی محلول و غیرمنجمد ماندن بخش غیرآبی و نیز جلوگیری از دهیدراته شدن پیشرونده‌ی ماکرمولکول‌ها و در نتیجه از دست رفتن ساختار و عملکرد آن‌ها در روند انجماد و ذوب سلول‌ها از سلول در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد محافظت می‌کنند (۵). با وجود ضرورت حضور ضد یخ‌ها در محلول‌های انجماد اسپرم، این ترکیبات منشا برخی مشکلات برای اسپرم هستند به‌طور مثال نشان داده شده است که سمیت گلیسرول به عنوان معمول‌ترین ضد یخ مورد استفاده در انجماد اسپرم خصوصاً در غلظت‌های بالا سبب کاهش زنده‌مانی و قابلیت باروری اسپرم در دوره پس از ذوب می‌شود (۲، ۱۶)؛ همچنین گلیسرول به دلیل وزن مولکولی نسبتاً بالا و به تبع آن سرعت نفوذ کم در غشای سلول سبب ایجاد سمیت اسمزی در زمان ذوب می‌شود (۸).

به دلیل تفاوت عملکرد و ترکیب غشای سیتوپلاسمی در اسپرم‌های انزالی و اسپرم‌های اپیدیدیمی، به نظر می‌رسد استفاده از پروتکل‌های انجماد اسپرم انزالی برای اسپرم اپیدیدیمی بدون ایجاد تغییرات مناسب در این‌روش‌ها، نتایج مناسبی به دنبال نداشته باشد (۱). در پروتکل‌های معمول انجماد اسپرم انزالی قوچ که نگارندگان نیز از آن‌ها استفاده می‌کنند گلیسرول به میزان ۶ تا ۸ درصد به رقیق‌کننده‌ی نهایی انجماد افزوده می‌شود (۱۳) و کاهش غلظت آن در رقیق‌کننده معمولا کاهش میزان زنده‌مانی و تحرک پس از ذوب اسپرم را به دنبال دارد (داده‌های منتشر نشده). نتایج مطالعه‌ی حاضر با نتایج مطالعه‌ی Alvarez و همکاران در سال ۲۰۱۲ که در آن غلظت ۸ درصد گلیسرول نسبت به غلظت ۴ درصد آن عملکرد بهتری در انجماد اسپرم اپیدیدیمی قوچ داشت، متناقض است (۱)، این تفاوت احتمالاً می‌تواند به تفاوت روش سرد کردن و انجماد اسپرم در مطالعه مذکور و مطالعه حاضر مربوط باشد. در مطالعه‌ی Alvarez و همکاران از فریزر قابل برنامه‌ریزی و در مطالعه‌ی حاضر از قرار دادن نمونه روی بخار ازت استفاده شده است. نشان داده شده است سرعت بهینه‌ی سرد کردن نمونه‌ی اسپرم منجمد شونده در زمان انجماد تا حد زیادی وابسته به غلظت گلیسرول در رقیق کننده است و با افزایش غلظت گلیسرول باید سرعت سرد کردن برای دستیابی به بقای بهتر پس از ذوب کاهش یابد (۶). از این‌رو تفاوت دیده شده احتمالا به دلیل اختلاف سرعت سرد کردن نمونه‌ی اسپرم در دو مطالعه باشد.

همان‌گونه که ذکر شد بقای اسپرم‌ها و به صورت کلی سلول‌ها پس از فرایند انجماد و ذوب، وابسته به سرعت بهینه‌ی سرد شدن و انجماد از یک‌سو و سرعت گرم شدن و ذوب از سوی دیگر است. به صورت نظری گفته می‌شود که سرعت بهینه‌ی گرم شدن وابسته به سرعت سرد شدن است؛ بدین صورت که آیا سرعت سرعت سرد شدن به حدی بالا بوده است که سبب انجماد سریع داخل سلولی شده است یا به حدی پایین بوده است که سبب دهیدراته شدن سلول شده است؟ در مورد سرعت بالای سرد شدن، اعتقاد بر این است که سرعت گرم شدن و ذوب باید به حدی بالا باشد که اجازه کریستاله شدن مجدد آب داخل سلولی و تشکیل بلورهای یخ آسیب‌زننده به ساختارهای

www.SID.ir

Archive of SID

سلولی را بهویژه در زمان عبور از دماهای بحرانی ۶۰- تا ۱۵- را ندهد، همچنین در مورد سرعت کم سرد شدن، گفته می‌شود که سرعت گرم شدن باید به حدی باشد که از ورود سریع آب تحت تأثیر اختلاف فشار اسمزی پدید آمده در اثر کندتر بودن سرعت خروج ضد یخ از سلول نسبت به سرعت ورود آب به داخل سلول را ندهد (۱۵)؛ لیکن در مطالعات انجام شده در مورد ذوب منی منجمد شده در گونه‌های مختلف با روش‌ها و سرعت‌های مختلف سرد کرن و انجماد، همانند مطالعه حاضر ذوب در دماهای بالاتر و زمان‌های کوتاه‌تر (برای جلوگیری از گرم شدن بیش از حد منی ذوب شده و ایجاد شوک حرارتی) به بقا و تحرک پس از ذوب بهتر و نیز میزان باروری بالاتر اسپرم‌ها منجر شده است (۴، ۱۲، ۱۴و ۱۷)؛ لذا به نظر می‌رسد اهمیت ممانعت از تشکیل و رشد کریستال‌های یخ در زمان ذوب، جلوگیری از آسیب اسمزی بیشتر است.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت انجماد اسپرم اپیدیدیمی گوسفند در رقیق‌کننده حاوی ۴ درصد گلیسرول و ذوب در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نتایج مطلوبی دارد و می‌تواند به عنوان یک روش استاندارد برای انجماد اسپرم اپیدیدیمی گوسفند به کار رود.

منابع

1- Alvarez, M; Tamayo-Canul, J; Martinez-Rodriguez, C; Lopez-Uruena, E; Gomes-Alves, S; Anel, L; Martinez-Pastor, F. and de Paz, P; Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). Anim. Reprod. Sci; 2012; 132(3-4): 145-154.

2- Bedford, S. J; Jasko, D. J; Graham, J. K; Amann, R. P; Squires, E. L. and Pickett, B. W; Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. Theriogenology; 1995; 43(5): 955-967.

3- Benhenia, K; Lamara, A; Fatmi, S. and Iguer-Ouada, M; Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. Small Ruminant Res.; 2016; 141(Supplement C): 29-35.

4- Cochran, J. D; Amann, R. P; Froman, D. P. and Pickett, B. W; Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. Theriogenology; 1984; 22(1): 25-38.

5- Elliott, G. D; Wang, S. and Fuller, B. J; Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. Cryobiology; 2017; 76: 74-91.

6- Fiser, P. S. and Fairfull, R. W; The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. Cryobiology; 1984; 21(5): 542-551.

7- Fiser, P. S; Fairfull, R. W; Hansen, C; Panich, P. L; Shrestha, J. N. and Underhill, L; The effect of warming velocity on motility and acrosomal

www.SID.ir

Archive of SID

DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. Anim Reprod Sci; 2017; 177: 35-41.

14- Paulenz, H; Söderquist, L; Ådnøy, T; Nordstoga, A; Gulbrandsen, B. and Berg, K. A; Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. Theriogenology; 2004; 61(9): 1719-1727.

15- Salamon, S. and Maxwell, W. M; Storage of ram semen. Anim Reprod Sci; 2000; 62(1-3): 77-111.

16- Slavik, T; Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. J. Reprod. Fertil; 1987; 79(1): 99-103.

17- Söderquist, L; Madrid-Bury, N. and Rodriguez-Martinez, H; Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. Theriogenology; 1997; 48(7): 1115-1125.

18- Tamayo-Canul, J; Alvarez, M; Mata-Campuzano, M; Alvarez-Rodriguez, M; de Paz, P; Anel, L. and Martinez-Pastor, F; Effect of storage method and extender osmolality in the quality of cryopreserved epididymal ram spermatozoa. Anim. Reprod. Sci.; 2011; 129 (3-4): 188-199.

integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. Mol Reprod Dev; 1993; 34(2): 190-195.

8- Gao, D. Y; Liu, J; Liu, C; McGann, L. E; Watson, P. F; Kleinhans, F.W; Mazur, P; Critser, E. S. and Critser, J. K; Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. Hum Reprod; 1995; 10(5): 1109-1122.

9- Hammerstedt, R. H. and Parks, J. E; Changes in sperm surfaces associated with epididymal transit. J. Reprod. Fertil. Suppl; 1987; 34: 133-149.

10- Kaabi, M; Paz, P; Alvarez, M; Anel, E; Boixo, J. C; Rouissi, H; Herraez, P. and Anel, L; Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. Theriogenology; 2003; 60(7): 1249-1259.

11- Lone, F. A; Islam, R; Khan, M. Z. and Sofi, K. A; Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. Anim Reprod Sci; 2011; 123(1-2): 54-59.

12- Lyashenko, A; Effect of different thawing procedures on the quality and fertility of the bull spermatozoa. Asian Pac. J. Reprod.; 2015; 4(1): 17-21.

13- Najafi, A; Daghigh-Kia, H; Dodaran, H. V; Mehdipour, M. and Alvarez-Rodriguez, M; Ethylene glycol, but not

www.SID.ir

Archive of SID

19- Tamayo-Canul, J; Alvarez, M; Mata-Campuzano, M; Alvarez-Rodriguez, M; de Paz, P; Anel, L. and Martinez-Pastor, F; Effect of storage method and extender osmolality in the quality of cryopreserved epididymal ram spermatozoa. Anim Reprod Sci; 2011; 129(3-4): 188-199.

20- Watson, P. F; The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci; 2000; 60-61: 481-492.

21- Yeung, C. H; Barfield, J. P. and Cooper, T. G; Physiological volume regulation by spermatozoa. Mol Cell Endocrinol; 2006; 250(1-2): 98-105.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluating the effects of different concentrations of glycerol and thawing temperatures in the process of ram epididymal spermatozoa cryopreservation

Ahmadi, E[1*]; Nazari, H.[1], Davoodian N.[1]

1. Assistant Professor, Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Received: 22 January 2018 ***Accepted:*** 18 November 2018

Summary

Cryopreservation of epididymal spermatozoa has an important role in the conservation programs of endangered domestic and wild animal species, as well as, maintaining the genetic potential of suddenly dead valuable males. The aim of the present study was the setting up an optimum protocol for the cryopreservation of ram epididymal spermatozoa. Spermatozoa extracted from the cauda epididymis of slaughtered rams were frozen in the extenders containing 2, 4 and 6 percent glycerol and were thawed at 37 and 65˚C. Post-thawing motility parameters were evaluated by CASA. The factorial ANOVA model were used to determine the statistical differences between the main effects of the glycerol concentrations, thawing temperatures and their interactions (concentration×temperature). Because a non-significant interaction was detected, the main effects (concentration and temperature) were interpreted. The effect of glycerol concentration on the all motility parameters and the effect of thawing temperature on the majority of motility parameters were significant ($P<0.05$). Among the glycerol concentrations, 2% had the lowest motility and 4% had the highest motility ($P<0.05$). Among the thawing temperatures, thawing at 65˚C led to significantly better post-thawing motility than thawing at 37˚C ($P<0.05$). Finally, freezing ram epididymal spermatozoa in an extender containing 4 percent glycerol and thawing the frozen spermatozoa at 65˚C had the best outcome.

Keywords: Epididymal spermatozoa, Glycerol concentration, Thawing temperature, Cryopreservation.

* Corresponding author E-mail: eahmadi@sku.ac.ir

www.SID.ir