علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۴ (ص ۴۶۳-۴۵۷)

تأثیر غلظت‌های مختلف ژل رویال در رقیق‌کننده بر برخی از فراسنجه‌های کیفی و کمی اسپرم بز مهابادی

طاهره محمدیان[۱]، مهدی خدایی مطلق[۲*] و احمد زارع شحنه[۳]
۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم دامی دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اراک
۳. استاد، گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۲۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۸/۲۲)

چکیده

هدف از این پژوهش، مقایسهٔ اثر افزودن غلظت‌های متفاوت ژل رویال به رقیق‌کنندهٔ منی، بر ویژگی‌های حیاتی اسپرم بز پس از انجماد بود. هفته‌ای دو بار از چهار بز نر بالغ با استفاده از مهبل مصنوعی اسپرم‌گیری شد و سپس نمونه‌های مناسب با هم مخلوط شدند. نمونه‌های اسپرم در چهار گروه دارای ژل رویال با غلظت (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد) و در شش تکرار در معرض بخار ازت منجمد و در تانک ازت نگهداری شدند. نمونه‌های اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی از نظر جنبایی، درصد زنده‌مانی و یکپارچگی غشا بررسی شدند. میانگین جنبایی کل و زنده‌مانی در غلظت ۱ درصد ژل رویال از گروه شاهد و سایر گروه‌های تیماری بیشتر بود (P<۰/۰۵). تفاوت معناداری از نظر درصد خطی‌بودن جنبایی اسپرم (LIN) و یکپارچگی غشای پلاسمایی بین گروه‌های تیماری با گروه شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵). کاهش معناداری در سایر فراسنجه‌های سرعت در محیط‌های دارای ژل رویال با گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). بنابراین استفاده از ژل رویال در رقیق‌کنندهٔ منی بز سبب بهبود برخی فراسنجه‌های اسپرم پس از فرایند انجماد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسپرم بز، انجماد-یخ‌گشایی، رقیق‌کننده، ژل رویال.

مقدمه

حفظ انجمادی اسپرم ابزار مفیدی برای مطالعات جنین‌شناسی آزمایشگاهی و تلقیح مصنوعی است که بخش اساسی و ضروری در فناوری‌های تولیدمثل به حساب می‌آید. از دانش حفظ انجمادی اسپرم در تولیدمثل برای انتخاب جنس نر با ژن‌های برتر و توزیع ژن‌های برتر در گله‌ها، بدون در نظر گرفتن محدودیت زمانی و مکانی، حفظ گونه‌های در حال انقراض و مطالعات روی فعالیت اسپرم و تأثیرات متقابل آن‌ها با گامت می‌توان استفاده کرد. در مراحل حفاظت از انجماد سلول اسپرم، عوامل کلیدی زیادی مثل ترکیب پلاسمای منی، ترکیب شیمیایی رقیق‌کننده‌ها، نوع و غلظت حفاظت‌کننده‌های انجمادی، دمای نگهداری، سطح سردسازی، دورهٔ تعادل، روش انجماد و یخ‌گشایی، گروه‌های واکنش اکسیژنی و کنترل بهداشت بر عمر سلول اسپرم اثر دارد و برای کسب نتایج رضایت‌بخش، تعادل بین این عوامل مهم است (Leboeuf *et al*., 2000). سلول‌های اسپرم مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع دارند و نسبت اسیدهای‌چرب غیراشباع به اشباع در غشای اسپرم نشخوارکنندگان کوچک از دیگر گونه‌ها بیشتر است که همین امر غشای آن‌ها را به آسیب‌های پراکسیداتیو در حضور گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مستعد می‌سازد. سلول‌های سوماتیک (بدنی) دارای

* تلفن: ۰۸۶۳۲۷۶۱۰۰۷
E-mail: m-motlagh@araku.ac.ir

محافظ‌های آنزیمی سیتوپلاسمی مانند کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز هستند، اما سلول اسپرم طی فرایند بلوغ مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهد، در نتیجه ازاین سد دفاعی کمتر بهره برده است (Sarıozkan *et al.*, 2014). امروزه با توجه به کم‌خطربودن ترکیبات طبیعی، تمایل به استفاده از این ترکیبات در رقیق‌کننده برای محافظت از اسپرم طی فرایندهای ذخیره‌سازی، بیشتر شده است؛ یکی از این ترکیبات ژل رویال است. ژل رویال توسط غدد زیرحلقی و غدد فک پایین زنبوران عسل کارگر تولید می‌شود و غذای اصلی ملکه و غذای اولیهٔ لاروهاست که در سه روز اول زندگی استفاده می‌کنند. تجزیهٔ شیمیایی ژل رویال نشان داد که این ماده به‌طور متوسط دارای ۷۰-۵۰ درصد آب، ۱۸-۹ درصد پروتئین، ۱۸-۷ درصد کربوهیدرات، ۸–۳ درصد چربی، مواد معدنی (پتاسیم، کلسیم، سدیم، روی ،آهن، مس و منگنز) و ویتامین‌ها (A، B، C، D و E) است (Kohno *et al.*, 2004). مطالعات دارویی در زمینهٔ ژل رویال نشان داد که شامل تعداد زیادی از ترکیبات بیواکتیو شامل ۱۰-هیدروکسی ۲- دکنوئیک اسید و اسیدهای آمینهٔ ضروری فراوان با تأثیرات قوی آنتی‌هایپرکلسترولمی است و همچنین تأثیرات آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچی، تأثیرات شبه‌انسولینی و استروژنی دارد و کاهندهٔ قند خون و ضدالتهاب است (Moradi *et al.*, 2013; Kamakura *et al.*, 2001). محققان نشان دادند که استفاده از ژل رویال به کاهش ناباروری ناشی از استرس‌گرمایی در خرگوش‌های نر (Elnagar, 2010) و همچنین افزایش باروری در مردان (Al-Sanafi *et al.*, 2007) انجامیده است. همچنین ویژگی آنتی‌اکسیدانی ژل رویال را به پنتوتنیک اسید موجود در آن نسبت داده‌اند (Abd Allah, 2010). اثر آنتی‌اکسیدانی ژل رویال در مطالعات گذشته روی آسیب‌های ناشی از سیس پلاتین بر بیضه و توانایی مهار رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال آنیون‌سوپراکسید، نشان داده شده است (Elnagar, 2010). با توجه به اینکه گزارش مکتوبی از ترکیب غلظت‌های مختلف ژل رویال در محیط رقیق‌کنندهٔ اسپرم بز مهابادی وجود ندارد، هدف از این پژوهش بررسی تأثیرات آنتی‌اکسیدانی سطوح متفاوت ژل رویال در فرایند نگهداری اسپرم به‌صورت منجمد و تـأثیر آن بر فراسنجه‌های مربوط به منی بز مهابادی است.

مواد و روش‌ها

ژل رویال استفاده‌شده در این آزمایش از کندوهای منطقهٔ هیدج استان زنجان (طول جغرافیایی، ۴۹ درجه؛ عرض جغرافیایی، ۳۶ درجه و ارتفاع از سطح دریا، ۱۶۲۷ متر) و ترکیبات استفاده‌شده در رقیق‌کننده از شرکت مرک (Merck) آلمان تهیه شد.

در این تحقیق از منی چهار رأس بز نژاد مهابادی استفاده شد. بزهای نر با سن ۹-۸ ماه و وزن ۳۵±۰/۵ کیلوگرم در ایستگاه آموزشی و پژوهشی گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (واقع در جنوب غربی کرج با طول جغرافیایی ۵۱ درجه، عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۱۳۰۱ متر ارتفاع از سطح دریا) نگهداری شدند. مجموع ۲۴ انزال با استفاده از مهبل‌مصنوعی به‌صورت هفته‌ای دو بار طی فصل تولیدمثلی (اوایل آبان تا اواسط آذرماه) جمع‌آوری شد. منی‌ها بلافاصله به آزمایشگاه فیزیولوژی تولیدمثل دام منتقل شد.

برای جلوگیری از شوک‌سرمایی به اسپرم‌ها، نمونه‌های منی تا زمان انتقال به آزمایشگاه در آب ۳۷-۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری و پس از اتمام نمونه‌گیری به سرعت، به آزمایشگاه منتقل شد و در آب گرم با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. در آزمایشگاه، هر نمونه از نظر حجم منی، جنبایی و غلظت، ارزیابی اولیه شد و فقط نمونه‌هایی که جنبایی بیشتر از ۷۰ درصد و تعداد اسپرم غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد داشتند، برای آزمایش استفاده شدند. بعد از ارزیابی اولیه، انزال‌ها برای جلوگیری از اثر تفاوت‌های فردی، با هم مخلوط شدند. برای ساخت رقیق‌کننده از محیطی بر پایهٔ تریس استفاده شد.

محیط پایهٔ استفاده‌شده شامل تریس (۳۰/۷ گرم در لیتر)، سیتریک اسید (۱۶/۴ گرم در لیتر)، فروکتوز (۱۲/۶ گرم در لیتر)، زردهٔ تخم‌مرغ (۱۵ درصد) و مقدار گلیسرول ۵ درصد (V/V) بود. اسمولاریتی

محیط پایه، ۴۲۵ میلی‌اسمولار و pH آن، ۶/۸ تنظیم شد (Bucak *et al*., 2009). تیمارهای آزمایشی حاوی ۴ غلظت (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد) ژل رویال بوده‌اند. رقیق‌کنندهٔ بدون ژل رویال به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. نمونه‌های منی با غلظت ۱:۲۰ در یکی از رقیق‌کننده‌های گفته‌شده، رقیق شدند.

انجماد و یخ‌گشایی

برای انجماد ابتدا نمونه‌ها در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری (IMV, L'Aigle, France) بسته‌بندی شدند و ۲ ساعت در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از طی دورهٔ تعادل، پایوت‌ها در فاصلهٔ ۴ سانتی‌متری، ۱۲ دقیقه در معرض بخار ازت مایع منجمد قرار گرفتند، سپس در ازت مایع غوطه‌ور شده و برای نگهداری به تانک ازت منتقل شدند (Bucak *et al*., 2007). برای یخ‌گشایی منی، پس از خروج پایوت‌های حاوی منی از ازت، پایوت‌ها ۳۰ ثانیه داخل آب گرم ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس در لوله‌های اپندورف تخلیه شدند (Ijaz *et al*., 2009).

ارزیابی اسپرم‌ها پس از یخ‌گشایی

جنبایی

اولین پارامتر ارزیابی در این تحقیق پس از یخ‌گشایی پایوت‌ها، بررسی جنبایی اسپرم بود. برای این منظور از هر گروه تیماری، یک پایوت ذوب شده و در لوله‌های اپندورف تخلیه شد و با برداشتن ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از منی و قراردادن روی لام و گذاشتن یک لامل تمیز روی آن، با استفاده از سیستم آنالیز اسپرم کامپیوتری (Sperm 3.1 Russia CASA, Video TesT) جنبایی اسپرم‌ها ثبت گردید. در این آزمایش فراسنجه‌های ارزیابی جنبایی مانند درصد جنبایی کل (TM)، درصد اسپرم‌های پیشرونده (PM)، درصد خطی‌بودن جنبایی اسپرم (LIN)، جنبایی عرضی سر (ALH)، میانگین سرعت اسپرم در مسیر منحنی (VCL)، راستی مسیر طی‌شدهٔ اسپرم (STR)، میانگین سرعت اسپرم در مسیر (VAP)، میانگین سرعت اسپرم در مسیر مستقیم (VSL) و تناوب حرکات جانبی (BCF) محاسبه شد.

یکپارچگی غشا

در این مطالعه برای ارزیابی یکپارچگی غشا، از محلول هایپواسموتیک استفاده شد. محیط هایپواسموتیک بر اساس اسمولاریتی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد، عمل می‌کند. در این آزمایش از محیط با فشار ۱۰۰ میلی‌اسمولار استفاده شد. فشار اسمزی طبیعی برای اسپرم بز، ۴۲۵ میلی‌اسمولار در لیتر است. بنابراین اسپرم دارای غشای سالم با قرارگرفتن در محیط هیپواسمول به‌سرعت واکنش نشان می‌دهد؛ این واکنش به‌صورت تورم در دم رخ می‌دهد. اسپرم‌هایی که غشای آسیب‌دیده دارند، به محیط واکنش نشان نمی‌دهند. ۱۰ میکرولیتر از منی با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول هاس که حاوی فروکتوز (۹ گرم در لیتر) و سیترات‌سدیم (۴/۹ گرم در لیتر) است، مخلوط و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد (Naijian *et al*., 2013).

زنده‌مانی اسپرم

برای تعیین درصد اسپرم زنده از رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین استفاده شد. مواد تشکیل‌دهندهٔ این محلول رنگ ائوزین (۱۶/۷ گرم در لیتر)، رنگ نگروزین (۱۰۰ گرم در لیتر) و سیترات‌سدیم (۲۹ گرم در لیتر) است و اساس این رنگ‌آمیزی بدین صورت است که رنگ ائوزین در اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند، در حالی که اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی ۲۰ µl از نمونهٔ اسپرم روی لام قرار گرفت. ۲۰ µl از رنگ آماده‌شده روی آن ریخته و نمونه با سرسمپلر به‌آرامی هم زده شد تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ۳۰ ثانیه، ۲۰ µl از مخلوط نمونه و در گوشهٔ لام دیگری گذاشته شد و با یک لام دیگر روی آن به‌آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک‌شدن، لام زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ قرار گرفت و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد (Naijian *et al*., 2013). اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کم‌رنگ گرفته بودند یا تنها بخشی از آن‌ها رنگ گرفته بود، اسپرم زنده در نظر گرفته شد (Maxwel & Evans, 1987).

آنالیز آماری

داده‌های این مطالعه به کمک رویهٔ GLM نرم‌افزار SAS و میانگین‌ها به روش دانکن در سطح ۵ درصد و با استفاده از مدل زیر تجزیه و تحلیل شدند.

$$y_{ijk} = \mu + a_i + e_{ij}$$

نتایج و بحث

میانگین جنبایی‌کل (TM) در سطوح ۰/۵ و ۱/۵ درصد ژل رویال با گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت. در غلظت ۱ درصد ژل رویال افزایش معناداری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵، جدول ۱) اما در غلظت ۲ درصد کاهش معناداری در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت. ژل رویال دارای محرک‌های جنبایی اسپرم مانند آدنوزین و آدنوزین‌مونوفسفات (AMP) است که به افزایش جنبایی اسپرم از طریق مهار فعالیت آنزیم فسفودی‌استراز می‌انجامند؛ در نتیجه cAMP در سطح دم اسپرم افزایش می‌یابد که سبب تحریک فسفریلاسیون از دو روش ۱. پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوژن و ۲. از طریق پروتئین باندشونده به عناصر (کلسیم)، می‌شود (Abd-Allah, 2012). ژل رویال دارای ترکیبات شبه‌انسولین (IGF) است که با ایجاد واکنش‌های اکسیداسیون گلوکز سبب تولید انرژی برای سلول می‌شود (Batchelder, 2002). همچنین احتمال خاصیت آنتی‌اکسیدانی IGF است که سبب افزایش جنبایی و سرعت اسپرم می‌شود (Aitken, 1994).

جنبایی پیش‌رونده (PM) در سطوح ۰/۵ و ۱ درصد ژل رویال تفاوت معناداری با گروه شاهد نشان نداد، اما در سطوح ۱/۵ و ۲ درصد ژل رویال کاهش معناداری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. در پژوهشی که روی اسپرم بوفالو انجام گرفت،

جدول ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف ژل رویال بر جنبایی و فراسنجه‌های سرعتی اسپرم بز مهابادی

فراسنجه**	غلظت ژل رویال					SEM	p-value
	۰ (کنترل)	۰/۵ درصد	۱ درصد	۱/۵ درصد	۲ درصد		
TM (درصد)	۶۵^{b*}	۶۱/۳۳^{bc}	۷۳/۱۶^{a}	۵۸/۳۳^{bcd}	۵۴/۵^{cd}	۲/۹۵	۰/۰۰۱
PM (درصد)	۳۳/۵^{abc}	۳۹^{ab}	۴۵/۳۳^{a}	۲۹/۵^{bcd}	۲۴/۱۶^{cd}	۰/۳۹	۰/۰۴
LIN (درصد)	۰/۲۸	۰/۲۱	۰/۲۱	۰/۲	۰/۱۳	۰/۰۴	۰/۱۸
ALH (µm)	۳/۴۴^{a}	۱/۵۶^{b}	۱/۳۱^{bc}	۰/۹۲^{bcd}	۰/۵۹^{bcd}	۰/۵۸	۰/۰۲
VCL (µm/s)	۱۱۲/۱۵^{a}	۴۹/۷۸^{b}	۳۸/۷۶^{bc}	۲۵/۵۳^{bcd}	۱۴/۸۲^{bcd}	۱۹/۶۳	۰/۰۱
STR (درصد)	۰/۵۸^{a}	۰/۴۵^{ab}	۰/۴۴^{abc}	۰/۴۱^{bcd}	۰/۳۲^{bcd}	۰/۰۵	۰/۰۵
VAP (µm/s)	۵۹/۰۰^{a}	۲۴/۴۵^{b}	۱۸/۱۵^{bc}	۱۱/۱۷^{bcd}	۵/۷^{bcd}	۹/۹۱	۰/۰۰۷
VSL (µm/s)	۴۳/۵۹^{a}	۱۹/۵۵^{b}	۱۳/۲۸^{bc}	۸/۷۹^{bcd}	۳/۵۳^{bcd}	۵/۸	۰/۰۲
BCF (Hz)	۸/۸۹^{a}	۶/۳۵^{ab}	۸/۲۱^{abc}	۴/۹۹^{bcd}	۲/۳۵^{bd}	۱/۴۷	۰/۰۳

* حروف بالانویس غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت میانگین سطوح (با سطح احتمال ۵ درصد) در هر ردیف است.

** درصد جنبایی کل (TM)، درصد اسپرم‌های پیش‌رونده (PM)، درصد خطی‌بودن جنبایی اسپرم (LIN)، جنبایی عرضی سر (ALH)، میانگین سرعت اسپرم در مسیر منحنی (VCL)، راستی مسیر طی شدهٔ اسپرم (STR)، میانگین سرعت اسپرم در مسیر (VAP)، میانگین سرعت اسپرم در مسیر مستقیم (VSL)، تناوب حرکات جانبی (BCF).

مشاهده شد که با اضافه‌کردن ۰/۴ درصد ژل رویال در محیط رقیق‌کننده و انکوبه‌کردن اسپرم در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه، جنبایی پیش‌رونده (PM) در مقایسه با گروه شاهد افزایش چشمگیری داشت که با افزایش زمان انکوبه کاهش یافت (Abd-Allah, 2010). پیشنهاد شده است که ژل رویال به دلیل داشتن مقادیر فراوان کلسیم می‌تواند جنبایی اسپرم را از طریق کاپاسیتاسیون جزئی افزایش دهد (Kodai *et al.*, 2007).

تنش اکسیداتیو با تغییر در سیالیت غشا، به اختلال در جنبایی اسپرم منجر می‌شود. تغییر در سیالیت غشا عمدتاً به غلظت‌های بالای اسیدهای چرب غیراشباع در غشا بستگی دارد؛ در نتیجه اسپرم به پراکسیداسیون لیپید بسیار واکنش‌پذیر است.

یکپارچگی غشا در تنظیم فعالیت پمپ یونی که کنترل-کنندهٔ انتقال یون‌های کلسیم به داخل و خارج سلول است، نقش مهمی ایفا می‌کند. تغییر در یکپارچگی غشا سبب تجمع یون کلسیم و در نتیجه اختلال در جنبایی اسپرم می‌شود (Amini Pour *et al*., 2013). نتایج ارائه‌شده در جدول ۱ نشان می‌دهد که از نظر فراسنجهٔ LIN بین هیچ‌کدام از گروه‌های تیماری و گروه شاهد تفاوت معناداری دیده نشد و در سایر فراسنجه‌های سرعت (BCF, VSL, ALH, VCL, VAP, STR) با افزایش غلظت ژل رویال بین گروه‌های تیماری و گروه شاهد کاهش معناداری مشاهده شد.

در پژوهشی میانگین فراسنجه‌های مربوط به سرعت اسپرم (VCL، VSL و VAP) در تیمارهای اسپرم قوچ که حاوی ۰/۵ و ۱ درصد ژل رویال بودند، در ساعات اولیهٔ ذخیره‌سازی، به طور معناداری بیشتر از گروه شاهد بود ولی با گذشت زمان و افزایش ساعت ذخیره‌سازی، کاهش یافت (Moradi *et al*., 2013).

در پژوهش حاضر میانگین درصد زنده‌مانی (جدول۲) در غلظت ۱ درصد ژل رویال دارای بیشترین مقدار بود و به‌ترتیب اختلاف معناداری با سایر گروه‌ها و گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵). ژل رویال دارای ویتامین‌های E و C است که خواص آنتی‌اکسیدانی دارند و در کاهش پراکسیداسیون لیپید و افزایش سطح گلوتاتیون که از مهم‌ترین سیستم‌های آنزیمی در پلاسمای منی است، نقش دارند (Ghanbari *et al*., 2015).

ویتامین E به دلیل حلالیت در چربی به‌راحتی می‌تواند در غشای پلاسمایی نفوذ کند و باعث کاهش خسارات ناشی از رادیکال‌های آزاد بر ساختار اسپرم شود. ویتامین C موجود در ژل رویال می‌تواند از طریق مهار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ایجادشده در محیط آبدوست، از سلول اسپرم محافظت کند و قدرت زنده‌مانی اسپرم را افزایش دهد (Azawi & Hussein, 2013). احتمال می‌رود این ویتامین‌ها با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی از سلول اسپرم در برابر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) محافظت‌کنند و قدرت زنده‌مانی اسپرم را افزایش دهند.

در پژوهش حاضر با توجه به جدول ۲ تفاوت معناداری از نظر یکپارچگی غشا بین هیچ‌کدام از گروه‌های تیماری و گروه شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵)؛ البته درصد میانگین یکپارچگی غشای اسپرم در غلظت ۱ درصد ژل رویال افزایش یافت اما این افزایش معنادار نبود. اثر حفاظتی ژل رویال را ممکن است به ترکیب شیمیایی آن و به‌ویژه پروتئین‌های اصلی آن از جمله اسیدهای آمینهٔ ضروری و همچنین وجود یک اسید چرب غیراشباع در ترکیب ژل رویال (۱۰ هیدروکسی-۲- دکنوئیک‌اسید) نسبت داد که نقش مهمی در یکپارچگی غشای سلولی ایفا می‌کند (Tamura *et al*., 2009).

اسید آمینه‌های اصلی ژل رویال، پرولین، آسپارتات، سرین، فنیل‌آلانین، گلوتامیک اسید و β آلانین است (Boselli *et al*., 2003). در مطالعه‌ای اثر اسید آمینه‌های گلوتاتیون و پرولین را بر اسپرم منجمد و ذوب‌شدهٔ اسب بررسی کردند. محققان به این نتیجه رسیدند که این دو اسید آمینه در غلظت‌های بهینه، جنبایی اسپرم را طی فرایند انجماد-یخ‌گشایی بهبود بخشیدند (Macchiaa *et al*., 2010).

جدول ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف ژل رویال بر زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم بز مهابادی

فراسنجه	غلظت ژل رویال					SEM	p-value
	شاهد (۰)	۰/۵ درصدT	۱T درصد	۱/۵ درصد T	۲T درصد		
زنده‌مانی	۶۹/۱۶^{b}	۶۶/۳۳^{bc}	۷۸/۵^{a}	۶۱/۶۶^{bcd}	۵۸/۳۳^{d}	۲/۹۶	۰/۰۰۰۷
یکپارچگی غشا	۵۱/۵	۴۷/۶۶	۶۱/۸۳	۵۵/۱۶	۴۷/۵	۴/۷۳	۰/۲

* حروف بالانویس غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت میانگین سطوح (با سطح احتمال ۵ درصد) در هر ردیف است.

اثر آسپارتیک اسید بر جنبایی اسپرم ممکن است از طریق گیرنده‌های N متیل‌دی‌آسپارتیک باشد که نسبت به یون کلسیم خارج‌سلولی نفوذپذیر است. کلسیم برای جنبایی اسپرم مورد نیاز است و همراه با HCO_3^- نقش سینرژیک در افزایش بسامد حرکات تاژکی اسپرم خواهد داشت؛ آسپارتیک اسید در

گلوکونئوژنز دخیل است که در نهایت به تولید گلوکز برای سلول اسپرم و افزایش جنبایی منجر می‌شود (Macchiaa *et al*., 2010).

به‌طورکلی می‌توان گفت اسیدهای آمینه در حفاظت انجمادی اسپرم از طریق تغییرات در فشار اسمزی، حفاظت در جذب کلسیم، ساختار آنزیم‌های مختلف (فسفوفروکتوکیناز، لاکتات‌دهیدروژناز و الکل‌دهیدروژناز) نقش دارند (Trimeche, 1999). همچنین می‌توان به نقش IGF-I موجود در ژل رویال در یکپارچگی عملکرد غشای اسپرم اشاره کرد (Abd-Allah, 2010).

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این پژوهش نشان داد که استفاده از غلظت ۱ درصد ژل رویال می‌تواند به عنوان یک مکمل آنتی‌اکسیدانی مناسب در رقیق‌کنندهٔ منی، از اسپرم بز محافظت بهتری کند.

سپاسگزاری

از جناب آقای مهندس افشین سیفی و نیز از مسئولان محترم پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به دلیل فراهم‌کردن امکانات مالی و تجهیزاتی برای اجرای این طرح، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abd-Allah, S. M. (2010). Ameliorating effect of royal jelly on viability and longevity of frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Buffalo Science*, 1, 1-8.
2. Abd-Allah, S. M. (2012). Effect of Royal Jelly on the Fertilizing Ability of Buffalo Spermatozoa In Vitro. *Buffalo Science*, 1, 1-4.
3. Aitken, R. J. (1994). Pathophysiology of human spermatozoa. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 6, 128-135.
4. Al-Sanafi, A. E., Mohssin, S. A. & Abdulla, S. M. (2007). Effect of Royal Jelly on male Infertility. *Thi-Qar Medical Journal*, 1, 1-12.
5. Amini Pour, H., Tahmasbi, A.M. & Naserain, A. A. (2013). The influence of vitamin E on semen characteristics of ghezel rams in during cooling and frozen process. *European Journal of Zoological Research*, 2, 94-99.
6. Azawi, O. I. & Hussein, E. K. (2013). Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 ˚C. *Veterinary Research Forum*, 4, 157-160.
7. Batchelder, T. (2002). A novel mechanism of liver enhancement from a traditional bee product. *Townsend Letter for Doctors and Patients*, 233, 46-48.
8. Boselli, E., Caboni, M. F., Sabatini, A.G., Marcazzan, G. L. & Lercker G. (2003). Determination and changes of free amino acids in royal jelly during storage. *Apidologie*, 34, 1-7.
9. Bucak, M. N., Atessahin, A., Varıslı, O., Yuce, A., Tekin N. & Akcay A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine andhyaluronan on ram semenMicroscopic and oxidative stress parameters afterfreeze–thawing process. *Theriogenology*, 67, 1060-1067.
10. Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sarıozkan, S., Ulutas, P. A., Coyan, K., Baspınar, N. & Ozkalp, B. (2009). Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Research in Veterinary Science*, 87, 468-472.
11. Elnagar, S. A. (2010). Royal jelly counteracts bucks summer infertility. *Animal Reproduction Scienc*, 121, 174-180.
12. Evans, G. & Maxwell, W. M. C. (1987). Frozen storage of semen. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*, 122-141.
13. Ghanbari, E., Nejati, V., Najafi, G. H., Khazaei, M. & Babaei, M. (2015). Study on The Effect of Royal Jelly on Reproductive Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Fertility and Sterility*, 9, 113-120.
14. Ijaz, A., Hussain, A., Aleem, M., Yousaf M.S. & Rehman H. (2009). Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the postthawed semen quality of Nili-ravi buffalo. *Theriogenology*, 71, 1326-1329.
15. Kamakura, M., Mitani, N., Fukuda, T. & Fukushima, M. (2001). Antifatigue effect of fresh royal Jelly in mice. *Nutritional Science and Vitaminology*, 47, 394-401.
16. Kodai, T., Umebayashi, K. & Nakatani, T. (2007). Compositions of royal jelly II. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55, 1528-31.
17. Kohno, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K. & Ikeda, M. (2004). Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68, 138-145.

18. Leboeuf, B., Restall, B. & Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62, 113-141.
19. Macchiaa, G., Topob, E., Manganoc, N., Aniellob, E. D. & Bonia, R. (2010). dl-Aspartic acid administration improves semen quality in rabbit bucks. *Animal Reproduction Science*, 118, 337-343.
20. Moradi, A. R., Malekinejadb, H., Farrokhi-Ardabilia, F. & Bernousic I. (2013). Royal Jelly improves the sperm parameters of ram semen during liquid storage and serves as an antioxidant source. *Small Ruminant Research*, 113, 346-352.
21. Naijiana, H. R., Kohrama, H., Zare Shahneha, A. & Sharafia, M. (2013). Effects of various concentrations of BSA on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process. *Small Ruminant Research*, 113, 371-375
22. Sarıozkan, S., Bucak, MN., Tuncer, P.B., Buyukleblebici, S. & Canturk, F. (2014). Influence of various antioxidants added to TCM-199 on post-thaw bovine sperm parameters, DNA integrity and fertilizing ability. *Cryobiology*, 68, 129-133.
23. Tamura, S., Kono, T., Harada, C., Yamaguchi, K. & Moriyama, T. (2009). Estimation and characterisation of major royal jelly proteins obtained from the honeybee Apis merifera. *Food Chemistry*, 114, 1491-1497.
24. Trimeche, A., Yvon, J. M., Vidament, M., Palmer, E. & Magistrini, M. (1999). Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 52, 181-191.

Iranian Journal of Animal Science, Vol. 46, No. 4, Winter 2016

The effect of using different levels of royal jelly in semen extender on some quality and quantity parameters of Mahabadi goat semen

Tahereh Mohammadian[1], Mahdi Khodaei Motlagh[2*] and Ahmad Zare Shahneh[3]
1, 2. M. Sc. Student and Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak 38156-8-8349, IRAN
3. Professor, Department of Animal Science, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Sep. 20, 2015 - Accepted: Nov. 13, 2015)

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the effects of using different levels of royal jelly in semen extender on viatal characteristics of goat sperm after freezing. Semen was collected from four adult bucks twice a week and samples pooled together. Sperm samples (six repeats) containing royal jelly in four levels (0.5, 1, 1.5 and 2%) had been frozen. After semen samples freezing – were thawed and examined in terms of mobility, survival and integrity of the membrane. Average total motility and survival at 1% royal jelly were higher than other treatment and control groups ($P<0.05$). A significant difference in terms of linearity motility of sperm and plasma membrane integrity was not observed between the treated groups and control group. A significant reduction was observed in the rate of other parameters velocity in Diluent contain royal jelly with the control group ($P<0.05$). Therefore, the use of royal jelly in goat semen diluent can improve some sperm parameters after freezing process.

Keywords: freezing-thawing, goat semen, diluent, royal jelly.

* Corresponding author E-mail: m-motlagh@araku.ac.ir Tel: +98 8632761007