Iranian Journal of Animal Science
Vol 49, No 1, Spring 2018 (27-32)
DOI: 10.22059/ijas.2017.214312.653465

علوم دامی ایران
دورۀ ۴۹، شمارۀ ۱، بهار ۱۳۹۷ (ص ۳۲-۲۷)

تأثیر افزودن سرما محافظ‌های نفوذی گلیسرول، دی متیل استامید و دی متیل فرمامید و غیر نفوذی تره‌هالوز و ساکارز بر انجمادپذیری اسپرم اسب

فرهاد وفایی[۱]، احمد زارع شحنه[۲*]، حمید کهرام[۳] و افشین سیفی جمادی[٤]
۱، ۲ و ٤. دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. دانشیار، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۳/۷)

چکیده

این پژوهش به‌منظور مقایسۀ تأثیر افزودن سطوح مختلف سه نوع سرمامحافظ نفوذی (گلیسرول، دی متیل استامید، دی متیل فرمامید) و دو نوع سرمامحافظ غیرنفوذی (تره‌هالوزو ساکارز) به رقیق‌کنندۀ اسپرم اسب‌های ترکمن انجام شد. برای این منظور چهار سر نریان بالغ ترکمن برای اسپرم‌گیری به کار گرفته شد. پس از گرفتن مایع منی و فرآوری آن به‌منظور جداسازی ژل و پلاسمای منی در آزمایشگاه، نمونه‌های منی به گروه‌های تیماری شامل سطوح ۵ و ۷ درصد سرمامحافظ‌های نفوذی گلیسرول، دی متیل استامید (DMA) و دی متیل فرمامید (DMF) و سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی مول سرمامحافظ‌های غیرنفوذی تره‌هالوز و ساکارز حل‌شده در رقیق‌کننده تقسیم و با یک روش استاندارد، منجمد شدند. پس از یخ‌گشایی، فراسنجه‌های جنبایی و زنده‌مانی برای همۀ تیمارها ارزیابی شد. نتایج این پژوهش نشان داد، زنده‌مانی اسپرم‌های منجمدشده با رقیق‌کنندۀ حاوی ۵ یا ۷ درصد DMF (به‌ترتیب ٦۸/٦±۰/۹۳ و ٦۳/۲±۲/۲۲ درصد) و سطوح ۵ یا ۷ درصد DMA (به ترتیب ٦۸/٦±۱/٦۹ و ٦۳/٦±۲/۷٦ درصد) از اسپرم‌های منجمدشده با رقیق‌کنندۀ حاوی سطوح ۵ یا ۷ درصد گلیسرول (به ترتیب ٥٦/۸±۳/۰٦ و ٥٥/٦±۱/۰۳ درصد) به‌طور معنی‌داری بهتر بود (P<۰/۰۵). جنبایی کل اسپرم‌های تیمارشده با سطح ۵ درصد DMA (٦۷/٤±۱/۰۲ درصد) نسبت به سطح ۷ درصد DMF (٦۱/۸±۱/٤٦ درصد) به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین زنده‌مانی و جنبایی اسپرم‌ها تحت تأثیر نوع سرما محافظ‌های غیر نفوذی قرار نگرفته و این سرما محافظ‌ها تفاوت معنی‌داری نسبت به هم نشان ندادند (P>۰/۰۵). بر پایۀ این نتایج می‌توان گفت که سرمامحافظ‌هایی مانند DMA و DMF می‌توانند جایگزین مناسبی برای گلیسرول باشند.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، رقیق‌کننده، سامانۀ تجزیۀ رایانه‌ای، سرمامحافظ، نریان.

The effect of addition of different levels of permeable and non-permeable cryoprotectants on freezing capacity of stallions sperm

Farhad Vafayi[1], Ahmad Zare Shahne[2*], Hmid Kohram[3] and Afshin Seifi Jamadi[4]
1, 2, 4. M.Sc. Student, Professor and Assistant Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Associate Professor, Facility members of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
(Received: Oct. 1, 2016 - Accepted: May 28, 2017)

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of addition of three different permeable (Glycerol, Dimethyl formamide and Dimethyl acetamid) and two different non-permeable cryoprotectant (Trehalose and sucrose) to the extender on freezing capacity of *Turkmen* stallions' sperm. Four healthy mature *Turkmen* stallions (8-10 years old) were used. Collected semen from stallions were processed and pooled after gel removal and before allocating to treatments [glycerol, dimethyl formamide and dimethyl acetamid (5 or 7 percent) and trehalose or sucrose (50 and 100 mM)]. The prepared treatments were frozen according to a standard method. After thawing viability and motility of all treatments were accessed. The results showed that the viability and motility of spermatozoa treated with extender containing 5 or 7 % dimethyl formamide (68.6 ± 0.93 and 63.2 ± 2.22 respectively) or dimethyl acetamid (68.6 ± 1.69 and 63.6 ± 2.76 respectively) were significantly higher than those which treated with 5 or 7 % glycerol (56.8 ± 3.06 and 55.6 ± 1.03 respectively) (P<0.05). Also, results showed that the viability and motility of stallion spermatozoa were not influenced by the non-permeable cryoprotectants (P<0.05). We concluded that dimethyl acetamid and dimethyl formamide can be proper alternatives for glycerol as a common stallion spermatozoa cryoprotectant and the sucrose and trehalose had no significant effect on the stallion sperm quality after freeze-thawing process.

Keywords: CASA, cryoprotectant, extender, sperm, stallion.

* Corresponding author E-mail: azareh@ut.ac.ir

علوم دامی ایران
دورۀ ۴۹، شمارۀ ۱، بهار ۱۳۹۷ (ص ۳۲-۲۷)

Iranian Journal of Animal Science
Vol 49, No 1, Spring 2018 (27-32)
DOI: 10.22059/ijas.2017.214312.653465

مقدمه

از جمله سازه‌های تأثیرگذار بر موفقیت انجماد می‌توان به ترکیب محیط انجمادی از جمله نوع سرمامحافظ[1] و غلظت آن، شرایط انجماد و سرعت سرد کردن و گرم کردن در کنار تفاوت‌های نژادی حیوانات اشاره کرد (Álvarez *et al*., 2014; Malo *et al*., 2010). انتخاب سرمامحافظ و غلظت مناسب آن از مهم‌ترین مراحل یک روش انجمادی کارآمد است. سرمامحافظ‌ها به دو دستۀ سرمامحافظ‌های(درون‌یاخته‌ای) نفوذی، مانند گلیسرول، دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO)، اتیلن‌گلیکول (EG) متانول و آمیدها و سرمامحافظ‌های برون‌یاخته‌ای (غیرنفوذی) که شامل برخی از قندها مانند مونوساکاریدها (گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز) و دی‌ساکاریدها (ساکارز و لاکتوز) هستند، تقسیم می‌شوند. سرمامحافظ‌هایی که به یاختۀ اسپرم نفوذ می‌کنند باعث آب‌گیری[2] جزئی یاخته، کاهش نقطۀ انجماد و بنابراین باعث کاهش تشکیل بلورهای یخ (دلیل اصلی وارد شدن تنش‌های فیزیکی به یاختۀ اسپرم طی مرحلۀ سردسازی و انجماد) می‌شوند (Fernández-Santos *et al*., 2006). گلیسرول به‌عنوان نخستین و پرکاربردترین سرمامحافظ شناخته شده، کاربرد گسترده‌ای در انجماد اسپرماتوزوآ گونه‌های مختلف حیوان‌ها به‌ویژه اسب دارد. بااین‌حال استفاده از گلیسرول در انجماد اسپرماتوزوآ نریان موفقیت‌آمیز نبوده و تنوع زیادی را در نرخ موفقیت بین نریان‌های مختلف سبب شده است (Guay *et al*., 1981). بر پایۀ بررسی‌های آزمایشگاهی انجام‌شده بر اسپرماتوزوآ نریان، مهم‌ترین عامل ایجادکنندۀ آسیب‌های انجمادی در اسپرم ناشی از سمیت ایجادشده در اثر توزیع نامساوی سرمامحافظ‌ها از جمله گلیسرول و تنش اسمزی به‌دست‌آمده از دهیدراسیون یاخته‌ها طی انجماد و یخ‌گشایی دوباره است (Morris *et al*., 2007). از سوی دیگر مشخص شده است که حضور سرمامحافظ‌های غیر نفوذی با کاهش میزان مورد نیاز سرمامحافظ‌های نفوذی در محیط انجماد، می‌تواند آسیب‌های سرمایی ناشی از توزیع نامناسب سرمامحافظ‌های نفوذی بر اسپرم را جبران کرده و چندین نقش محافظتی از جمله جلوگیری از توسعۀ بلورهای یخ و کمک به ثبات غلظت درونی محلول در شرایط تنش اسمزی را اعمال کند. قندها در ثابت نگه‌داشتن فشار اسمزی رقیق‌کننده‌ها بسیار مؤثر هستند. همچنین قندها می‌توانند با فسفولیپیدهای غشایی واکنش داده و باعث پایداری غشای یاخته‌ای شوند. افزون بر این موارد قندها به‌عنوان منابع انرژی یاختۀ اسپرم در فرآیند گلایکولیز و فسفرزایی اکسایشی (فسفریلاسیون اکسیداتیو) میتوکندریایی برای حمایت از جنبایی اسپرم نیز مصرف می‌شوند (Purdy, 2006; Peña *et al*., 2011). متیل فرمامید (MF) و دی متیل فرمامید (DMF) و دی متیل استامید (DMA) با وزن‌های مولکولی پایین می‌توانند بسیار مؤثرتر از گلیسرول، به اسپرم نریان نفوذ کنند، که این میزان نفوذ می‌تواند منجر به کاهش تورم در زمان تعادل در رقیق‌کننده‌های حاوی آمید شده و سمیت گلیسرول را نداشته باشد (Peña *et al*., 2011). در بررسی Seifi-Jamadi *et al.* (2017) گزارش کردند که افزودن DMA به رقیق‌کننده باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی می‌شود. توانایی حفاظتی هر نوع سرما محافظ با توجه به نوع یاخته و بافت بسیار متنوع است، بنابراین، کارایی هر نوع سرمامحافظ بایستی برای هرگونه، جداگانه بررسی شود. لذا هدف از انجام این پژوهش ارزیابی تأثیر سطوح مختلف برخی از سرما محافظ‌های نفوذی شامل گلیسرول، دی متیل استامید، دی متیل فرمامید و دو نوع سرما محافظ‌های غیرنفوذی شامل ساکارز و تره‌هالوز بر انجمادپذیری اسپرم اسب و تعیین بهترین سطوح هرکدام از سرما محافظ‌ها است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از چهار سر نریان بالغ ترکمن با میانگین سنی هشت تا ده سال برای اسپرم‌گیری استفاده شد، که از جیرۀ غذایی یکسانی استفاده می‌کردند. پس از دو هفته عادت‌دهی، منی به‌صورت دو بار در هفته (درمجموع پنج تکرار) با واژن مصنوعی مدل میسوری از نریان‌ها گردآوری شد. منی هر نریان

1. Cryoprotectant
2. Dehydration

* Corresponding author E-mail: azareh@ut.ac.ir

پس از پالایش کردن (HAR-VET A/V filter) به‌طور جداگانه در لوله‌های آزمایش ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده و درون محفظهٔ عایقی که با آب ۳۲ تا ۳۵ درجه پر شده بود به آزمایشگاه انتقال داده شد. بی‌درنگ پس از رسیدن به آزمایشگاه همهٔ نمونه‌های گرفته‌شده به‌صورت چشمی توسط میکروسکوپ نوری (Labomed Lx 400, LA) ارزیابی‌شده و اسپرم‌هایی که جنبایی کل بالای ۷۰ درصد داشتند برای ادامهٔ آزمایش انتخاب شدند (Fayrer-Hosken *et al.*, 2008). برای حذف مایع منی، نمونه‌های انتخاب‌شده به نسبت ۱:۱ با بخشی از رقیق‌کنندهٔ INRA-96 که از پیش در حمام آب گرم قرار داده شده است، رقیق شده و با دور g× ۶۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. آنگاه حدود ۹۰ درصد از محلول رویی بیرون ریخته و اسپرم‌ها با هدف از میان برداشتن اثرگذاری فردی، با یکدیگر آمیخته شدند، سپس مخلوط اسپرم به‌دست‌آمده به رقیق‌کننده‌های حاوی تیمارهای آزمایشی (گلیسرول ۵ و ۷ درصد، DMA ۵ و ۷ درصد، DMF ۵ و ۷ درصد، تره‌هالوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار، ساکارز ۵۰ و۱۰۰ میلی‌مولار) اضافه شدند. سرمامحافظ‌ها در دو گروه نفوذی و غیرنفوذی به‌منظور تعیین بهترین سطح و بهترین سرمامحافظ از هر گروه بررسی شد. غلظت نهایی حدود ۴۵ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر تنظیم شد. پس از رقیق‌سازی، برای تعویض گلیسرول با آب موجود در اسپرم، نمونه‌های رقیق‌شده برای پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری و آنگاه نمونه‌ها برای مدت ۱۵۰ دقیقه در یخچال قرار داده شدند تا دمای آن‌ها به حدود ۴ تا ۵ درجهٔ سلسیوس برسد (Seifi-Jamadi *et al.*, 2016). یاخته‌های اسپرم، در سردخانه به نی‌های (استرا) ۰/۵ میلی‌لیتری کشیده شده و انتهای آن‌ها با پودر پلی‌وینیل الکل[1] بسته شد. آنگاه با استفاده از جعبهٔ استایروفوم[2] پایوت‌ها در فاصلهٔ ۴ سانتی‌متری از بخار نیتروژن قرار داده شده و پس از ده دقیقه درون نیتروژن مایع شناور شدند. در مرحلهٔ پایانی، پایوت‌ها تا هنگام ارزیابی فراسنجه‌های کیفی (پس از ۳ هفته) در نیتروژن مایع نگه‌داری شدند. یخ‌گشایی در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس و به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفته و پس از آن جنبایی اسپرم با استفاده از نرم‌افزار تجزیهٔ رایانه‌ای اسپرم[3] (VideoTesT®, Sperm 3.1, Russia) و زنده‌مانی (رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین) ارزیابی شد (Evans & Maxwell, 1987). برای نرم‌افزار CASA که توانایی تجزیهٔ پنجاه فریم در ثانیه را داشته و کمترین وضوح نرم‌افزار ۳۰ پیکسل، کمترین سرعت برای اسپرم‌های پیش‌رونده ۷۰ میکرومتر بر ثانیه، کمترین اندازهٔ یاخته ۵ پیکسل، کمترین سرعت در مسیر مستقیم ۰ میکرومتر و کمترین حرکت‌های جانبی سر برای یاخته‌های پیش‌رونده ۰/۳ میکرومتر بر ثانیه در نظر گرفته شد (Seifi-Jamadi *et al.*, 2016). داده‌های به‌دست‌آمده در این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با پنج تکرار توسط رویهٔ GLM نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه‌وتحلیل شده و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. مدل آماری استفاده‌شده به شکل زیر است:

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

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

نتایج

نتایج فراسنجه‌های جنبایی اسپرم‌های تیمارشده با سرما محافظ‌های نفوذی پس از یخ‌گشایی در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد، سطح ۵ درصد دی‌متیل‌استامید نسبت به دیگر سطوح و سرما محافظ‌ها عملکرد بهتری در محافظت از اسپرم نریان نشان داده و نسبت به سطح ۷ درصد دی‌متیل‌فرمامید به‌طور معناداری منجر به بهبود جنبایی کل پس از یخ‌گشایی شده است (P<۰/۰۵). همچنین بر پایهٔ این نتایج سطوح ۵ درصد آمیدها نسبت به سطوح گلیسرول (۵ و ۷ درصد) عملکرد بهتری را پس از یخ‌گشایی داشتند (P<۰/۰۵). با توجه به فراسنجه‌های ارزیابی‌شده در این آزمایش بهترین عملکرد در بین

1. Poly vinyl alcohol
2. Styrofoam box
3. Computer assisted sperm analyzer

سرمامحافظ‌های نفوذی مربوط به سطح ۵ درصد دی‌متیل استامید بود هرچند اسپرم‌های تیمارشده با سطح ۵درصد دی‌متیل‌استامید از نظر جنبایی تفاوت معنی‌دار چندانی با سطح ۵ درصد دی‌متیل‌فرمامید نشان ندادند (P>۰/۰۵). همچنین زنده‌مانی اسپرم‌های تیمارشده با سطوح مختلف آمیدها تفاوت معنی‌داری با هم نشان ندادند (P>۰/۰۵).

تأثیر سرمامحافظ‌های غیرنفوذی بر انجمادپذیری اسپرم اسب در جدول ۲ نشان داده شده است. سرما محافظ‌های غیرنفوذی تأثیر معنی‌داری در بهبود فراسنجه‌های مورد ارزیابی نشان ندادند (P>۰/۰۵) اما بنابر نتایج به‌دست‌آمده می‌توان گفت که سطح۵۰ میکرومولار ساکارز (S50) عملکرد بهتری از دیگر سطح خود (S100) و سطوح تره هالوز (T50 و T100) داشت. تیمارهای آزمایشی از نظر جنبایی تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند (P>۰/۰۵) اما از نظر عددی عملکرد تیمار S50 نسبت به دیگر تیمارها بالاتر بود. همچنین زنده‌مانی تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند (P>۰/۰۵) اما سطوح تره‌هالوز به‌طور خفیفی عملکرد بهتری نسبت به سطوح ساکارز نشان دادند.

جدول ۱. تأثیر سطوح مختلف سرما محافظ‌های نفوذی بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم نریان پس از فرآیند انجماد-یخ گشایی (Lsmeans ± SE)

Table 1. The effect of different levels of permeable cryoprotectants on motility characteristics of stallion spermatozoa after freezing-thawing procedure (Lsmeans ±SE)

Parameter/Treatment	A5	A7	F5	F7	G5	G7
Total motility (%)	68.40 [a] ±1.029	63.0 [ab] ±1.923	67.20 [ab] ±2.009	61.80 [b] ±1.462	67.80 [ab] ±2.782	63.60 [ab] ±2.379
Progressive motility (%)	48.40 ±2.271	45.20 ±2.835	48.60 ±3.487	41.20 ±4.247	44.60 ±6.682	35.80 ±2.638
VSL (µm/s)	56.79 ±1.147	55.58±0.902	57.31 ±1.214	51.64 ±3.133	53.92 ±4.751	49.36 ±3.418
VCL (µm/s)	127.83±1.589	124.52 ±1.632	128.23 ±1.735	123.56 ±1.206	127.83 ±2.056	124.69 ±2.031
STR (%)	76.28 ±1.724	77.13 ±1.069	78.94 ±2.559	74.00 ±3.009	76.68 ±5.172	72.57 ±4.663
LIN (%)	44.42 ±0.507	44.63 ±0.379	44.68 ±0.548	41.71 ±2.0208	42.01 ±3.245	39.47 ±2.286
ALH (µm)	2.018 ±0.417	2.044 ±0.440	2.080 ±0.455	1.991 ±0.354	2.311 ±0.318	2.452 ±0.489

میانگین‌های با حرف‌های ناهمسان (d, c, b, a) در هر ردیف تفاوت معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

A: دی متیل استامید، F: دی متیل فرمامید، G: گلیسرول، VCL: سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی‌شده، VSL: سرعت اسپرم در خط مستقیم، LIN: معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد است، STR: معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد، ALH: بیشترین دامنهٔ حرکت‌های جانبی برحسب میکرومتر.

a, b, c, d: Means with different letters within a row are statistically significant (P<0.05).

A; Dimethylacetamide, F; Dimethylformamide, ALH; Amplitude of lateral head displacement, LIN; Linearity, STR; Straightness, VAP; Average path velocity, VCL; Curvilinear velocity, VSL; Straight line velocity.

جدول ۲. تأثیر سطوح مختلف سرمامحافظ‌های غیر نفوذی بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم نریان پس از فرآیند انجماد-یخ گشایی (Lsmeans ± SE)

Table 2. The effect of different levels of impermeable cryoprotectants on motility characteristics of stallion spermatozoa after freezing-thawing procedure (Lsmeans ±SE)

Parameter/Treatment	S100	S50	T50	T100
Total motility (%)	1.31±42.42	2.88±45.17	3.57±43.91	0.95±41.80
Progressive motility (%)	1.88±19.75	2.10±26.50	4.67±23.00	2.32±25.25
VSL (µm/s)	1.28±10.00	1.27±8.76	0.70±7.55	0.85±8.56
VCL (µm/s)	0.85±57.60	3.42±62.91	4.09±61.36	2.00±58.02
STR (%)	2.16±5.98	2.22±7.39	2.50±7.96	2.36±4.37
LIN (%)	1.28±48.74	3.30±53.07	4.54±51.16	1.47±49.01
ALH(µm)	0.80±50.12	3.01±53.54	3.08±52.69	1.63±49.51

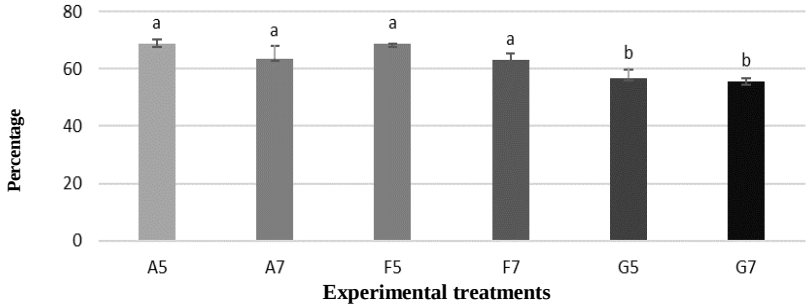
میانگین‌های با حرف‌های ناهمسان (d, c, b, a) در هر ردیف تفاوت معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

S100: ۱۰۰ میلی مول ساکارز، S50: ۵۰ میلی مول ساکارز، T100: ۱۰۰ میلی مول تره هالوز، T50: ۵۰ میلی مول تره هالوز، VCL: سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی‌شده، VSL: سرعت اسپرم در خط مستقیم، LIN: معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد است، STR: معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد، ALH: بیشترین دامنهٔ حرکت‌های جانبی برحسب میکرومتر.

a, b, c, d: Means with different letters within a row are statistically significant (p<0.05).

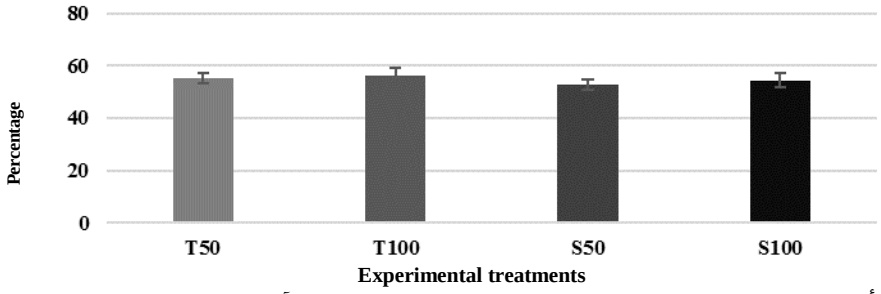
S; Sucrose, T; Trehalose, ALH; Amplitude of lateral head displacement, LIN; Linearity, STR; Straightness, VAP; Average path velocity, VCL;

Curvilinear velocity, VSL; Straight line velocity.



نمودار ۱. تأثیر سطوح مختلف سرما محافظ‌های نفوذی بر زنده‌مانی اسپرم نریان پس از فرآیند انجماد-یخ گشایی (Lsmeans ± SE)

Figure 1. The effect of different levels of permeable cryoprotectants on viability of stallion spermatozoa after freezing-thawing procedure (Lsmeans ±SE)



نمودار ۲. تأثیر سرمامحافظ‌های غیر نفوذی بر زنده‌مانی اسپرم نریان پس از فرآیند انجماد-یخ گشایی (Lsmeans ± SE)

Figure 2. The effect of different levels of impermeable cryoprotectants on viability of stallion spermatozoa after freezing-thawing procedure (Lsmeans ±SE)

بحث

از سال ۱۹۵۰ که برای نخستین بار از گلیسرول به‌عنوان سرمامحافظ در اسپرم نریان استفاده‌شده تاکنون گلیسرول به‌عنوان پرکاربردترین سرمامحافظ در انجماد اسپرم گونه‌های مختلف دامی به‌ویژه اسپرم نریان شناخته شده است (Álvarez *et al*., 2014). گزارش شده است که گلیسرول به دلیل سرعت آهسته‌تر نفوذ به یاخته، نسبت به دیگر سرمامحافظ‌ها و نفوذ بسیار آهسته‌تر نسبت به آب باعث اعمال آسیب‌های اسمزی مشهود به اسپرماتوزوآ اسب می‌شود (Glazar *et al*., 2009). همچنین گزارش شده است که تفاوت گونه‌ای در تحمل گلیسرول در اسپرم گونه‌های مختلف وجود دارد (Hammerstedt *et al*., 1990). تأثیر سرمامحافظ‌ها به وزن و ساختار مولکولی، آن‌ها بستگی داشته و بنابراین میزان حلالیت بالا، وزن مولکولی پایین و سمیت کم از ویژگی‌های یک سرمامحافظ مطلوب است (El-Sheshtawy *et al*., 2015). بنابر نتایج به‌دست‌آمده در بررسی پیشرو، آمیدها به‌عنوان عامل‌های سرمامحافظتی چالش‌برانگیز برای گلیسرول، عملکرد قابل توجهی را در فراسنجه‌های جنبایی و زنده‌مانی در محافظت از اسپرم اسب پس از یخ گشایی نسبت به گلیسرول نشان دادند. هرچند تفاوت بین آمیدها به‌جز سطح ۷ درصد دی‌متیل‌فرمامید در این آزمایش معنی‌دار نبود اما از بررسی نتایج می‌توان دریافت سطح ۵ درصد آمیدها کارایی بهتری داشته و در این میان DMA توانسته عملکرد به نسبت بهتری را در جنبایی و زنده‌مانی اسپرم اسب ایجاد کند. به نظر می‌رسد دلیل اصلی این امر نفوذپذیری پایین‌تر گلیسرول نسبت به آب و دیگر محافظت‌کننده‌ها باشد که باعث بروز آسیب‌های اسمزی در اسپرم می‌شود (Malo *et al*., 2010). هماهنگ با این نتایج، Metcalf *et al*. (2008) در پژوهشی، تأثیر افزودن گلیسرول و دی‌متیل‌سولفوکساید به رقیق‌کنندهٔ اسپرم اسب را بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که افزودن ۱ میلی‌مول دی‌متیل‌سولفوکساید در مقابل ۳/۵ درصد گلیسرول سبب افزایش تحرک، درصد آکروزوم سالم و یکپارچگی غشای اسپرم شده و باعث افزایش کیفیت کروماتین اسپرم می‌شود.

هدف اصلی استفاده از قندها در رقیق‌کننده‌های اسپرم گونه‌های مختلف ثابت نگه‌داشتن فشار اسمزی رقیق‌کننده (Guay *et al*., 1981) و استفاده به‌عنوان منابع انرژی یاختهٔ اسپرم در فرآیند گلایکولیز و فسفرزایی اکسایشی میتوکندریایی (Peña *et al*., 2011) است. در این بررسی با ارزیابی سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار قندهای ساکارز و تره‌هالوز مشخص شد که پس از یخ‌گشایی اسپرم‌ها هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف اعمال‌شده وجود نداشت (P>۰/۰۵) هرچند سطوح تره‌هالوز به‌طور خفیفی عملکرد بهتری نسبت به سطوح ساکارز نشان دادند. ثابت شده است که سرمامحافظ‌های نفوذی با خارج کردن آب یاخته و جلوگیری از تشکیل یخ‌های درون‌یاخته‌ای، عملکرد مطلوب‌تری نسبت به سرمامحافظ‌های غیر نفوذی دارند (Fernández-Santos *et al*., 2006; Salamon & Maxwell, 2000). نتایج این بررسی نشان می‌دهد، اسپرماتوزوآ نریان تحت محافظت آمیدها (دی‌متیل‌استامید و دی‌متیل‌فرمامید) زنده‌مانی بیشتری از یاخته‌های تحت محافظت گلیسرول دارند. همچنین این یافته‌ها نشان می‌دهد DMA و DMF ضریب نفوذ بهتری نسبت به گلیسرول در یاختهٔ اسپرماتوزوآی نریان داشته که منجر به کاهش آسیب ناشی از تنش اسمزی در فرآیند انجماد و ذوب شده است. اما با توجه به نتایج استفاده از سرما محافظ‌های غیر نفوذی این نتیجه به‌دست می‌آید که تغییر در نوع سرمامحافظ غیرنفوذی (تره هالوز یا ساکارز) منجر به تغییر معناداری در نرخ زنده‌مانی پس از یخ‌گشایی نشد.

REFERENCES

1. Álvarez, C., Gil, L., González, N., Olaciregui, M. & Luño, V. (2014). Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96 extender. *Cryobiology*, 6, 144-148.
2. El-Sheshtawy, R. I., Sisy, G. A. & El-Nattat, W. S. (2015). Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the post-thawing quality of cattle bull semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4, 26-31.
3. Evans, G. & Maxwell, W. C. (1987). Salamons' artificial insemination of sheep and goats. Butterworths.
4. Fayrer-Hosken, R., Abreu-Barbosa, C., Heusner, G. & Jones, L. (2008). Cryopreservation of stallion spermatozoa with INRA96 and glycerol. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28, 672-676.
5. Fernández-Santos, M. R., Esteso, M. C., Montoro, V., Soler, A. J. & Garde, J. J. (2006). Cryopreservation of Iberian red deer (Cervus elaphus hispanicus) epididymal spermatozoa: effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology*, 66, 1931-1942.
6. Glazar, A. I., Mullen, S. F., Liu, J., Benson, J. D., Critser, J. K., Squires, E. L. & Graham, J. K. (2009). Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology*, 59, 201-206.
7. Guay, P., Rondeau, M. & Bucher, S. (1981). Effect of glycerol on motility, viability, extracellular aspartate aminotransferase release and fertility of stallion semen before and after freezing. *Equine Veterinary Journal*, 13, 177-182.
8. Hammerstedt, R. H., Graham, J. K. & Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11, 73-88.
9. Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Martínez, F., Cano, R., De Blas, I. & Espinosa, E. (2010). Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*, 61(1) 142-147.
10. Metcalf, E. S., Dideon, B. A., Blehr, R., Schlimgen, T., Bertrand, W., Varner, D. D. & Hausman, M. S. (2008). Effects of DMSO and L-Ergothioneine on post-thaw semen parameters in stallions: Preliminary results. *Animal Reproduction Science*, 107, 332-333.
11. Morris, G. J., Faszer, K., Green, J. E., Draper, D., Grout, B. W. W. & Fonseca, F. (2007). Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology*, 68, 804-812.
12. Peña, F. J., García, B. M., Samper, J. C., Aparicio, I. M., Tapia, J. A. & Ferrusola, C. O. (2011). Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*, 76, 1177-1186.
13. Purdy, P. H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63, 215-225.
14. Salamon, S. & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 77-111.
15. Seifi-Jamadi, A., Ahmad, E., Ansari, M. & Kohram, H. (2017). Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. *Cryobiology*, 75, 15-20.
16. Seifi-Jamadi, A., Kohram, H., Shahneh, A. Z., Ansari, M. & Macías-García, B. (2016). Quercetin Ameliorate Motility in Frozen-Thawed Turkmen Stallions Sperm. *Journal of Equine Veterinary*

Science, 45, 73-77.