



تولیات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵

صفحه‌های ۶۰۱-۵۹۳

اثر سطوح مختلف فشار اسمزی و گلیسرول در رقیق‌کننده بر پایه لسیتین سویا بر کیفیت اسپرم گاو پس از انجماد

سید مجتبی موسوی^۱، آرمن توحیدی^{۲*}، مهدی ژندی^۱، عبدالله محمدی سنگ چشمه^۲ و قاسم عموعابدینی^۳

۱. دانشجوی دکتری، دانشیار و دانشیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج - ایران

۲. استادیار گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت - ایران

۳. دانشیار گروه بیوتکنولوژی و مهندسی داروسازی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران - ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۱۶

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۴/۰۸/۲۶

چکیده

اثر فشار اسمزی (۲۵۰، ۳۰۰ و ۳۵۰ میلی‌اسمول) و گلیسرول (پنج و هفت درصد) در رقیق‌کننده بر پایه لسیتین سویا بر کیفیت اسپرم گاو، پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی، در یک آزمایش فاکتوریل ۲×۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار با استفاده از شش راس گاو نر هولشتاین بررسی شد. در مجموع، از کلیه گاوها، ۳۶ بار اسپرم‌گیری (از هر گاو شش بار) شد. نمونه‌های منی بعد از ارزیابی اولیه، با هم مخلوط شده و به هر کدام از شش تیمار اختصاص یافتند. بعد از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی، فراسنجه‌های جنبایی اسپرم با کمک سیستم CASA، زنده‌مانی، درصد اسپرم با غشای فعال و ریخت‌شناسی اسپرم، ارزیابی شد. نتایج نشان داد که جنبایی پیش‌رونده (۴۸/۸۹ درصد)، جنبایی کل (۶۹/۵۰ درصد)، سرعت در مسیر منحنی (۱۶۸/۸۰ $\mu\text{m/s}$)، جنبایی عرضی سر (۳/۶۹ $\mu\text{m/s}$) و مستقیم بودن مسیر طی شده (۶۱/۸۹ درصد) در تیمار با هفت درصد گلیسرول و فشار اسمزی ۳۰۰ میلی‌اسمول، از سایر تیمارها بیشتر بود ($P < 0/05$). در تیمارهای با هفت یا پنج درصد گلیسرول و فشار اسمزی ۳۵۰ میلی‌اسمول، درصد اسپرم با غشای فعال (به ترتیب ۲۳/۱۴ و ۲۵/۶۳ درصد) و درصد زنده‌مانی اسپرم (به ترتیب ۵۸/۷۰ و ۶۴/۶۰ درصد) نسبت به سایر تیمارها، کمتر بود ($P < 0/05$). ولی درصد اسپرم طبیعی در این دو تیمار (به ترتیب ۹۲/۳۴ و ۹۲/۵۷ درصد) نسبت به سایر تیمارها، بیشتر بود. نتایج این آزمایش نشان داد که رقیق‌کننده حاوی هفت درصد گلیسرول با فشار اسمزی ۳۰۰ و یا ۲۵۰ میلی‌اسمول، در محافظت از اسپرم گاو هلشتاین طی فرایند انجماد-ذوب، کارآمدتر است.

کلیدواژه‌ها: انجماد، رقیق‌کننده، گاو، محافظ انجمادی، منی

مقدمه

انجماد موفق اسپرم گاو، یک فناوری کمک تولیدمثلی است که در حفظ گونه‌های حیوانی در حال انقراض و افزایش پیشرفت ژنتیکی مهم است. در طی انجماد، اسپرمها با تنش‌های سرد کردن، تشکیل کریستال‌های یخ، تنش اکسیداتیو و تنش اسمزی مواجه هستند که موجب صدمه به سلول و کاهش زنده‌مانی بعد از یخ‌گشایی می‌شوند. در حدود ۴۰-۵۰ درصد اسپرمها در طی انجماد و یخ‌گشایی صدمه می‌بینند. اسپرم به تغییرات اسمولاریته رقیق‌کننده، بسیار حساس است. اگر تفاوت‌های اسمولاریته قابل تحمل نباشد، اسپرم جنبایی خود را به طور غیرقابل برگشت از دست می‌دهد. بنابراین حداقل کردن آسیب اسمزی، یک عامل مهم در ایجاد تحمل به فرایند انجماد در اسپرم است. موفق بودن روش‌های انجماد، به جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی بستگی دارد که با اضافه کردن مواد محافظ انجمادی (نظیر گلیسرول) انجام می‌گیرد. چون عبور گلیسرول از طریق غشای اسپرم نسبت به دیگر مواد محافظ انجمادی، آهسته‌تر است، لذا وقتی که غلظت گلیسرول زیاد باشد، می‌تواند موجب صدمه اسمزی بیشتری به اسپرم شود [۵]. در یک تحقیق مشخص شد که استفاده از دزهای پنج و هفت درصد گلیسرول، اثر معنی‌داری بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم و یکپارچگی غشای پلاسمایی ندارد [۱]. نوع مواد محافظ انجمادی و غلظت آنها در رقیق‌کننده، بر بقای اسپرم تاثیر دارد. درضمن، اثر متقابل بین اسمولاریته و غلظت گلیسرول در رقیق‌کننده اسپرم گاو گزارش شده است [۱۳]. چون غلظت گلیسرول به وسیله ترکیبات دیگر رقیق‌کننده، تحت تاثیر قرار می‌گیرد [۱۴]، تعیین غلظت بهینه آن در هر رقیق‌کننده، ضروری است. هدف از این پژوهش، تعیین بهترین میزان فشار اسمزی و گلیسرول در یک رقیق‌کننده بر پایه لسیتین سویا، برای انجماد اسپرم گاو بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از شش راس گاو نر مرکز تولید مواد ژنتیکی گاوهای شیری و گوشتی جاهد که تحت شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان نگهداری می‌شوند، استفاده شد. از کلیه گاوها، ۳۶ بار اسپرم‌گیری (از هر گاو شش بار) شد. بلافاصله پس از جمع‌آوری، حجم منی با لوله‌های درجه‌بندی شده، غلظت آن با استفاده از دستگاه فتومتر (IMV, L'Aigle, France) و جنبایی پیش‌رونده با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست (Olympus, Tokyo, Japan) در ۳۷ درجه سانتیگراد اندازه‌گیری شد و نمونه‌های دارای بیشتر از ۷۰ درصد جنبایی پیش‌رونده و غلظت بیشتر از یک میلیارد اسپرم در هر میلی‌لیتر، برای ادامه آزمایش انتخاب و استفاده شدند. بعد از ارزیابی اولیه انزالها، برای جلوگیری از اثر تفاوت‌های فردی در کیفیت اسپرم هر گاو، منی آنها با هم مخلوط شد.

در این تحقیق، از بافر تریس (تریس ۳۰/۲۵ گرم در لیتر)، اسید سیتریک (۱۷ گرم در لیتر) و فروکتوز (۱۲/۵ گرم در لیتر)) به عنوان بافر پایه استفاده شد. مقدار سه درصد (حجمی / وزنی) لسیتین سویا (P3644 Sigma, enzymatic Type IV-S, $\geq 30\%$)، به بافر تریس اضافه شد و با استفاده از دستگاه سونیکاتور (Sonicator S-4000)، با تنظیمات پنج ثانیه کار و ۱۰ ثانیه استراحت)، به نانو ذراتی با میانگین قطر ۹۴/۶ نانومتر تبدیل شد. برای حذف مواد تیتانیوم، که از طریق پروب دستگاه سونیکاتور وارد محیط رقیق‌کننده می‌شوند، نمونه‌ها، در $10000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه، سانتریفیوژ (Sigma 1-14) شدند. سپس به وسیله فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر (Jet-Biofil, Canada)، فیلتر شدند. برای رسیدن به فشار اسمزی ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی‌اسمول، به رقیق‌کننده دارای ۳۰۰ میلی‌اسمول فشار اسمزی، به ترتیب، آب و NaCl، اضافه شد. سپس، هر کدام از سه رقیق‌کننده با سه فشار اسمزی مختلف، به دو قسمت

تولیدات دامی

سازای رنگ ۱/۶۷ گرم ائوزین Y به همراه ۲/۹ گرم سیترات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با حرارت ملایم حل شد. سپس، ۱۰ گرم رنگ نیگروزین به محلول قبلی اضافه شده و جوشانده شد. در مرحله پایانی، محلول رنگ تهیه شده در دمای اتاق سرد شده و برای جداسازی ذرات ژله‌ای، با فیلتر ۰/۲، فیلتر شد. برای ارزیابی نمونه ۱۰ میکرولیتر اسپرم به وسیله سمپلر بر روی یک لام گرم و زیر تمیز قرار داده شد. لام‌ها پس از رنگ آمیزی، زیر میکروسکوپ (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ ارزیابی شدند. از هر لام تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده)، محاسبه شد. فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم، به وسیله آزمایش تورم هایپواسموتیک بررسی شد. مقدار ۳۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی‌اسمول بر کیلوگرم، مخلوط و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط روی لام ریخته و گسترش تهیه شد. لام حاصل، زیر میکروسکوپ نوری (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، ارزیابی شد. از هر لام، تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای دم گره‌خورده (اسپرم‌های دارای غشای فعال) محاسبه شد.

برای ارزیابی ریخت‌شناسی، از محلول هانکوک استفاده شد. محیط هانکوک شامل ۶۲/۵ میلی‌لیتر فرمالین (۳۷ درصد)، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سالین، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر است. محلول سالین شامل ۹/۰۱ گرم کلرید سدیم در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر می‌باشد. محلول بافر خود از دو محیط جداگانه تشکیل شده است. محیط نخست شامل ۲۱/۶۸۲ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبدار ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)

تقسیم شدند و به هر کدام مقدار هفت و یا پنج درصد گلیسرول، اضافه شد. مخلوط نمونه‌های منی نیز به شش بخش مساوی تقسیم و هر بخش با یکی از رقیق‌کننده‌های تهیه شده، تا رسیدن به غلظت نهایی ۴۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر رقیق شد و به طور مساوی به شش تیمار با سه سطح فشار اسمزی [۲۵۰ (P250)، ۳۰۰ (P300) و ۳۵۰ (P350) میلی‌اسمول] و دو سطح گلیسرول [پنج (G5) یا هفت (G7) درصد] اختصاص یافتند و در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری (Minitube, Germany) ذخیره شدند.

مراحل پر کردن پایوت‌ها با کمک دستگاه فیلینگ-سیلینگ (Minitube, Germany) انجام شد. سپس پایوت‌ها حداقل به مدت چهار ساعت در اتاق سرد نگهداری شدند. پایوت‌ها با کمک دستگاه انجماد دیجیتالی (Cedex, Digit Cool®, IMV® Technologies, L'Aigle France) منجمد و سپس داخل ازت غوطه‌ور شدند. تا زمان ارزیابی، پایوت‌ها در داخل تانک‌های ازت، نگهداری شدند. برای یخ‌گشایی منی، پس از خارج کردن پایوت‌ها از ازت مایع، به مدت ۱۰ ثانیه در دمای اتاق و به مدت ۴۵ ثانیه، در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

فراسنجه‌های جنبایی اسپرم، با سیستم آنالیز کامپیوتری (CASA, Video Test-Sperm 2.1, St. Petersburg, Russia) ارزیابی شدند. فراسنجه‌های حاصل شامل: جنبایی کل (درصد)، جنبایی پیش‌رونده (درصد)، میانگین سرعت در مسیر (میکرومتر در ثانیه)، سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر در ثانیه)، سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر در ثانیه)، جنبایی عرضی سر (میکرومتر)، درصد خطی بودن جنبایی (درصد)، تناوب عرضی ضربان سر (هرتز) و مستقیم بودن مسیر طی شده (درصد)، بود.

برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی (زنده‌مانی) از رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. در این روش، اسپرم‌های مرده، رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند، ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای آماده

تولیدات دائمی

میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت میانگین‌ها و با $\alpha = 0/05$ مقایسه شدند. در هر تکرار سه پایوت، یخ‌گشایی و برای ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم استفاده شد.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (A \times B)_{ij} + e_{ijk} \quad (1)$$

در این رابطه، Y_{ijk} ، مشاهده مربوط به سطح i ام عامل A و سطح j ام عامل B در تکرار k ؛ μ ، میانگین جامعه برای صفت مورد نظر؛ A_i ، اثر ثابت i امین سطح فشار اسمزی (۱، ۲ و ۳)؛ B_j ، اثر ثابت j امین سطح گلیسرول (۱ و ۲)؛ $(A \times B)_{ij}$ ، اثر متقابل دو عامل و e_{ijk} ، اثر تصادفی باقیمانده است.

نتایج و بحث

اثر گلیسرول و مقدار فشار اسمزی بر جنبایی اسپرم معنی‌دار بود ($P < 0/05$)، اما اثر متقابل بین گلیسرول \times فشار اسمزی بر جنبایی اسپرم، معنی‌دار نبود. جنبایی اسپرم در رقیق‌کننده حاوی هفت درصد گلیسرول، بیشتر از رقیق‌کننده حاوی پنج درصد گلیسرول بود (جدول ۱).

در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و محیط دوم، از ۲۲/۲۵۴ گرم فسفات پتاسیم (KH_2PO_4) در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر، تشکیل شده است. با مخلوط کردن ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط نخست با ۸۰ میلی‌لیتر از محیط دوم ۲۸۰ میلی‌لیتر محلول بافر تهیه می‌شود. برای ارزیابی ناهنجاری‌های اسپرم سه قطره از هر نمونه اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به میکروتیوب حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک اضافه شد. سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و لامل‌گذاری شد و با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. برای محاسبه درصد کل اسپرم‌های غیرطبیعی (غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) تعداد ۲۰۰ اسپرم از هر نمونه، بررسی و شمارش شد.

این تحقیق، در یک آزمایش فاکتوریل 2×3 در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار با استفاده از شش راس گاو نر هولشتاین انجام شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS [۱۱] و رویه Mixed برای مدل ۱ تجزیه و

جدول ۱. فراسنجه‌های جنبایی و سرعت اسپرم گاو در غلظت‌های مختلف گلیسرول

SEM	درصد غلظت گلیسرول		فراسنجه
	٪ ۵	٪ ۷	
۰/۹۷	۳۷/۸۱ ± ۱/۶۱ ^b	۴۱/۲۵ ± ۱/۳۷ ^a	جنبایی پیش‌رونده (٪)
۱/۳۲	۵۷/۸۱ ± ۱/۹۲ ^b	۶۰/۹۶ ± ۱/۶۱ ^a	جنبایی کل (٪)
۰/۷۲	۲۶/۶۲ ± ۰/۷۹ ^a	۲۷/۴۷ ± ۰/۷۷ ^a	خطی بودن جنبایی (٪)
۲/۷۴	۴۳/۹۷ ± ۳/۳۴ ^b	۴۹/۱۰ ± ۳/۴۲ ^a	سرعت در مسیر مستقیم (μm/s)
۵/۷۱	۱۱۴/۶۴ ± ۷/۶۱ ^b	۱۳۰/۲۸ ± ۸/۰۸ ^a	سرعت در مسیر منحنی (μm/s)
۳/۹۲	۶۱/۰۰ ± ۴/۷۶ ^b	۶۸/۵۰ ± ۴/۴۹ ^a	میانگین سرعت در مسیر (μm/s)
۰/۱۲	۲/۵۲ ± ۰/۱۵ ^b	۲/۸۴ ± ۰/۱۶ ^a	جنبایی عرضی سر (μm)
۰/۷۸	۵۵/۱۵ ± ۰/۹۳ ^b	۵۶/۸۴ ± ۰/۸۵ ^a	مستقیم بودن مسیر طی شده (٪)
۰/۳۵	۹/۴۴ ± ۰/۳۷ ^b	۱۰/۲۱ ± ۰/۳۱ ^a	تناوب عرضی ضربان سر (Hz)

a-b: در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار است ($P < 0/05$).

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵

اثر سطوح مختلف فشار اسمزی و گلیسرول در رقیق‌کننده بر پایه لسیتین سویا بر کیفیت اسپرم گاو پس از انجماد

کاهش نقطه انجماد و کاهش تعداد و اندازه کریستال‌های یخ داخل سلولی، نیاز هستند. با این حال، عوامل محافظ انجمادی، خودشان می‌توانند دارای اثر سمی (ناپایداری غشاء، دناتوره شدن پروتئین‌ها و آنزیم‌ها) بر اسپرم باشند که اثر آنها به غلظتشان در رقیق‌کننده و مدت زمانی که اسپرم در معرض آنها قرار می‌گیرد، وابسته است [۱۰]. از جمله ساز و کارهای پیشنهادی برای نحوه عمل گلیسرول، کاهش نقطه‌ی انجماد و متعاقباً کاهش غلظت الکترولیت‌ها در بخش غیر منجمد، اتصال به یون‌های فلزی، دهیدراته کردن سلول، عمل کردن از طریق سازوکار بافرینگ-نمک (کاهش غلظت نمک طی فرایند انجماد) است [۸].

فراسنجه‌های جنبایی اسپرم در رقیق‌کننده‌های با فشارهای اسمزی ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌اسمول بهتر از رقیق‌کننده با فشار اسمزی ۳۵۰ میلی‌اسمول، بود ($P < 0.05$) (جدول ۲). جنبایی پیش‌رونده، جنبایی کل، جنبایی عرضی سر، سرعت در مسیر منحنی و مستقیم بودن مسیر طی شده اسپرم در محلول‌های رقیق‌کننده حاوی پنج یا هفت درصد گلیسرول با فشار اسمزی ۳۵۰ میلی‌اسمول کمتر از سایر رقیق‌کننده‌ها بود (جدول ۳).

جدول ۲. فراسنجه‌های جنبایی اسپرم گاو در فشارهای مختلف اسمزی

SEM	فشار اسمزی (میلی‌اسمول)			فراسنجه
	۳۵۰	۳۰۰	۲۵۰	
۰/۷۱	۲۵/۴۱±۱/۱۵ ^b	۴۷/۳۳±۰/۵۰ ^a	۴۵/۸۶±۰/۴۴ ^a	جنبایی پیش‌رونده (%)
۰/۹۶	۴۳/۰۵±۱/۴۷ ^b	۶۷/۷۲±۰/۷۰ ^a	۶۷/۳۸±۰/۵۸ ^a	جنبایی کل (%)
۰/۴۳	۱۹/۸۹±۰/۵۶ ^b	۳۰/۱۵±۰/۳۴ ^a	۳۱/۱۰±۰/۳۸ ^a	خطی بودن جنبایی (%)
۱/۷۱	۱۴/۹۷±۱/۳۰ ^c	۵۸/۷۱±۱/۷۱ ^b	۶۵/۹۳±۲/۱۵ ^a	سرعت در مسیر مستقیم (μm/s)
۴/۱۸	۴۹/۶۳±۳/۳۸ ^b	۱۵۴/۷۸±۴/۲۵ ^a	۱۶۲/۹۷±۵/۲۴ ^a	سرعت در مسیر منحنی (μm/s)
۲/۶۷	۲۰/۷۵±۱/۶۶ ^c	۸۱/۲۳±۲/۷۲ ^b	۹۲/۲۷±۳/۴۸ ^a	میانگین سرعت در مسیر (μm/s)
۰/۰۹	۱/۱۹±۰/۰۷ ^b	۳/۳۸±۰/۹۰ ^a	۳/۴۸±۰/۱۱ ^a	جنبایی عرضی سر (μm/s)
۰/۵۷	۴۸/۲۱±۰/۸۵ ^b	۶۰/۵۶±۰/۳۸ ^a	۵۹/۲۱±۰/۳۹ ^a	مستقیم بودن مسیر طی شده (%)
۰/۲۴	۶/۹۴±۰/۳۴ ^c	۱۰/۷۹±۰/۱۸ ^a	۱۱/۷۳±۰/۱۸ ^b	تناوب عرضی ضربان سر (Hz)

a-b: در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار است ($P < 0.05$).

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵

جدول ۳. فراسنج‌های جنبایی اسپرم گاو در تیمارهای مختلف

SEM	فراسنجه						
	G5P350	G7P350	G5P300	G7P300	G5P250	G7P250	
۰/۹۹	۲۲/۳۸±۱/۶۴ ^c	۲۸/۴۴±۱/۳۰ ^b	۴۵/۷۷±۰/۳۸ ^a	۴۸/۸۹±۰/۷۷ ^a	۴۵/۲۷±۰/۵۰ ^a	۴۶/۴۴±۰/۸۲ ^a	جنبایی پیش رونده (%)
۱/۳۵	۴۰/۲۲±۲/۳۷ ^c	۴۵/۸۸±۱/۵۳ ^b	۶۵/۹۴±۰/۹۳ ^a	۶۹/۵۰±۰/۸۸ ^a	۶۷/۲۷±۰/۶۹ ^a	۶۷/۵۰±۰/۹۶ ^a	جنبایی کل (%)
۰/۶۲	۱۹/۶۰±۰/۹۴ ^b	۲۰/۱۷±۰/۶۳ ^b	۲۹/۴۶±۰/۵۱ ^a	۳۰/۸۴±۰/۴۱ ^a	۳۰/۸۹±۰/۵۸ ^a	۳۱/۴۰±۰/۴۸ ^a	خطی بودن جنبایی (%)
۲/۴۲	۱۳/۳۸±۱/۹۹ ^c	۱۶/۵۶±۱/۶۳ ^c	۵۴/۳۰±۲/۱۳ ^b	۶۳/۸۱±۲/۲۸ ^{ab}	۶۴/۲۴±۳/۲۸ ^{ab}	۶۷/۶۳±۲/۸۲ ^a	سرعت در مسیر مستقیم (µm/s)
۵/۸۵	۴۵/۴۱±۵/۴۰ ^c	۵۲/۸۶±۳/۹۷ ^c	۱۴۰/۸۶±۴/۳۶ ^b	۱۶۸/۸۰±۵/۶۷ ^a	۱۵۷/۸۶±۷/۸۸ ^{ab}	۱۶۸/۸۸±۶/۹۲ ^a	سرعت در مسیر منحنی (µm/s)
۳/۷۸	۱۸/۶۷±۲/۴۶ ^c	۲۲/۸۳±۲/۱۸ ^c	۷۶/۴۷±۳/۳۳ ^b	۸۷/۹۹±۳/۷۶ ^{ab}	۸۹/۸۶±۵/۴۶ ^{ab}	۹۴/۶۸±۴/۴۱ ^a	میانگین سرعت در مسیر (µm/s)
۰/۱۳	۱/۱۲±۰/۱۲ ^c	۱/۲۷±۰/۰۷ ^c	۳/۰۷±۰/۱۰ ^b	۳/۶۹±۰/۱۲ ^a	۳/۳۸±۰/۱۵ ^{ab}	۳/۵۷±۰/۱۵ ^{ab}	جنبایی عرضی سر (µm/s)
۰/۸۱	۴۷/۳۴±۱/۵۳ ^b	۴۹/۰۷±۰/۷۵ ^b	۵۹/۲۳±۰/۳۳ ^a	۶۱/۸۹±۰/۵۳ ^a	۵۸/۸۷±۰/۴۸ ^a	۵۹/۵۴±۰/۶۲ ^a	مستقیم بودن مسیر طی شده (%)
۰/۳۴	۶/۳۳±۰/۵۶ ^c	۷/۵۶±۰/۳۳ ^c	۱۱/۲۱±۰/۲۲ ^{ab}	۱۲/۲۵±۰/۲۵ ^a	۱۰/۸۸±۰/۲۵ ^b	۱۰/۸۱±۰/۲۷ ^b	تناوب عرضی ضربان سر (Hz)

G5P300, G5P250 و G5P350 به ترتیب تیمارهای با فشار اسمزی ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ پیچ درصد گلیسرول و G7P300, G7P250 و G7P350 به ترتیب تیمارهای با فشار اسمزی ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ پیچ درصد گلیسرول و G7P300, G7P250 و G7P350 به ترتیب تیمارهای با فشار اسمزی ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ پیچ درصد گلیسرول هستند. a-b: در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی دار است (P<۰/۰۵).

تولیدات دامی

اثر سطوح مختلف فشار اسمزی و گلیسرول در رقیق‌کننده بر پایه لسیتین سویا بر کیفیت اسپرم گاو پس از انجماد

جدول ۴. اثر درصد گلیسرول و میزان فشار اسمزی بر یکپارچگی غشاء، فعالیت غشایی سلول و درصد اسپرم طبیعی

SEM	سطح فشار اسمزی (میلی‌اسمول)	SEM	سطح گلیسرول (درصد)	فراسنجه
	۳۰۰	۲۵۰	۷	۵
۲/۴۲	۶۰/۶۶±۳/۶۷ ^b	۷۰/۲۴±۱/۳۹ ^a	۱/۹۸	۶۸/۰۸±۱/۸۷
۲/۵	۲۴/۳۹±۱/۵۷ ^b	۶۳/۵۵±۳/۴۲ ^a	۲/۰۴	۴۶/۵۲±۳/۹۵
۱/۸۸	۹۲/۴۵±۱/۳۲ ^a	۸۲/۴۶±۲/۳۸ ^b	۱/۴۵	۸۷/۸۲±۱/۵۸

در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

جدول ۵. درصد اسپرم‌های با غشای یکپارچه، فعال و طبیعی در تیمارهای مختلف

SEM	تیمار					فراسنجه
	G5P350	G7P350	G5P300	G7P300	G5P250	
۲/۸۶	۶۴/۶۰±۵/۱۳ ^{ab}	۵۸/۷۰±۵/۳۷ ^b	۷۱/۳۵±۲/۴۵ ^a	۶۸/۷۰±۳/۰۴ ^{ab}	۷۰/۳۳±۱/۹۱ ^a	۷۰/۱۵±۲/۲۰ ^a
۲/۸۴	۲۵/۶۲±۲/۴۲ ^c	۳۳/۱۴±۲/۰۸ ^c	۵۴/۳۲±۲/۸۸ ^b	۶۵/۸۰±۳/۶۷ ^a	۶۰/۰۰±۳/۰۹ ^{ab}	۶۸/۶۴±۶/۳۰ ^a
۱/۷۱	۹۲/۵۷±۲/۳۰ ^a	۹۲/۳۴±۱/۵۴ ^a	۸۶/۰۶±۲/۸۴ ^{ab}	۸۶/۸۱±۱/۶۶ ^{ab}	۸۵/۳۲±۲/۳۷ ^{ab}	۷۹/۶۰±۴/۰۲ ^b

G5P350، G5P300، G7P350، G7P300، G5P250 و G7P250 به ترتیب تیمارهای با فشار اسمزی ۳۵۰، ۳۰۰، ۲۵۰، ۲۰۰ و ۱۵۰ میلی‌اسمول هستند. تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵

محیط‌های هایپرتونیک و هایپوتونیک، افزایش داده‌اند [۷]. در مطالعه حاضر، رقیق‌کننده‌های حاوی هفت و پنج درصد گلیسرول با فشار اسمزی ۳۰۰ و ۲۵۰ میلی‌اسمول، اثر معنی‌داری بر درصد یکپارچگی غشای پلاسمایی و درصد اسپرم طبیعی نداشتند که احتمالاً به دلیل استفاده از لسیتین سویا در رقیق‌کننده باشد که اسیدهای چرب غیراشباع آن با لیپید و کلسترول موجود در غشای اسپرم تبادل شده‌اند و منجر به بازآرایی اجزای غشای سلول و استحکام غشای سلول‌ها در طی انجماد شده است [۹] و توانسته است، حساسیت اسپرم‌ها به درجه حرارت‌های پایین و شوک سرمایی را کاهش دهد و محدوده تحمل به فشار اسمزی و درصد گلیسرول در طی فرایند انجماد را افزایش دهد. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که رقیق‌کننده بر پایه لسیتین حاوی هفت درصد گلیسرول با فشار اسمزی ۳۰۰ و یا ۲۵۰ میلی‌اسمول، عملکرد مطلوبی در محافظت اسپرم گاو هولشتاین طی فرایند انجماد-ذوب دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در قالب طرح رساله دکتری تخصصی، پارک علم و فناوری دانشگاه تهران در قالب اعتبار شماره ۹۴۰۲۹ برنامه شکوفایی یک و وزارت علوم، تحقیقات و فناوری در قالب طرح‌های فناورانه قدردانی می‌شود.

منابع

1. Büyükleblebici S, Tuncer PB, Bucak M, Tasdemir U, Eken A, Büyükleblebici O, Durmaz E, Sarıözkan S, Endirlik B and Chaveiro A (2014) Comparing ethylene glycol with glycerol and with or without dithiothreitol and sucrose for cryopreservation of bull semen in egg-yolk containing extenders. *Cryobiology*. 69: 74-78.

در طی اضافه کردن مواد محافظ انجمادی نفوذی به سوسپانسیون حاوی سلول، سلول‌ها با محیط هایپراسموتیک مواجه می‌شوند. سلول‌ها ابتدا چروکیده می‌شوند و آب از طریق غشای پلاسمایی خارج و مواد محافظ انجمادی وارد سلول می‌شوند. سلول‌ها، در طی حذف مواد محافظ انجمادی، ابتدا به دلیل ورود آب، متورم می‌شوند سپس هنگامیکه مواد محافظ انجمادی و آب، سلول را ترک می‌کنند به آرامی به حجم ایزواسموتیک برمی‌گردند. تکرار تغییرات در اسمولاریته محلول می‌تواند منجر به افت معنی‌دار در جنبایی اسپرم یا حتی مرگ سلول بدون افت در یکپارچگی غشای سلول شود [۶].

تنش اسمزی ناشی از انجماد، می‌تواند منجر به صدمه اکسیداتیو سلول شود. اگر تغییرات اسمولالیته قابل تحمل نباشد، اسپرم جنبایی خود را از دست می‌دهد. در محدوده فشار اسمزی ۳۶۰-۲۷۰ رقیق‌کننده، ۹۰ درصد جنبایی اسپرم گاو، حفظ شده است [۵]. در تحقیق حاضر، سطح گلیسرول بر غشای یکپارچه، فعال و طبیعی اسپرم‌ها، اثری نداشت، اما اثر فشار اسمزی بر این فراسنجه‌ها، معنی‌دار بود ($P < 0.05$ ؛ جدول ۴). درصد اسپرم با غشای فعال، در تیمارهای G5P350 (۲۵/۶۳ درصد) و G7P350 (۲۳/۱۴ درصد)، کمتر از سایر تیمارها بود ($P < 0.05$) ولی درصد اسپرم طبیعی در این دو تیمار (به ترتیب ۹۲/۵۷ و ۹۲/۳۴ درصد)، بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۵).

بعد از فرایند یخ‌گشایی، زمانیکه اسپرم بارگذاری شده با ماده محافظ انجمادی به یک محیط ایزواسموتیک (محیط آزمایشگاهی و یا دستگاه تناسلی جنس ماده) منتقل می‌شود، قبل از اینکه ماده محافظ انجمادی بتواند از سلول خارج شده و به تعادل برسد، جذب آب در سلول اسپرم منجر به افزایش ۲/۳ برابری در حجم آن می‌شود [۷]. برای کاهش صدمه به اسپرم، با اضافه کردن کلسترول به غشاهای اسپرم، دامنه تحمل اسمزی آن را نسبت به

تولیدات دامی

2. Chelucci S, Pasciu V, Succu S, Addis D, Leoni GG, Manca ME, Naitana S and Berlinguer F (2015) Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*. 83: 1064–1074.
3. Curry MR, Millar JD and Watson PF (1994) Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to confirm with empirical observations. *Biology of Reproduction*. 51: 1014–21.
4. Garzon-Perez C, Flores HF, Medrano A (2010) A simple osmotic stress test to predict boar sperm cryosurvival. *Cryo Letters*. 31(6):438-44.
5. Guthrie HD, Liu J and Critser JK (2002) Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 67:1811–1816.
6. Mazur P (1970) Cryobiology the freezing of biological systems. *Science*. 168: 939-944.
7. Moce E, Purdy E and Graham JK (2010) Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*. 118: 236–247.
8. Rasul Z, Ahmed N and Anzar M (2007) Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Theriogenology*. 68: 813-819.
9. Röpke T, Oldenhof H, Leiding C, Sieme H, Bollwein H and Wolkers WF (2011) Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology*. 76: 1465–1472.
10. Rosato MP and Iaffaldano N (2013) Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*. 79: 508–516.
11. SAS Institute, version 9.1 (2002) Cary, NC, USA.
12. Sitaula R, Elmoazzen H, Toner M and Bhowmick S (2009) Desiccation tolerance in bovine sperm: a study of the effect of intracellular sugars and the supplemental roles of an antioxidant and a chelator, *Cryobiology*. 58: 322–330.
13. Steinbach J and Foote RH (1967) Osmotic pressure and pH effects on survival of frozen bovine spermatozoa. *Journal Dairy Science*. 50: 205–213.
14. Woelders H, Mathijis A and Engel B (1997) Effects of trehalose, and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing, *Cryobiology*. 35: 93–105.