



فرمولاسیون جدید رقیق کننده انجماد اسپرم گاو توسط سطوح مختلف زرده تخم مرغ و سدیم دودسیل سولفات

ایرج اشرفی^۱، حسین دقیق کیا^۲، غلامعلی مقدم^۳ و عادل صابری‌وند^۴

۱- دانشجوی دکتری تخصصی گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز
۲- استاد گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز، (نویسنده مسوول: daghighkia@tabrizu.ac.ir)
۳ و ۴- استاد گروه علوم دامی و دانشیار گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز
تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۸

چکیده

ساختارهای بیوشیمیایی و آناتومیکی سلول اسپرم طی فرآیند انجماد اسپرم تحت تأثیر قرار می‌گیرند. لذا استفاده از مواد محافظ انجمادی در محیط انجماد، ضروری‌ترین بخش در فرآیند انجماد اسپرم می‌باشد. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر استفاده از سطوح مختلف زرده تخم مرغ (۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد) به‌عنوان ماده محافظ انجماد به همراه سطوح مختلف سدیم دودسیل سولفات (SDS) (صفر، ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد) به‌عنوان سورفکتانت بر اسپرم‌های منجمد یخ‌گشایی شده گاو هلشتاین می‌باشد. در این پژوهش از ۳ رأس گاو هلشتاین (۶-۸ ساله و میانگین وزن ۸۵۰ کیلوگرم) دو بار در هفته توسط واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شد. برای از بین بردن اثرات فردی دام‌ها، انزال‌ها به نسبت مساوی باهم مخلوط شدند. نمونه‌ها بعد از طی مراحل سردسازی و پر شدن در پایوت‌ها، در بخار ازلت منجمد شده و در ازلت مایع نگهداری شدند. نتایج بدست آمده بعد از یخ‌گشایی نشان داد که افزودن ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد SDS بر رقیق کننده حاوی درصد‌های مختلف زرده تخم مرغ موجب افزایش معنی‌دار درصد جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، درصد خطی بودن جنبایی، جنبایی عرضی سر، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، میانگین سرعت در مسیر، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده می‌شوند ($P < 0.05$). افزودن سطح ۰/۱ درصد SDS در رقیق کننده حاوی درصد‌های مختلف زرده تخم مرغ نسبت به سطح ۰/۰۵ درصد نتایج بهتری را همراه داشت. اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تیماری (۰/۱ + SDS + ۲۵ درصد زرده تخم مرغ) و (۰/۱ + SDS + ۱۵ درصد زرده تخم مرغ) مشاهده نشد. بطور کلی می‌توان ترکیب ۰/۱ + SDS + ۱۵ درصد زرده تخم مرغ را به‌عنوان موثرترین ترکیب زرده تخم مرغ و SDS بر اساس ارزیابی میکروسکوپی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاو پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: انجماد اسپرم، زرده تخم مرغ، سدیم دودسیل سولفات، سورفکتانت، گاو هلشتاین

مقدمه

در بی‌تقارنی فسفولیپیدها و دو لایه چربی غشا، تشکیل یخ درون سلولی و خارج سلولی، تغییرات ناگهانی دما، فشارهای اسمزی و استرس‌های سمی حاصل از مواجه شدن با محافظت کننده‌ها را تحمل می‌کنند (۱۷). در جریان فرآیند انجماد-ذوب، شوک سرمایی به شدت فسفولیپیدها و گلیکوپروتئین‌های موجود در سطح غشا را تحت تأثیر قرار داده و باعث شروع آسیب‌های ساختاری و بیوشیمیایی می‌شود. برای جلوگیری از بروز این آسیب‌ها به اسپرم، علاوه بر مواد محافظ درون‌سلولی، به مواد محافظ خارج سلولی نیز نیاز خواهد داشت. این مواد عمدتاً لیپوپروتئین‌ها و پروتئین‌های موجود در منابعی همچون زرده تخم مرغ، شیر و منابع گیاهی مثل شیر سویا و شیر نارگیل است. این مواد با عمل‌روزی غشاء سلولی، اسپرم را در برابر شوک سرما محافظت می‌کند (۲۵). استفاده از مواد محافظتی در غلظت‌های پایین ممکن است که برای حفاظت از اسپرم کافی نبوده و غلظت بالای آن‌ها نیز ممکن است که برای اسپرم سمی باشد.

زرده به‌عنوان یک بافر اسموتیک با حضور در رقیق کننده قادر است تحمل اسپرم را به هر دو نوع محیط‌های پیرتونیک و هایپوتونیک افزایش دهد (۲۶). با افزایش غلظت زرده تخم مرغ در رقیق‌کننده، اگرچه درصد اسپرم‌های زنده و متحرک افزایش می‌یابد ولی درصد اسپرم‌های با آکروزوم سالم کاهش می‌یابد (۱۰). ناحیه آکروزوم اسپرم، مهم‌ترین بخش شرکت کننده اسپرم در عمل لقاح است. بنابر این

حفاظت از انجماد منی روشی مناسب جهت نگهداری اسپرم به‌شمار می‌آید لیکن در طی فرآیند انجماد و یخ‌گشایی، سلول اسپرم با خطرانی مواجه بوده و مراحل اصلی حفاظت از انجماد مثل سردسازی، انجماد و یخ‌گشایی از نظر فراساختاری، عملکردی و بیوشیمیایی اثرات مضر روی آن داشته (۶) و منجر به تغییراتی در ویژگی‌های بیولوژیکی غشای پلاسمایی، سیتوپلاسم، اسکلت سلولی و ساختار ژنومی اسپرم شده که در نهایت باعث کاهش سلامت غشای پلاسمایی و آکروزومی، جنبایی، باروری، زنده‌مانی و نقص در انتقال اسپرم در دستگاه تولیدمثل ماده می‌گردد. سلول اسپرمی که وارد فرآیند حفاظت انجمادی می‌شود، به کاهش سریع دما از 30°C به 5°C حساس بوده و دچار شوک سرمایی شده و در پی آن تنفس سلولی، توانایی سنتز ATP، فعالیت متابولیسمی، سلامت غشاهای سلولی و آکروزومی، غشاهای میتوکندریایی و جنبایی سلول اسپرم کاهش یافته و نفوذپذیری انتخابی غشای اسپرم نسبت به کلسیم مختل و منجر به افزایش سطح کلسیم درون سلولی و نکروزیس اسپرم می‌گردد (۶). همچنین در حین انجماد و یخ‌گشایی سلول اسپرم، انواعی از استرس‌های بیوشیمیایی مانند کاهش لیپوپروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، پروتئین باند شده به کلاسترول، فعالیت پروتئولیتیک آکروزومی و کاهش سنتز ATP و استرس‌های مکانیکی مانند دهیدراسیون القا شده از انجماد، انتقالات فاز غشایی، اختلال

میلی لیتر گلیسرول، ۵۰ میکرو لیتر جنتامایسین، ۳۰ میکرو لیتر لینکوپیک و ۲/۵ میکرو لیتر تایلوزین و درصدهای مختلف زرده تخم مرغ و SDS بود. رقیق کننده ۱: ۱۵٪ زرده تخم مرغ + صفر % SDS (EY15S0)، ۲: ۲۰٪ زرده تخم مرغ + صفر % SDS (EY20S0)، ۳: ۲۵٪ زرده تخم مرغ + صفر % SDS (EY25S0)، ۴: ۱۵٪ زرده تخم مرغ + صفر % SDS (EY20S0.05)، ۵: ۲۰٪ زرده تخم مرغ + صفر % SDS (EY20S0.05)، ۶: ۲۵٪ زرده تخم مرغ + صفر % SDS (EY25S0.05)، ۷: ۱۵٪ زرده تخم مرغ + صفر % SDS (EY15S0.1)، ۸: ۲۰٪ زرده تخم مرغ + صفر % SDS (EY20S0.1) و ۹: ۲۵٪ زرده تخم مرغ + صفر % SDS (EY25S0.1).

اعمال تیمار، سردسازی، تعادل، بسته بندی و انجماد

پس از ارزیابی اولیه، نمونه های منی با غلظت ۵۰ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر محلول رقیق کننده به فاکتورهای حاوی سطوح مختلف زرده و SDS اضافه شده و در پایوت های ۵ ml / ۰ پر و بسته بندی شدند. پایوت ها روی راک چیده شده به دمای ۵°C منتقل شدند و پس از سپری کردن ۲ ساعت زمان تعادل در این دما توسط دستگاه نیمه اتوماتیک انجماد اسپرم منجمد شده و به تانک ازت مایع (دمای ۱۹۶°C-) انتقال یافته و تا زمان یخ گشایی در این دما نگهداری شدند (۴).

ارزیابی اسپرم بعد از یخ گشایی

ارزیابی تحرک اسپرم

بعد از یخ گشایی (۴۰ ثانیه در حمام آب گرم حاوی دمای ۳۷°C)، فراسنجه های تحرک کلی (TM)، تحرک پیش رونده (PM)، سرعت در مسیر میانگین (VCL)، سرعت در مسیر منحنی (VAP)، راستی مسیر طی شده (STR)، تناوب عرضی زنش (BCF)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL)، جنبایی عرضی سر (ALH) و خطی بودن جنبایی (LIN) ارزیابی شدند. ابتدا نمونه ها یخ گشایی شده و جهت تطابق پذیری و بازگشت آب درون سلولی، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷°C حمام آب گرم انکوبه شدند. سپس ۵ میکرو لیتر از نمونه روی لام از قبل گرم شده (در دمای ۳۷°C) قرار داده و بعد از پوشش با لام، روی صفحه گرم میکروسکوپ قرار داده شد. از هر نمونه حداقل ۱۰ فیلد بطور کاملاً تصادفی انتخاب و تعداد ۲۰۰ اسپرم بوسیله سیستم کاسا با بزرگنمایی ۱۰۰× آنالیز شدند.

درصد زنده مانی اسپرم

برای تعیین درصد اسپرم های زنده از روش رنگ آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. ابتدا ۵ میکرو لیتر از نمونه منی با ۵ میکرو لیتر رنگ (ائوزین ۱۶/۷ گرم/ لیتر آب مقطر، نیگروزین ۱۰۰ گرم/ لیتر آب مقطر، بافر سیترات ۲۹ گرم/ لیتر آب مقطر) روی لام به آرامی مخلوط و با لام دیگری گسترش تهیه شد. جهت خشک کردن، نمونه گسترش یافته به مدت سه دقیقه در دمای ۳۷°C قرار گرفت. تعداد ۲۰۰ اسپرم بوسیله میکروسکوپ نوری و روغن ایمرسیون با بزرگنمایی ۱۰۰۰× آنالیز شدند. اسپرم هایی که بطور کلی و جزئی رنگ قرمز مایل به بنفش به خود گرفته بودند مرده و

اسپرم هایی که آکروزوم آن ها آسیب دیده باشد به عنوان اسپرم های غیر بارور تلقی می شوند (۱). کاهش سلامت آکروزوم در اثر افزایش غلظت زرده تخم مرغ، در گونه های بز (۲۴)، قوچ (۲۹) و بوفالوی آبی (۱۵) ثابت شده است. علاوه بر این زرده تخم مرغ بطور طبیعی حاوی آلودگی هایی است که می تواند از طریق رقیق کننده های منی باعث انتقال آن شود (۱۱). این آلودگی ها نه تنها قادر به انتقال یک بیماری بوده بلکه میکروارگانیزم های موجود در آن ها با تولید سمومی می تواند بر روی اسپرم تأثیر گذاشته و باعث مرگ آن ها شوند (۳۰). بنابراین علیرغم اثرات بسیار مثبت زرده تخم مرغ برای محافظت از اسپرم، در سال های اخیر پژوهشگران به دنبال راهکاری برای حذف و یا کاهش مقدار زرده تخم مرغ در رقیق کننده های منی پستانداران هستند. زرده تخم مرغ به عنوان محافظت کننده اصلی انجماد، نمی تواند بطور کامل در رقیق کننده انجماد حل شود. افزودن سولفات دودسیل سدیم (SDS) موجب افزایش حلالیت زرده می شود (۲۷). بررسی های گوناگون در گونه های مختلف نشان داده اند که افزودن SDS به محیط رقیق کننده حاوی زرده تخم مرغ می تواند باعث محافظت اسپرم از آسیب های ناشی از انجماد شود. بنابراین در این پژوهش تأثیر استفاده از غلظت های مختلف زرده تخم مرغ به همراه غلظت های مختلف SDS به منظور دستیابی به بهترین دوز مربوطه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جمع آوری منی

در این پژوهش از سه رأس گاو هلشتاین (۶-۸ ساله و میانگین وزن ۸۵۰ کیلوگرم) که از جیره غذایی یکسان و دسترسی آزاد به آب آشامیدنی بهره مند بودند با استفاده از واژن مصنوعی دو بار در هفته اسپرم گیری شد. برای از بین بردن اثرات فردی دام های نر، به تعداد مساوی از سلول های اسپرم هر سه رأس دام نر در هر تکرار آزمایشی مخلوط و استفاده شدند. تمام اجزای واژن مصنوعی بمدت حداقل یک ساعت در دمای ۴۰°C گرم شدند. دمای داخلی واژن مصنوعی ۴۲-۴۵°C بود و همچنین برای سهولت دخول آلت تناسلی دام نر، سطح داخلی واژن با وازلین آغشته شده بود. نمونه های منی جمع آوری شده بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب ۳۴°C قرار داده شدند. نمونه ها از نظر حجم، رنگ، عدم آلودگی به ادرار و خون، غلظت و تحرک پیش رونده بررسی شده و نمونه های منی دارای رنگ کرمی تیره، حجم بین ۵-۱۲ میلی لیتر، غلظت بیشتر از یک میلیارد اسپرم در هر یک میلی لیتر نمونه منی و تحرک پیش رونده بالاتر از ۷۰ درصد در این تحقیق استفاده شد. غلظت اسپرم بوسیله دستگاه فتومتر و درصد تحرک پیش رونده با سیستم کاسا تعیین شد (۱۲،۱۳).

تهیه رقیق کننده

در این تحقیق از ۹ رقیق کننده بر پایه تریس-زرده تخم مرغ استفاده شد. ۱۰۰ میلی لیتر این محلول حاوی ۲/۴۲ گرم تریس، ۱/۴۸ گرم اسیدسیتریک، ۱ گرم فروکتوز، ۶/۴

1- Total Motility (TM)

4- Average Path Velocity (micron/sec) (VAP)

7- Straight - line Velocity (micron/sec) (VSL)

9- Linearity (%), LIN=(VSL/VCL)x100

2- Progressive Motility (PM)

5- Sperm Track Straightness (%) (STR)

8- Lateral head displacement (micron) (ALH)

3- Curvilinear Velocity (micron/sec) (VCL)

6- Beat Cross Frequency (BCF)

در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان داد استفاده از رقیق کننده حاوی سطوح مختلف SDS تاثیر معنی داری روی تمامی پارامترهای جنبایی و کنتیکی به جز پارامترهای راستی مسیر طی شده و تناوب عرضی زنش دارد. استفاده از رقیق کننده های EY25S0.1 و EY15S0.05 موجب بهبود معنی دار جنبایی کل نسبت به گروه های EY15S0، EY20S0، EY25S0.1 و EY25S0.05 شد ($P < 0.05$) ولی این بهبود نسبت به سایر گروه های تیماری معنی دار نیست. جنبایی پیش رونده اسپرم های منجمد-یخ گشایی شده توسط رقیق کننده های EY25S0.1 و EY25S0.05 نسبت به سایر گروه های تیماری به شکل معنی داری بیشتر بود ($P < 0.05$) ولی این اختلاف نسبت به گروه EY20S0.1 معنی دار نبود. بیشترین مقادیر برای صفات جنبایی عرضی سر، سرعت در مسیر منحنی، سرعت در مسیر مستقیم و میانگین سرعت در مسیر با استفاده از رقیق کننده EY15S0.1 حاصل شد که اختلاف آن با گروه های EY20S0.1 و EY25S0.1 معنی دار نبوده ولی نسبت به سایر گروه های تیماری بهبود معنی داری را نشان می دهد ($P < 0.05$). درصد خطی بودن جنبایی نیز در گروه EY15S0 نسبت به سایر گروه های تیماری پایین تر است که این اختلاف نسبت گروه های EY20S0.05، EY15S0.1، EY20S0.1 و EY25S0.1 معنی دار بوده ($P < 0.05$) ولی نسبت به سایر گروه های تیماری معنی دار نبود. نتایج حاصل از آنالیز داده ها برای فراسنجه های زنده مانده در شکل ۱ آمده است. بیشترین درصد زنده مانده با استفاده از رقیق کننده EY25S0.1 حاصل شد که این اختلاف نسبت به گروه های EY25S0، EY15S0 و EY15S0.05 معنی دار بوده ($P < 0.05$) ولی نسبت به سایر گروه های تیماری معنی دار نبود.

اسپرم هایی که رنگ به خود نگرفته بودند زنده محسوب شدند (۹).

تست یکپارچگی غشای پلاسمایی (تست HOST)

این تست برای بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول اسپرم بکار گرفته شد. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه منی به آرامی با ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک همدم (حاوی ۹ گرم / لیتر فروکتوز، ۴/۹ گرم / لیتر سترات سدیم) مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم (۳۷°C) انکوبه شد. سپس مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه مخلوط شده و روی لام از پیش همدم شده قرار گرفته و با لام پوشانده شد. لام روی صفحه گرم میکروسکوپ فاز کنتراست قرار داده شد. تعداد ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی $\times 400$ شمارش و درصد اسپرم با دم متورم و تاب خورده (طبیعی) تعیین و به عنوان درصد پاسخ به محلول هیپواسموتیک ثبت شد (۲۳).

آنالیز آماری

این پژوهش در پنج تکرار انجام شد. داده های حاصل از این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی به کمک نرم افزار SAS رویه GLM تجزیه و تحلیل شد. مقایسه میانگین ها به روش دانکن انجام شد. سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. مدل آماری این طرح عبارت بود از:

$$Y_{ij} = \mu + \text{Treat}_i + e_{ij}$$

که در این مدل، Y_{ij} برابر است با داده مشاهده شده برای فراسنجه های اندازه گیری شده، μ : میانگین جامعه، Treat_i : اثر تیمار i م برابر است با اثر تیمار، و e_{ij} : اثر باقیمانده یا خطا بود.

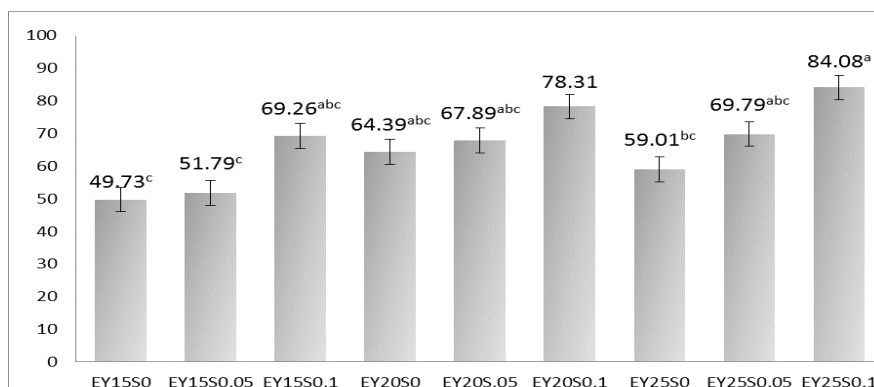
نتایج و بحث

نتایج حاصل از آنالیز داده ها برای فراسنجه های تحرک

جدول ۱- مقایسه پارامترهای تحرکی و کنتیکی اسپرم منجمد-یخ گشایی شده گاو توسط رقیق کننده های حاوی سطوح مختلف زرده تخم مرغ و SDS
Table 1. Comparison of motility and kinetic parameters of freeze-thawed bull sperm via extenders containing different doses of egg-yolk and SDS

EY25S0.1	EY20S0.1	EY15S0.1	EY25S0.05	EY20S0.05	EY15S0.05	EY25S0	EY20S0	EY15S0	صفات
۷۹/۵۳ ± ۸/۵ ^a	۷۴/۶۸ ± ۱۱/۶ ^{abc}	۷۸/۵۹ ± ۹/۵ ^{ab}	۶۵/۹۱ ± ۱۵/۹ ^{abcd}	۶۱/۹۱ ± ۷/۷ ^{bcd}	۴۹/۱۶ ± ۱۱/۸ ^d	۵۵/۵۰ ± ۱۷/۲ ^{de}	۵۹/۹۷ ± ۱۴/۹ ^{cde}	۴۵/۳۸ ± ۶/۵ ^c	جنبایی (درصد)
۴۳/۰۸ ± ۳/۹ ^a	۳۸/۷۷ ± ۱۳/۸ ^{ab}	۴۵/۵۳ ± ۹/۴ ^a	۳۱/۰۸ ± ۸/۶ ^{bc}	۲۹/۱۴ ± ۵/۷ ^{bcd}	۲۱/۰۸ ± ۶/۱ ^{cd}	۲۲/۷۷ ± ۷/۷ ^{cd}	۲۸/۶۳ ± ۹/۲ ^{bcd}	۱۸/۷ ± ۴/۳ ^d	جنبایی پیش رونده (درصد)
۰/۷۹ ± ۰/۰۰۴ ^a	۰/۷۸ ± ۰/۰۳۳ ^a	۰/۸۰ ± ۰/۰۲۴ ^a	۰/۷۶ ± ۰/۰۳۹ ^a	۰/۷۸ ± ۰/۰۱۷ ^a	۰/۷۷ ± ۰/۰۴۰ ^a	۰/۷۷ ± ۰/۰۳۴ ^a	۰/۷۷ ± ۰/۰۲۹ ^a	۰/۷۶ ± ۰/۰۲۷ ^a	راستی مسیر طی شده (درصد)
۸۰/۳۹ ± ۷/۰ ^{ab}	۷۳/۹۹ ± ۲۰/۵۴ ^{abc}	۸۷/۰۶ ± ۱۳/۶ ^a	۶۴/۴۶ ± ۱۴/۶ ^{bcd}	۵۸/۳۳ ± ۷/۶ ^{cde}	۴۶/۳۹ ± ۱۰/۳ ^e	۴۷/۲۷ ± ۱۳/۷ ^{de}	۵۷/۰۰ ± ۱۴/۰ ^{cde}	۴۳/۵۵ ± ۶/۹ ^e	سرعت در مسیر منحنی (میکرون/ثانیه)
۱/۵۷ ± ۰/۲۳ ^{ab}	۱/۴۴ ± ۰/۳۴ ^{ab}	۱/۶۱ ± ۰/۲۷ ^a	۱/۲۵ ± ۰/۲۵ ^{bc}	۱/۰۵ ± ۰/۱۶ ^{cde}	۰/۸۵ ± ۰/۱۶ ^{de}	۰/۸۹ ± ۰/۲۶ ^{de}	۱/۰۸ ± ۰/۲۹ ^{cd}	۰/۷۲ ± ۰/۰۷ ^e	جنبایی عرضی سر (میکرون)
۳۶/۰۰ ± ۲/۸ ^{ab}	۳۳/۴۱ ± ۱۱/۶ ^{abc}	۳۹/۱۷ ± ۷/۲ ^a	۲۹/۱۷ ± ۷/۸ ^{bcd}	۲۷/۰۵ ± ۴/۰ ^{bcd}	۱۹/۹۷ ± ۵/۱ ^{de}	۲۱/۲۹ ± ۶/۱ ^{de}	۲۶/۱۶ ± ۷/۲ ^{cd}	۱۶/۶۸ ± ۳/۴ ^e	سرعت در مسیر مستقیم منحنی (میکرون/ثانیه)
۴۰/۹۴ ± ۳/۳ ^{ab}	۳۷/۸۰ ± ۱۷/۶ ^{abc}	۴۴/۳۳ ± ۷/۹ ^a	۳۲/۹۷ ± ۸/۷ ^{bcd}	۳۰/۴۸ ± ۴/۳ ^{cd}	۲۲/۶۸ ± ۵/۸ ^{de}	۲۴/۱۵ ± ۷/۰ ^{de}	۲۹/۵۵ ± ۸/۲ ^{cde}	۱۹/۷۲ ± ۳/۱ ^e	میانگین سرعت در مسیر منحنی (میکرون/ثانیه)
۰/۳۸ ± ۰/۰۳۶ ^a	۰/۳۷ ± ۰/۰۵۶ ^a	۰/۳۸ ± ۰/۰۲۴ ^a	۰/۳۵ ± ۰/۰۵۷ ^{ab}	۰/۲۷ ± ۰/۰۲۷ ^a	۰/۲۳ ± ۰/۰۴۷ ^{ab}	۰/۳۶ ± ۰/۰۴۶ ^{ab}	۰/۳۶ ± ۰/۰۴۷ ^{ab}	۰/۳۱ ± ۰/۰۳۱ ^b	درصد خطی بودن جنبایی
۱۴/۱۵ ± ۰/۵ ^{ab}	۱۲/۲۳ ± ۲/۷ ^b	۱۵/۳۰ ± ۰/۵ ^a	۱۴/۲۴ ± ۱/۰ ^{ab}	۱۴/۶۳ ± ۰/۷ ^{ab}	۱۳/۹۴ ± ۱/۱ ^{ab}	۱۴/۸۰ ± ۰/۵ ^{ab}	۱۴/۲۶ ± ۰/۶ ^{ab}	۱۴/۰۳ ± ۱/۷ ^{ab}	تناوب عرضی زنش (هرتز)

۱۵٪ زرده تخم مرغ + صفر (EY15S0)، ۲۰٪ زرده تخم مرغ + صفر (EY20S0)، ۲۵٪ زرده تخم مرغ + صفر (EY25S0)، ۱۵٪ زرده تخم مرغ + SDS ۰/۰۵ (EY20S0.05)، ۲۰٪ زرده تخم مرغ + SDS ۰/۰۱ (EY20S0.1) و ۲۵٪ زرده تخم مرغ + SDS ۰/۰۱ (EY25S0.1). حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین سطوح است ($P < 0.05$).

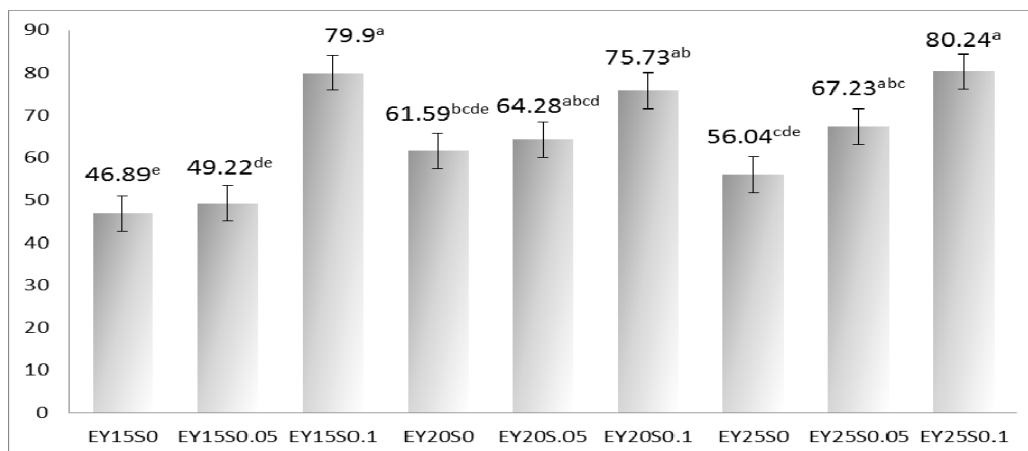


شکل ۱- مقایسه درصد زنده‌مانی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاو توسط رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ و SDS. ۱۵٪ زرده تخم‌مرغ + صفر٪ SDS (EY15S0)، ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ + صفر٪ SDS (EY20S0)، ۲۵٪ زرده تخم‌مرغ + صفر٪ SDS (EY25S0)، ۱۵٪ زرده تخم‌مرغ + ۰.۰۵٪ SDS (EY15S0.05)، ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ + ۰.۰۵٪ SDS (EY20S0.05)، ۲۵٪ زرده تخم‌مرغ + ۰.۰۵٪ SDS (EY25S0.05)، ۱۵٪ زرده تخم‌مرغ + ۰.۱٪ SDS (EY15S0.1)، ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ + ۰.۱٪ SDS (EY20S0.1) و ۲۵٪ زرده تخم‌مرغ + ۰.۱٪ SDS (EY25S0.1). حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح است (P < ۰.۰۵).

Figure 1. Comparison of viability of freeze-thawed bull sperm via extenders containing different doses of egg-yolk and SDS. EY15S0: 15% Egg-yolk+ 0% SDS, EY20S0: 20% Egg-yolk+ 0% SDS, EY25S0: 25% Egg-yolk+ 0% SDS, EY15S0.05: 15 Egg-yolk+ 0.05% SDS, EY20S0.05: 20 Egg-yolk+ 0.05% SDS, EY25S0.05: 25 Egg-yolk+ 0.05% SDS, EY15S0.1: 15 Egg-yolk+ 0.1% SDS, EY20S0.1: 20 Egg-yolk+ 0.1% SDS, EY25S0.1: 25 Egg-yolk+ 0.1% SDS. Different superscripts within rows differ significantly, p < 0.05.

حاصل شد که دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه‌های فاقد SDS و EY15S0.05 بوده (P < ۰.۰۵) ولی با سایر گروه‌های تیماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها برای فراسنجه یکپارچگی غشای پلاسمایی در نمودار ۲ آمده است. بیشترین درصد اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده دارای غشای پلاسمایی سالم توسط رقیق‌کننده‌های EY15S0.1 و EY25S0.1



شکل ۲- مقایسه درصد یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاو توسط رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ و SDS. ۱۵٪ زرده تخم‌مرغ + صفر٪ SDS (EY15S0)، ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ + صفر٪ SDS (EY20S0)، ۲۵٪ زرده تخم‌مرغ + صفر٪ SDS (EY25S0)، ۱۵٪ زرده تخم‌مرغ + ۰.۰۵٪ SDS (EY15S0.05)، ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ + ۰.۰۵٪ SDS (EY20S0.05)، ۲۵٪ زرده تخم‌مرغ + ۰.۰۵٪ SDS (EY25S0.05)، ۱۵٪ زرده تخم‌مرغ + ۰.۱٪ SDS (EY15S0.1)، ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ + ۰.۱٪ SDS (EY20S0.1) و ۲۵٪ زرده تخم‌مرغ + ۰.۱٪ SDS (EY25S0.1). حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح است (P < ۰.۰۵).

Figure 2. Comparison of plasma membrane integrity of freeze-thawed bull sperm via extenders containing different doses of egg-yolk and SDS. EY15S0: 15% Egg-yolk+ 0% SDS, EY20S0: 20% Egg-yolk+ 0% SDS, EY25S0: 25% Egg-yolk+ 0% SDS, EY15S0.05: 15 Egg-yolk+ 0.05% SDS, EY20S0.05: 20 Egg-yolk+ 0.05% SDS, EY25S0.05: 25 Egg-yolk+ 0.05% SDS, EY15S0.1: 15 Egg-yolk+ 0.1% SDS, EY20S0.1: 20 Egg-yolk+ 0.1% SDS, EY25S0.1: 25 Egg-yolk+ 0.1% SDS. Different superscripts within rows differ significantly, p < 0.05.

استفاده می‌شود موجب بهبود زنده‌مانی سلول اسپرم می‌شود (۳). مطالعات پیشین ثابت کرده‌اند که SDS خاصیت محافظ خوبی برای غشای آکروزوم دارد ولی این تاثیر مثبت زمانی آشکار می‌شود که SDS به همراه زرده تخم‌مرغ به رقیق‌کننده انجماد افزوده شود. زیرا SDS با اعمال تغییرات در لیپوپروتئین‌های زرده تخم‌مرغ تاثیر مثبت خود را نشان می‌دهد (۲۰).

اینکه چگونه SDS موجب حفاظت از اسپرم‌ها در طی فرآیند انجماد-یخ‌گشایی می‌شود هنوز کاملاً مشخص نشده است. تصور می‌شود که سورفکتانت با افزایش حلالیت، موجب افزایش پراکندگی گلبول‌های زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده شده و موجب افزایش تماس مواد محافظتی زرده تخم‌مرغ با غشای سلول‌های اسپرم شده (۲۷) بنابراین موجب افزایش تاثیر محافظتی زرده تخم‌مرغ می‌شود. افزودن SDS به رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ، بدون ایجاد تغییر در ترکیب پروتئین‌های آن موجب ایجاد محیط آبریزی می‌شود که معمولاً در غشاهای بیولوژیکی وجود دارد (۲).

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که استفاده از سطوح بالاتر SDS می‌تواند اثرات منفی بر اسپرم داشته باشد. زمانیکه از سطوح بالاتر SDS استفاده می‌شود میزان مولکول‌های آزاد SDS افزایش می‌یابد که این مولکول‌های آزاد می‌توانند به‌طور مستقیم با غشای اسپرم باند شده و اثرات منفی داشته باشند (۷). آکسز و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که تاثیرات سمی SDS در زمان انکوباسیون طولانی مدت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده با رقیق‌کننده حاوی SDS موجب کاهش جنبایی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم می‌شود ولی با توجه به اینکه رقیق‌کننده انجماد در هنگام تلقیح مصنوعی توسط مایعات رحمی رقیق‌تر می‌شود، اثرات سمی SDS نمی‌تواند در رحم باقی بماند (۵).

در این پژوهش افزودن سدیم دو دسیل سولفات به‌عنوان سورفکتانت در رقیق‌کننده انجماد اسپرم بر مبنای زرده تخم‌مرغ موجب بهبود فراسنجه‌های حرکتی، کنتیکتی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده گاو شده است. بنابر پیشنهاد می‌شود در پژوهش آتی ارزیابی توانایی باروری اسپرم‌های منجمد شده با رقیق‌کننده حاوی ۱۵ درصد زرده تخم‌مرغ به همراه ۰/۱ درصد سورفکتانت سدیم دودسیل سولفات مورد بررسی قرار گیرد.

امروزه کاملاً مشخص شده است که فرآیند انجماد-یخ‌گشایی، آسیب‌های برگشت‌ناپذیری را به سلول اسپرم بخصوص در غشای پلاسمایی، غشای آکروزومی و میتوکندری اسپرم تحمیل می‌کند. تحت بهترین شرایط انجماد، حدود نیمی از سلول‌های زنده، جنبایی خود را بعد از انجماد حفظ می‌کنند (۱۵، ۱۸). بنابراین بهبود تکنیک‌های انجماد اسپرم با کاهش آسیب‌های ناشی از انجماد در صنعت اصلاح نژاد بسیار حائز اهمیت خواهد بود (۲۸). بر اساس بررسی‌های انجام شده تاکنون پژوهشی مبنی بر تعیین استفاده از سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ و سورفکتانت در راستای انتخاب بهترین سطح برای انجماد اسپرم گاو صورت نگرفته است. در این مطالعه افزودن سدیم دو دسیل سولفات به‌عنوان سورفکتانت در رقیق‌کننده انجماد اسپرم بر مبنای زرده تخم‌مرغ موجب بهبود پارامترهای حرکتی، کنتیکتی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده گاو شده است که با نتایج مطالعات پیشین که روی سایر گونه‌های دامی انجام گرفته است همخوانی دارد. دودیت و همکاران (۷) نشان دادند که انجماد اسپرم موش توسط رقیق‌کننده حاوی ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ و ۰/۰۳۵ SDS می‌تواند باعث حفظ جنبایی و ظرفیت باروری اسپرم شود. پورسل و همکاران (۲۲) گزارش کردند که افزودن سدیم و تریتانول‌آمین لاریل سولفات به‌عنوان دترجنت‌های سنتتیک به رقیق‌کننده بلتسویل موجب بهبود جنبایی، یکپارچگی آکروزوم و ظرفیت باروری اسپرم‌های بز می‌شود. افزودن سورفکتانت به رقیق‌کننده موجب افزایش جنبایی اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده اسب می‌شود (۱۶). افزودن سدیم و تریتانول‌آمین لاریل سولفات به رقیق‌کننده، موجب تقویت جنبایی سلولی و یکپارچگی آکروزوم می‌شود (۲۱). همچنین افزودن تریتانول‌آمین لاریل سولفات به رقیق‌کننده می‌تواند موجب بهبود حفاظت از انجماد اسپرم گاو شود. اسپرم‌های قوچ منجمد شده توسط رقیق‌کننده‌های مختلف حاوی زرده تخم‌مرغ و تریتانول‌آمین لاریل سولفات، بهترین زنده‌مانی را بعد از یخ‌گشایی داشتند. مطالعات پیشین گزارش کرده‌اند که تاثیرات مثبت SDS بر جنبایی و یکپارچگی آکروزوم اسپرم موجب افزایش معنی‌دار نرخ باروری در گونه‌های بز (۱۴)، خوک (۲۲)، گوسفند (۸) و موش (۱۹) شده است. سدیم دو دسل سولفات به‌عنوان سورفکتانت موجب تثبیت غشای سلول به خصوص غشای آکروزوم اسپرم شده و با محافظت اسپرم در برابر اثرات توکسیک گلیسرولی که در رقیق‌کننده انجماد

منابع

1. Amirat, L., L. Jeanneau, C. Thorin, O. Gerard, J.L. Courtens and M. Anton. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 6: 895-907.
2. Anton, M., R. Huopalahti, R. Lopez-Fandiño and R. Schade. 2007. Low-density lipoproteins (LDL) or lipovitellenin fraction. In: M. Anton (Ed.) *Bioactive egg compounds*. Springer-Verlag, Berlin, pp: 7-12.
3. Arriola, J. and R.H. Foote. 1987. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *Journal of Dairy Science*, 70(8): 1664-1670.
4. Ashrafi, I., H. Kohram and F. Farrokhi Ardabili. 2013. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 139: 25-30.
5. Axné, E., U. Hermansson and C. Linde-Forsberg. 2004. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 84: 179-191.
6. Bailey, J.L., J.F. Bilodeau and N. Cormier. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21: 7-1.
7. Dewit, M., W.S. Marley and J.K. Graham. 2000. Fertilizing potential of mouse spermatozoa cryopreserved in a medium containing whole eggs. *Cryobiology*, 40: 36-45.
8. El-Alamy, M.A. and R.H. Foote. 2001. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset ram in multiple semen extenders. *Animal Reproduction Science*, 65: 245-254.
9. Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1987. Handling and examination semen. In: Maxwell, W.M.C. (Ed.), *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goat*. Butterworths, Sydney, pp: 93-106.
10. Fukui, Y., H. Kohno, T. Togari, M. Hiwasa and K. Okabe. 2008. Fertility after artificial insemination using soybean-based extenders in sheep. *Journal of Reproduction and Development*, 54: 286-289.
11. Gil, J., M. Rodriguez-Iraozqui, N. Lundeheim, L. Soderquist and H. Rodriguez-Martinez. 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, 59: 1157-70.
12. Gil, J., N. Lundeheim, L. Soderquist and H. Rodriguez-Martinez. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, 59, 1241-1255.
13. Gillan, L. and W.M.C. Maxwell. 1999. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement*, 54: 271-283.
14. Julian S.M., T.D. Adolf, P.P. Antonio, D. Jesus, G. B. Amelia and L. S. Antonio. 2006. Effect of egg yolk concentration on cryopreserving Spanish ibex (*Copra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 66: 1219-1226.
15. Kumar, S., K.L. Sahni and G. Mohan. 1993. Effect of different extender formulations on acrosomal maintenance of buffalo spermatozoa frozen in milk, Tris and sodium-citrat dilutor. *Indian Journal of Animal Sciences*, 63:1233-1239.
16. Martin, J.C., E. Klug and A.R. Gunzel. 1979. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Rertility, Supplement*, 27:47-51.
17. Matsuoka, T., H. Imai, H. Kohno and Y. Fukui. 2006. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, 52: 83-675.
18. Ortman, K. and H. Rodriguez-Martinez. 1994. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. *Journal of Veterinary Medicine A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 41: 37-47.
19. Pellicer-Rubio, M.T. and Y. Combarrous. 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase buspg60. *Journal of Reproduction and Fertility*, 112: 95-105.
20. Peña, A. and C. Linde-Forsberg. 2000. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54: 859-875.
21. Pontbriand, D., J.G. Howard, M.C. Schiewe, L.D. Stuart and D.E. Wildt. 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26:341-54.
22. Pursel, V.G., L.L. Schulman and L.A. Johnson. 1978. Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *Journal of Animal Science*, 47: 198-202.
23. Revell, S.G. and R.A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36: 77-86.
24. Ritar, A.J. and S. Salamon. 1991. Effect of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angoras goat spermatozoa. *Small Ruminant Research*, 4: 29-37.
25. Salamon, S. and W.M.C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37:185-249
26. Smirnov, I.V. 1976. More importance to be given to the problem of dilution and storage of ram semen. *Ovtsevodstvo*, 1: 38-39
27. Tsutsui, T., M. Hase, T. Hori, T. Ito and E. Kawakami. 2000. Effects of orvus ES paste on canine spermatozoa longevity after freezing and thawing. *Journal of Veterinary Medical Science*. 62: 533-5.
28. Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility, and Development*, 7: 871-891.
29. Watson, P.F. and I.C. Martin. 1975. The influence of some fraction of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C. *Australian Journal of Biological Sciences*, 238: 145-152.
30. Williamson, G. and C. Manach. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 243-255.

New Formulation of Bull Semen Freezing Extender via Egg Yolk and Sodium Dodecyl Sulphate

Iraj Ashrafi¹, Hossein Daghigh Kia², Gholamali Moghaddam³ and Adel Saberivand⁴

1- Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, University of Tabriz

2- Professor, Department of Animal Science, University of Tabriz

(Corresponding author: daghighkia@tabrizu.ac.ir)

3 and 4- Professor, Department of Animal Science and Associate Professor Department of Clinical Sciences Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz

Received: October 27, 2016

Accepted: May 29, 2017

Abstract

During the semen cryopreservation, various biochemical and anatomical compartments in the sperm cells may be altered. Therefore, the most important part of sperm-freezing protocols is use of cryoprotectant agents in freezing. The aim of this study was to determine the effect of different dosage of egg yolk (15, 20 and 25 %) as natural a cryoprotectant plus different dosage of sodium dodecyl sulphate (0, 0.05 and 0.1 %) as surfactant on quality cryopreserved Holstein bull sperm. In this study Semen was collected from three mature Holstein bulls twice a week using an artificial vagina and pooled ejaculates equally in order to eliminate the individual effects. After cooling, filling and sealing of the samples, they were frozen with nitrogen vapor and immersed in liquid. Results showed that semen extender with base of different dosage of egg yolk supplemented with various doses of SDS (0.05 and 0.1 %) increased ($p < 0.05$) total motility, progressive motility, linearity, lateral head displacement, straight linear velocity, curvilinear velocity, average path velocity, viability, integrity of the sperm membrane after the freeze-thawing process. Usage of 0.1% SDS with different dosage of egg yolk had higher value rather than 0.05% of SDS. whereas, there were no significant difference between 0.1% SDS +25% egg yolk and 0.1% SDS + 15% egg yolk, in conclusion, it could be suggested that the most effective combination of egg yolk and SDS in microscopic evaluations of the bull sperm freezing extender is 0.1% SDS + 15% egg yolk.

Keywords: Egg yolk, Holstein bull, Sperm freezing, Sodium dodecyl Sulphate, Surfactant