نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۶ شماره ۳/ سال۱۳۹۵

تأثیر سطوح مختلف قند ترهالوز بر فراسنجه‌های اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده‌ی قوچ‌های مختلف در مدت نگهداری و در فصل تولید مثلی

پریسا دولتی دورباش[۱]، غلامعلی مقدم[۲*] و حسین احمدیان[۱]

تاریخ دریافت:۹٤/٤/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/٤

[۱] فارغ التحصل کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

[۲] استادگروه علوم دامی دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبه:Email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: تلقیح مصنوعی در گوسفند با منی منجمد- یخ‌گشایی شده دارای باروری پایین می‌باشد، زیرا انجماد اسپرم قوچ مشکل است. **هدف**: مطالعه‌ی تأثیر سطوح مختلف قند ترهالوز روی فراسنجه‌های اسپرم منجمد- یخ‌گشایی شده در قوچ‌های قزل، قزل- مرینوس و مرینو- مغانی، در مدت ۱۵ روز نگهداری بود. **روش‌کار**: شش رأس قوچ بالغ برای اسپرم‌گیری استفاده شد. پس از اسپرم‌گیری و ارزیابی اولیه نمونه‌ها رقیق شدند. برای رقیق‌سازی از رقیق‌کننده‌ی بر پایه‌ی تریس که سه گروه حاوی سطوح ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز، و یک گروه بدون ترهالوز به عنوان گروه شاهد استفاده شد. در نهایت تا دمای ۵ درجه‌سانتی‌گراد خنک‌سازی، داخل نیتروژن مایع منجمد و تا ۱۵ روز نگهداری شدند؛ نمونه‌ها همه روزه برای ویژگی‌هایی چون درصد تحرک، حرکت پیشرونده، درصد اسپرم‌های زنده و ناهنجار ارزیابی شدند. **نتایج**: سطح ۷۵ میلی‌مولار ترهالوز بیشترین درصد اسپرم‌های زنده و گروه ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز بیشترین درصد تحرک و حرکت پیشرونده را دارا بودند ($P<۰/۰۵$). همچنین استفاده از رقیق‌کننده‌ی حاوی ترهالوز تأثیر معنی‌داری روی درصد اسپرم‌های ناهنجار نداشت ($P<۰/۰۵$). **نتیجه‌گیری نهایی**: در طی ۱۵ روز ارزیابی، ویژگی‌های رقیق‌کننده‌ی حاوی قند ترهالوز با شیب کمتری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. در بین قوچ‌های مورد آزمایش، برای درصد اسپرم‌های زنده نژاد قزل بهتر از قزل- مرینوس و مرینو- مغانی بود، و برای درصد تحرک و حرکت پیشرونده و درصد اسپرم‌های ناهنجار گروه قزل- مرینوس بهتر از نژاد قزل و مرینو- مغانی بود. نتایج نشان داد، استفاده از ترهالوز موجب بهبود ویژگی منی منجمد می‌شود، همچنین اسپرم نژاد قزل و قزل- مرینوس هنگام استفاده از قند ترهالوز شایستگی بیشتری برای نگهداری به صورت منجمد دارد.

واژگان کلیدی: تلقیح مصنوعی، رقیق‌کننده، قوچ، منی منجمد

مقدمه

از زمانی که تلقیح مصنوعی برای اولین بارمطرح شد، حفظ مایع منی در دام‌های اهلی نیز مورد توجه قرار گرفت (سالامون و مکس‌ول ۱۹۹۵). تلقیح مصنوعی موفق متأثر از عوامل متعددی می‌باشد، که یکی از اصلی‌ترین آن‌ها، دسترسی به اسپرم‌های بارور بوده و اسپرم‌های بارور تنها در یک فرآیند انجماد موفق بدست می‌آیند (واتسون ۲۰۰۰). انجماد به عنوان تکنیکی برای

ذخیره منی قوچ دارای مزایای بسیاری است، اگرچه فرایند انجماد و یخ‌گشایی برخی اثرات مضر در ساختار اسپرم و آسیب عملکردی و بیوشیمیایی القا می‌کند. تخریب غشای پلاسمایی اسپرم موجب از دست دادن برگشت‌ناپذیر عملکرد آن می‌شود. به دلیل بالا بودن میزان اسیدهای چرب غیراشباع در غشای پلاسمایی، اسپرم پستانداران نسبت به تنش اکسیداتیو حساس‌تر است. زنده ماندن اسپرم در اثر انجماد و یخ- گشایی تحت تأثیر بسیاری از فاکتورها از جمله ترکیبات محیط انجماد می‌باشد (نالی و آرفیانتی ۲۰۱۱). یکی از علل اصلی تخریب و مرگ سلولی در طی انجماد تشکیل یخ داخل و خارج سلولی می‌باشد. عمل اولیه‌ی حفاظت-کننده‌ها کاهش سرعت تشکیل یخ و اندازه کریستال یخ می‌باشد. با مقدار کافی حفاظت‌کننده‌ها تخریب انجمادی می‌تواند حداقل شود. در حالیکه غلظت بالای آن می‌تواند موجب تخریب و مسمومیت اسمزی شود (می‌یرس ۲۰۱۲). برای کاهش اثرات زیان‌آور گلیسرول در قوچ می‌توان از ترکیب گلیسرول با قند و افزایش فشار اسمزی رقیق‌کننده استفاده کرد (سویلو و همکاران ۲۰۰۷).

ترهالوز یک دی‌ساکارید تشکیل شده از دو مولکول گلوکز است، که از طریق یک پیوند آلفا، آلفا-۱،۱ بهم متصل شده‌اند. از آنجاییکه گلیکوزیل احیا به‌هم متصل شده‌اند، ترهالوز قدرت احیا ندارد. ترهالوز به طور گسترده در طبیعت وجود دارد و یکی از منابع انرژی شناخته‌شده در بدن اکثر ارگانیسم‌های زنده بوده و می‌تواند در بسیاری از ارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، حشرات، گیاهان و بی‌مهرگان یافت شود. ترهالوز از بدن موجودات زنده در برابر تنش‌های مختلف مانند خشکی، انجماد و فشار اسمزی حفاظت می‌کند. موجودات غیر آبزی از طریق تولید مقدار زیادی ترهالوز قادر به تحمل کمبود آب می‌باشند، و ترهالوز در ثبات غشا و دیگر مجموعه‌های ماکرومولکولی تحت شرایط حاد زیست‌محیطی نقش کلیدی دارد (هیگاشیاما ۲۰۰۲). ترهالوز در برابر اثرات اسمزی به اشکال خاص از جمله: واکنش با فسفولیپیدهای غشا، ایجاد محیط هایپرتونیک و دهیدراسیون اسمزی سلول قبل از انجماد نقش حفاظت‌کنندگی داشته و از این‌رو آسیب سلول در اثر کریستال یخ را کاهش می‌دهد (شانکارردی و همکاران ۲۰۱۰، موتا و همکاران ۲۰۱٤). این ترکیب نسبت به دیگر قندها حفاظت بهتری را در برابر خشکی ایجاد می‌کند زیرا توانایی بالایی برای جایگزینی آب و کریستاله شدن دارد (وتناب و همکاران ۲۰۰۳). شواهد نشان می‌دهد، که ترهالوز دمای انتقال فاز لیپید خشک را کاهش می‌دهد، و آنها را در فاز کریستال مایع در عدم حضور آب محافظت می‌کند. ترهالوز همچنین از پروتئین‌های حساس در حین خشک شدن محافظت می-کند. احتمالاً ترهالوز به طور مستقیم با پروتئین خشک از طریق پیوند هیدروژنی بین گروه‌های هیدروکسیل خود و شاخه‌های جانبی قطبی پروتئین تعامل برقرار می‌کند (البین و همکاران ۲۰۰۳). سه مکانیسم مطرح برای ترهالوز در رابطه با پایداری غشای سلول شامل: واکنش با فسفولیپید و افزایش سطح این مولکول‌ها در یک لایه‌ی فسفولیپید، افزایش سیالیت غشا و کاهش شرکت در انتقال فاز ژل به مایع در محلول‌های حجیم می‌باشد (رادولف و همکاران ۱۹۸٦).

شواهد نشان می‌دهد، ترهالوز با حفظ ساختار غشای اسپرم موجب کاهش آسیب‌های وارده، حین انجماد می شود. هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر سطوح مختلف ترهالوز در نگهداری منی منجمد قوچ‌های مختلف بود؛ و اینکه آیا می‌توان با استفاده از ترهالوز منی قوچ را به مدت بیشتری نگهداری کرد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز، واقع در جاده باسمنج انجام گرفت. در این طرح از شش رأس قوچ‌های نژاد قزل، ترکیب ژنتیکی قزل- مرینوس و مرینو- مغانی (۳ تا ٤ سال و ٦۰ تا ۸۰

کیلوگرم) برای اسپرم‌گیری استفاده شد. پس از عادت-دهی قوچ‌ها، اسپرم‌گیری در فصل تولید مثلی انجام گرفت. اسپرم‌گیری با استفاده از واژن مصنوعی ۴۸-۴۶ درجه‌سانتی‌گراد، و به کمک میش فحل انجام گرفت. پس از اسپرم‌گیری نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند؛ پس از یک بررسی اولیه نمونه‌های با تحرک بیش از ۷۰ درصد و غلظت بیش از ۳×۱۰^{۹} در هر میلی‌لیتر و کمتر از ۱۵ درصد اسپرم ناهنجار برای انجماد استفاده شدند. برای حذف اثر قوچ، نمونه‌های اسپرم دریافتی هر گروه از قوچ‌ها با هم مخلوط و به ٤ قسمت تقسیم شدند و در رقیق‌کننده بر پایه تریس حاوی ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز (Merck ٦٤٢٧١، آلمان) و یک گروه بدون ترهالوز (به عنوان گروه شاهد) رقیق‌سازی شدند. رقیق‌کننده پایه حاوی ۲/۷۱ گرم تریس (Merck ٦٤٢٧١، آلمان)، ۱ گرم اسیدسیتریک‌مونوهیدرات (Appli ٦٤٢٩١ chem Gmbh، آلمان)، ۱/٤ گرم فروکتوز (Daejung Chemicals ۰۰٤۳، کره) و ۱۰۰۰۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسن که در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و سپس ۷۳ میلی‌لیتر از این محلول با ۲۰ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ و ۷ میلی‌لیتر گلیسرول ترکیب شد. رقیق‌سازی بر حسب غلظت با نسبت ۱ به ٦ انجام گرفت. پس از رقیق‌سازی در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد از هر نمونه ۱۵ پایت فرانسوی ۰/۲۵ میلی‌لیتر پر شده و به مدت ۹۰ دقیقه در یخچال تا دمای ۵ درجه‌سانتی‌گراد خنک، و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در ٦-٤ سانتی‌متری بالای نیتروژن مایع منجمد شده و در داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. برای یخ-گشایی نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آب ۳۷ درجه-سانتی‌گراد قرار داده شدند. و نمونه‌ها هر روز و به مدت ۱۵ روز برای صفاتی چون درصد اسپرم‌های زنده و ناهنجار (دم خمیده، دم پیچیده، اسپرم بدون دم) با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین، تحرک کلی و حرکت پیشرونده با استفاده از میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند.

تجزیه‌ی آماری

نمونه‌های اسپرم در طی شش هفته (دو بار در هفته) جمع‌آوری و باهم مخلوط شدند. پس از جمع‌آوری داده-ها به کمک مدل Mixed نرم‌افزار SAS (2003) آنالیز شدند. سطح معنی‌داری در این آزمایش ۰/۰۵ بود. تأثیر شش هفته زمان نمونه‌گیری در مدل اولیه لحاظ شد ولی چون معنی‌دار نبود، در مدل آماری نهایی حذف شد.

نتایج و بحث

خلاصه‌ی فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده قبل از رقیق-سازی و بعد از یخ‌گشایی در جدول ۱ ارائه شده است. مقایسه‌ی میانگین‌های حداقل مربعات درصد اسپرم‌های زنده بین سطوح مختلف ترهالوز نشان داد که سطح ۷۵ میلی‌مولار ترهالوز به طور معنی‌داری بیشترین درصد اسپرم‌های زنده را نسبت به گروه ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز و گروه شاهد داشت ($P <$ ۰/۰۵). در حالیکه جعفراوغلی و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که سطح ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز بهتر از سطح ۷۰ و ۵۰ میلی-مولار موجب بهبود درصد اسپرم‌های زنده می‌شود. بوکاک و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند، درصد اسپرم‌های زنده سطح ۱۰۰ میلی‌مولار بیشتر از ۵۰ میلی‌مولار می‌باشد. نجفی و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که سطح ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز بهتر از سطح ۱۰۰ میلی‌مولار موجب حفظ درصد اسپرم‌های زنده در قوچ می‌شود. یوسال و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که بین سطح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. برلینگر و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که استفاده از ترهالوز در انجماد اسپرم بز کوهی موجب افزایش قابلیت زیست اسپرم، نرخ باروری و تسهیم تخم لقاح یافته با اسپرم ذوب شده می‌شود. کوزدروزکی (۲۰۰۹) گزارش کرد استفاده از ترهالوز تأثیری روی درصد اسپرم‌های زنده و اسپرم‌های با آکروزوم سالم ندارد، که این با نتایج آزمایش حاضر سازگاری نداشت. این ممکن است به علت تفاوت در ترکیبات رقیق‌کننده‌ها

و نژادهای استفاده شده باشد. توانایی حفاظت‌کنندگی قندها روی اسپرم بستگی به وزن مولکولی و نوع بافر استفاده شده دارد (خلیلی و همکاران ۲۰۰۹). گزارشات اخیر نشان دادند استفاده از ترهالوز موجب حفاظت ساختار DNA می‌گردد. ترهالوز با افزایش ویسکوزیته سیتوپلاسم موجب کاهش تشکیل کریستال یخ که کشنده است، می‌شود. همچنین ممکن است به عنوان حذف کننده‌ی رادیکال آزاد عمل نماید (من و همکاران ۲۰۱۳). در خلال یخ‌زدن و فرآیندهای دهیدراتاسیون و ری‌هیدراتاسیون ترهالوز با فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی واکنش می‌دهد، و موجب حفاظت غشا، افزایش سیالیت و کاهش تشکیل بلورهای یخ می‌شوند (آبوگلا و ترادا ۲۰۰۳).

همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، سطح ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولارترهالوز بیشترین درصد تحرک را نسبت به گروه شاهد و ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز داشتند ($P < ۰/۰۵$). این نتایج برای قند ترهالوز با نتایج تانسر و همکاران (۲۰۱۳) روی بز آنقوره، نجفی و همکاران (۲۰۱۳)، بوکاک و همکاران (۲۰۰۷) روی قوچ و نیز کوزدروزکی (۲۰۰۹) روی خرگوش سازگاری نداشت. در حالیکه با نتایج جعفراوغلی و همکاران (۲۰۱۱)، آیسن و همکاران (۲۰۰۲)، یاماشیرو و همکاران (۲۰۱۱)، بهلول و همکاران (۲۰۱۵) روی قوچ و خلیلی و همکاران (۲۰۰۹) روی بز مرخز، بدر و همکاران (۲۰۱۰) روی گاومیش، آبوگلا و ترادا (۲۰۰۳) روی بز و هو و همکاران (۲۰۰۹) روی خوک همخوانی داشت. هو و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند استفاده از ۱۰۰ میلی-مولار ترهالوز موجب افزایش درصد تحرک، یکپارچگی غشای آکروزوم و غشای پلاسمایی می‌گردد، همچنین ترهالوز موجب افزایش سطح آنزیم کاتالاز و گلوتاتیون پروکسیداز شده و از این طریق موجب کاهش تنش اکسیداتیو می‌شود. برحسب گزارش آیسن و همکاران (۲۰۰۵) تحرک بالا در این سطح از ترهالوز به علت اسکلت سلولی و سیستم حرکتی سالم مانند ماکروتیوبول‌ها و میتوکندری‌ها می‌باشد. به این مفهوم رقیق‌کننده‌ی هایپرتونیک با کاهش تشکیل کریستال یخ موجب حفظ اندامک‌ها در طول انجماد می‌شود. بدر و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند استفاده از ۱۰۰ میلی-مولار ترهالوز موجب افزایش قابلیت زیست اسپرم و حفاظت DNA از تخریب شده و تنش اکسیداتیو ایجاد شده حین فرایند انجماد و ذوب را کاهش می‌دهد، و ظرفیت باروری آزمایشگاهی اسپرم منجمد گاومیش را افزایش می‌دهد.

مقایسه‌ی درصد حرکت پیشرونده بین سطوح مختلف ترهالوز نشان داد، سطح ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز بیشترین درصد حرکت پیشرونده را نسبت به گروه شاهد و ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز داشتند ($P <۰/۰۵$). نتایج این بخش با نتایج خلیلی و همکاران (۲۰۰۹) در بز مرخز همخوانی داشت. نایینگ و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که افزایش غلظت ترهالوز موجب بهبود درصد حرکت پیشرونده در منی منجمد یخ‌گشایی شده‌ی بز بوهر می‌شود. درحالیکه با نتایج تانسر و همکاران (۲۰۱۳) در بز آنقوره مطابقت نداشت. محیط هایپرتونیک با کاهش محتویات آب داخل سلولی موجب مهار برگشت‌پذیر تحرک می‌شود. می‌توان گفت به دلیل از دست دادن آب آزاد داخل سلولی اصطکاک افزایش یافته، و این موجب مهار لغزش رشته‌های میکروتوبول و یا دیگر عناصر ساختاری در تاژک می‌شود (ولدرز و همکاران ۱۹۹۷).

مقایسه‌ی درصد اسپرم‌های ناهنجار بین سطوح مختلف ترهالوز نشان داد (جدول ۱) گروه ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز اسپرم‌های ناهنجار کمتری نسبت به سایر گروه‌ها داشت. با اینکه این اختلاف معنی‌دار نبود ولی با نتیجه تانسر و همکاران (۲۰۱۳) روی اسپرم بز آنقوره، بوکاک و همکاران (۲۰۰۷) روی قوچ، نایینگ و همکاران (۲۰۱۰) روی اسپرم بز نژاد بوهر، همچنین با نتایج نجفی و همکاران (۲۰۱۳) روی قوچ نژاد زندی همخوانی

داشت. در حالیکه با نتایج خلیلی و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت نداشت.

جدول ۱- درصد فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده در سطوح مختلف قند ترهالوز

Table 1– Percentage of evaluated parameters in different level of trehalose

متغییرها Variables	قبل از رقیق‌سازی Before extending	بعد از ذوب (LSM±SE) After thawing			
		100 m*M*	75 m*M*	50 m*M*	Control
اسپرم‌های زنده (%)Viability	95.48±1.7	71.37±0.78^{b}	77.39±0.80^{a}	72.70±0.78^{b}	71.03±0.86^{b}
تحرک (%)Motility	90.85±0.54	53.35±2.85^{a}	53.01±2.84^{a}	48.97±2.84^{b}	41.23±2.86^{c}
حرکت پیشرونده (%)Progressive motility	86.58±1.49	46.56±2.51^{a}	46.24±2.49^{a}	42.56±2.49^{b}	35.42±2.51^{c}
اسپرم‌های ناهنجار (%)Abnormal sperm	8.44±1.49	9.31±0.32^{a}	9.54±0.33^{a}	9.17±0.32^{a}	9.63±0.33^{a}

*حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

*Dissimilar letters within a row show significantly different ($P < 0.05$).

روزهای مختلف ارزیابی

مقایسه‌ی روزهای مختلف ارزیابی (روزهای اول، هفتم و پانزدهم) در جدول ۲ ارائه شده است. مقایسه‌ی درصد اسپرم‌های زنده در روزهای مختلف نشان داد، گروه شاهد در روزهای اول درصد اسپرم‌های زنده‌ی بالایی داشت ولی با افزایش روزهای نگهداری مخصوصاً در روزهای آخر به کمترین میزان کاهش یافت. سطح ۷۵ میلی‌مولار ترهالوز برای بهبود درصد اسپرم‌های زنده مؤثرتر از سایر سطوح عمل کرد. آیسن و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند، غلظت بالای ترهالوز (۲۰۰-۴۰۰ میلی‌اسمول) حین فرایند خنک‌سازی اثر کشنده‌ای روی اسپرم قوچ می‌گذارد. این آسیب در مرحله‌ی انجماد و یخ- گشایی آشکار می‌شود. واکنش بین ترکیبات رقیق‌کننده و حفاظت‌کننده‌ها عامل مهمی بوده که در ارزیابی مؤثر بودن هر نوع افزودنی برای حفاظت اسپرم در برابر شوک سرمایی باید در نظر گرفت (اسدپور و همکاران ۲۰۱۲). مکانیسم حفاظت ترهالوز از غشای سلول کاملاً شناخته‌شده نیست ولی فرض بر این است قندهایی مانند ترهالوز و سوکروز نقش کلیدی را در جلوگیری از تغییرات مخرب غشا در طی کاهش حالت آبی بازی می‌کنند، و نیز این قندها به درون غشای پلاسمایی اسپرم نفوذ کرده و با سر قطبی فسفولیپید پیوند هیدروژنی برقرار می‌کنند. همچنین با ایجاد یک فشار اسمزی موجب دهیدراسیون سلول شده و سیالیت غشا را افزایش داده و تشکیل کریستال یخ داخل سلولی را کاهش می‌دهند (خلیلی و همکاران ۲۰۰۹، جعفراوغلی و همکاران ۲۰۱۱، لیو و همکاران ۱۹۹۸).

مقایسه‌ی درصد تحرک رقیق‌کننده‌های غنی شده با سطوح مختلف قند ترهالوز در زمان‌های مختلف ذوب (جدول ۲) نشان داد، گروه ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز در اکثر روزها درصد تحرک بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند. آسیب ماتریکس لیپید موجب از دست دادن یکپارچگی غشا، تخریب غشا در نتیجه‌ی فاز انتقال غشا، کاهش تحرک، از دست دادن باروری و تخریب DNA از طریق تنش اکسیداتیو می‌گردد (تانسر

و همکاران ۲۰۱۱). هو و همکاران (۲۰۱۰) همچنین بدر و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که ترهالوز دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می‌باشد. این حفاظت‌کننده دارای اثر آنتی‌اکسیدانی با حذف گونه‌های اکسیژن فعال موجب حفظ ویژگی منی منجمد ذوب شده می‌گردد.

جدول ۲- مقایسه‌ی تأثیر سطوح مختلف ترهالوز در روزهای اول، هفتم و پانزدهم بعد از انجماد (٪)

Table 2– Comparison the effect of different levels of trehalose in 1, 7 and 15 days after frozen (%)

اسپرم‌های ناهنجار Abnormal sperm	حرکت پیشرونده Progressive motility	تحرک Motility	اسپرم‌های زنده Viability	روزهای ارزیابی Evaluation days	
4.26±0.81[a]	52.24±4.52[a]	59.74±4.82[a]	75.23±3.21[a]	First day	100 m*M*
7.36±0.81[b]	46.68±4.52[ab]	55.30±4.82[ab]	72.79±2.41[a]	Seventh day	
18.17±0.86[c]	40.01±5.32[b]	43.36±5.03[b]	63.20±2.55[a]	Fifteenth day	
5.41±0.81[a]	53.17±4.52[a]	60.89±4.82[a]	79.18±3.21[a]	First day	75 m*M*
8.13±0.81[b]	47.61±4.52[ab]	55.34±4.82[a]	82.42±2.55[a]	Seventh day	
18.88±0.98[c]	36.10±4.73[b]	42.99±5.03[b]	68.46±2.55[a]	Fifteenth day	
5.73±0.85[a]	47.29±4.52[a]	53.94±4.82[a]	70.82±2.55[a]	First day	50 m*M*
7.66±0.81[ab]	42.29±4.52[ab]	49.49±4.82[ab]	75.22±2.55[a]	Seventh day	
17.30±0.91[b]	36.26±4.52[b]	41.24±4.82[b]	70.37±2.41[a]	Fifteenth day	
6.97±0.91[a]	41.15±4.52[a]	45.51±4.82[a]	76.59±3.59[a]	First day	control
7.85±0.81[ab]	36.70±4.52[a]	41.62±4.82[a]	69.95±2.72[a]	Seventh day	
17.76±0.86[b]	27.47±4.98[a]	34.10±5.03[a]	57.89±2.72[a]	Fifteenth day	

* حروف غیر مشابه در در هر ستون و در بین هر یک از گروه‌ها نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

* Dissimilar letter within each column and between any of the groups show significantly different ($P < 0.05$).

مقایسه‌ی درصد حرکت پیشرونده رقیق‌کننده‌های غنی شده با سطوح مختلف قند ترهالوز در زمان‌های مختلف ذوب (جدول ۲) نشان داد، گروه ۱۰۰ و ۷۵ میلی‌مولار ترهالوز کاهش یکنواختی را نسبت به گروه شاهد دارا بودند. آیسن و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند نرخ بره-زایی در رقیق‌کننده‌ی حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز ۲/۵ برابر بیشتر از رقیق‌کننده‌ی شاهد بوده، که می‌تواند به درصد تحرک و حرکت پیشرونده‌ی بالا در این سطح مربوط باشد.

درصد اسپرم‌های ناهنجار (جدول ۲) در روزهای مختلف تفاوت معنی‌داری باهم داشتند ($P<0/05$). سطوح مختلف ترهالوز با گروه شاهد در روزهای مختلف تقریبا توان برابری برای بهبود درصد اسپرم-های ناهنجار داشتند، و در همه نمونه‌ها درصد اسپرم-های ناهنجار در روزهای آخر نسبت به روزهای اول افزایش یافته بود.

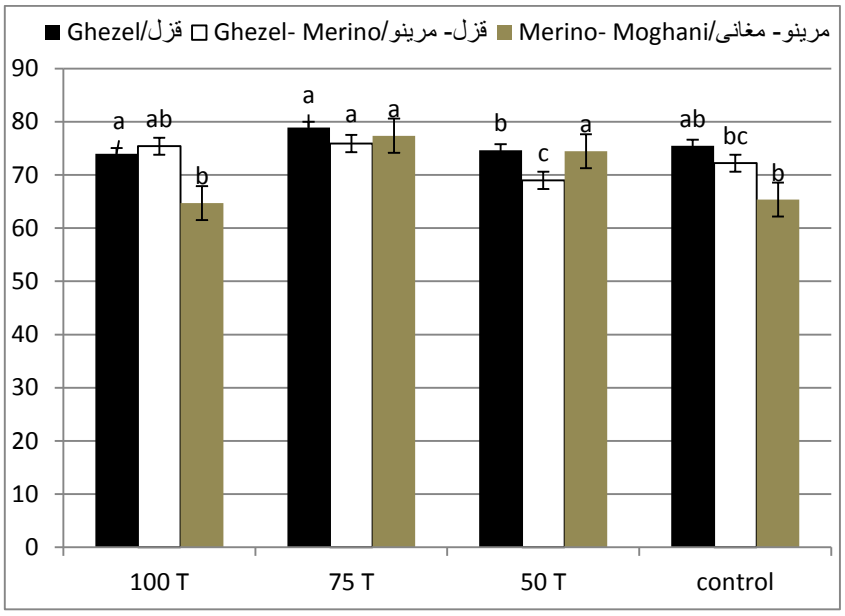
تأثیر استفاده از قوچ‌های مختلف

درصد اسپرم‌های زنده بین قوچ‌های مختلف استفاده شده متفاوت بود (شکل ۱). نژاد قزل بیشترین درصد اسپرم‌های زنده و آمیخته‌ی مرینو- مغانی کمترین درصد را نشان داد ($P<0/05$). مقایسه میانگین حداقل مربعات برای نژاد قزل نشان داد گروه ۷۵ میلی‌مولار ترهالوز بیشترین، و سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کمترین درصد اسپرم‌های زنده را دارا بودند ($P<0/05$). برای آمیخته‌ی قزل- مرینوس سطوح ۷۵ و ۱۰۰ میلی-مولار بیشترین، و سطح ۵۰ میلی‌مولار و گروه شاهد کمترین درصد اسپرم‌های زنده را نشان دادند ($P<0/05$). در قوچ‌های مرینو- مغانی سطح ۷۵ میلی-مولار ترهالوز بیشترین درصد اسپرم‌های زنده را نشان

داد. همچنین برای گروه شاهد و ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز کمترین درصد اسپرم‌های زنده ثبت شد. پاسخ اسپرم به حفاظت‌کننده‌ها در بین نرهای یک گونه و نیز گونه‌ها مختلف متفاوت می‌باشد. به طور کلی توان اسپرم نشخوارکنندگان کوچک نسبت به انجماد در مقایسه با دیگر گونه‌ها متفاوت می‌باشد (کوچوک و همکاران ۲۰۱٤). اثرات استفاده از قند روی قابلیت زیست اسپرم پس از ذوب به علت تفاوت‌های فیزیکی و شیمیایی ترکیبات اسپرم در بین گونه‌های مختلف متفاوت است. تفاوت‌های مشاهده شده در ویژگی‌های منی ممکن است در نتیجه‌ی فاکتورهای مختلف مانند تفاوت‌های گونه‌ای و فردی، دمای نگهداری، نوع بافر، نسبت خنک‌سازی و ترکیبات رقیق‌کننده مانند حضور حفاظت‌کننده‌ها بستگی داشته باشد (نایینگ و همکاران ۲۰۱۰).

درصد تحرک بین قوچ‌های مختلف متفاوت بود. آمیخته قزل- مرینوس بیشترین و مرینو- مغانی کمترین درصد تحرک را نشان داد. مقایسه میانگین حداقل مربعات برای نژاد قزل نشان داد سطوح ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز بیشترین، و گروه‌های شاهد و ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز کمترین درصد تحرک را داشتند (P<۰/۰۵). مقایسه میانگین حداقل مربعات برای آمیخته‌ی قزل- مرینوس و مرینو- مغانی نشان داد که هر سه سطح ترهالوز استفاده شده تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشتند.

تفاوت در روش آزمایش، گونه‌ی حیوان و تفاوت های فردی ممکن است علت تفاوت مشاهده شده در حساسیت اسپرم توسط تنش اکسیداتیو باشد (بوکاک و همکاران ۲۰۰۸).

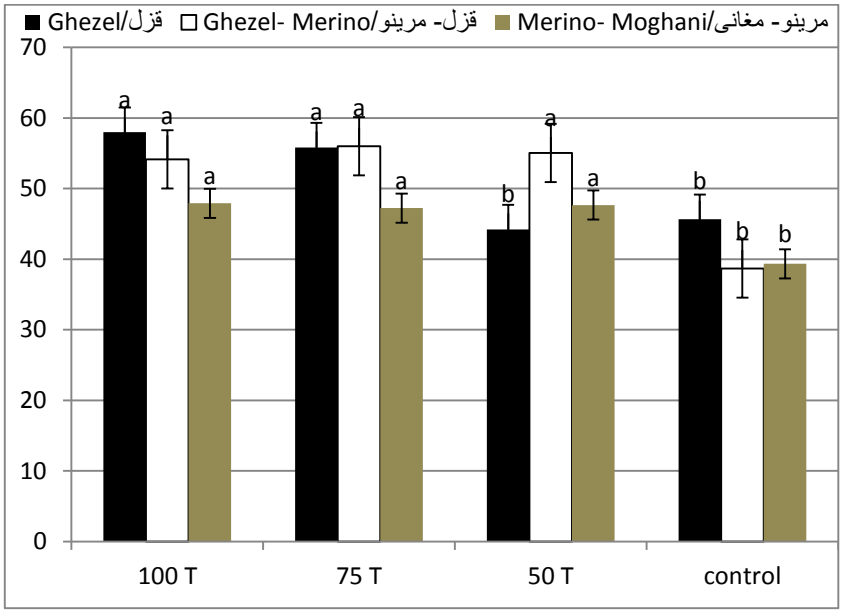


شکل ۱- مقایسه‌ی درصد اسپرم‌های زنده بین قوچ‌های مختلف در سطوح مختلف ترهالوز

Figure 1. Compare the percentage of alive sperm between different rams with different level of trehalose

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

Dissimilar letters show significantly different (P < 0.05).



شکل ۲- مقایسه‌ی درصد تحرک بین قوچ‌های مختلف، در سطوح مختلف ترهالوز

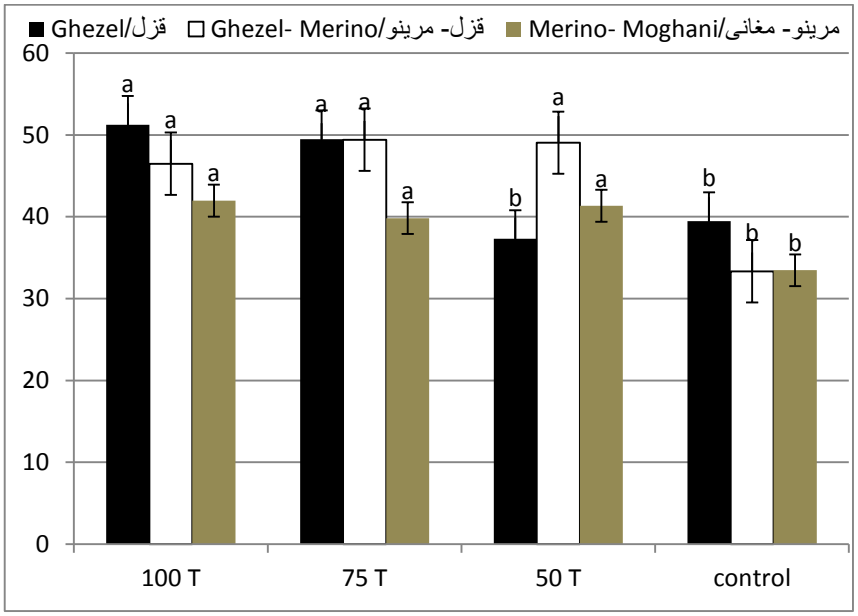
Figure 2. Compare the percentage of sperm motility between different rams with different level of trehalose

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

Dissimilar letters show significantly different ($P < 0.05$).

درصد حرکت پیشرونده بین قوچ‌های مختلف متفاوت بود (شکل۳). آمیخته‌ی قزل- مرینوس بیشترین، و مرینو- مغانی کمترین درصد حرکت پیشرونده را نشان داد. مقایسه میانگین حداقل مربعات برای نژاد قزل نشان داد سطوح ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز بیشترین، و سطح ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز با گروه شاهد کمترین درصد حرکت پیشرونده را داشتند (P<۰/۰۵). مقایسه میانگین حداقل مربعات در بین قوچ‌های آمیخته‌ی قزل- مرینوس و مرینو- مغانی نشان داد که هر سه سطح ترهالوز بهتر از گروه شاهد عمل کردند (P<۰/۰۵).

کاسیمانیکام و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند نژاد قوچ درصد حرکت پیشرونده‌ی منی ذخیره شده در دمای ٤ °c را تحت تأثیر قرار داد.



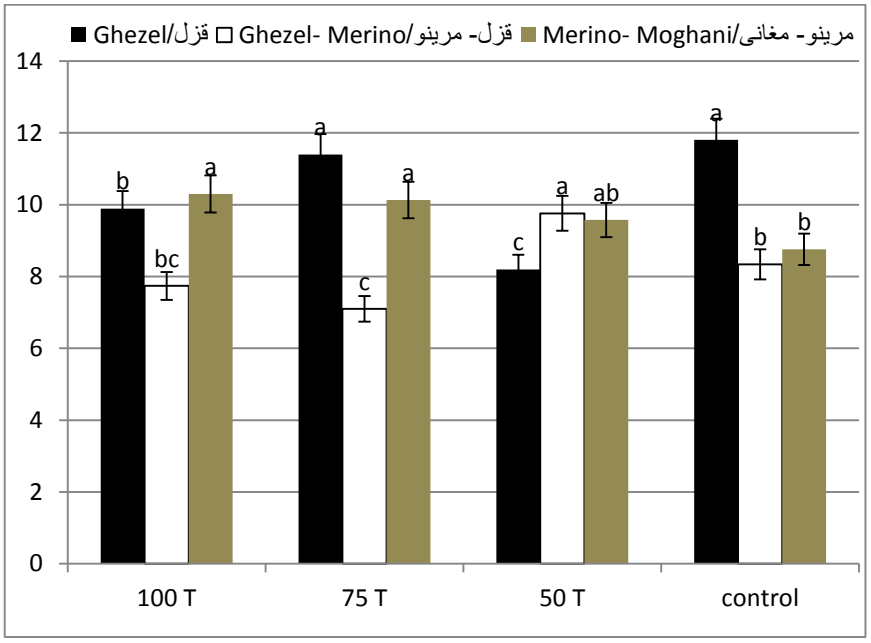
شکل ۳-مقایسه‌ی درصد حرکت پیشرونده بین قوچ‌های مختلف در سطوح مختلف ترهالوز

Figure 3- Compare the percentage of progressive motility between different rams with different level of trehalose

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

Dissimilar letters show significantly different (P < 0.05).

درصد اسپرم‌های ناهنجار بین قوچ‌های مختلف متفاوت بود (شکل٤). نژاد قزل بیشترین درصد اسپرم‌های ناهنجار و آمیخته‌ی قزل- مرینوس کمترین درصد اسپرم‌های ناهنجار را دارا بود (P< ۰/۰۵). مقایسه میانگین حداقل مربعات برای نژاد قزل نشان داد گروه ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز کمترین، و گروه شاهد بیشترین درصد اسپرم‌های ناهنجار را نسبت به سایر گروه‌ها دارا بود (P </۰۵). برای آمیخته‌ی قزل- مرینوس سطح ۷۵ میلی‌مولار ترهالوز کمترین، و سطح ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز بیشترین درصد اسپرم‌های ناهنجار را نسبت به سایر گروه‌ها دارا بود (P<۰/۰۵). در آمیخته‌ی مرینو- مغانی گروه شاهد و ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز کمترین وسطح ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز بیشترین درصد اسپرم‌های ناهنجار را دارا بود (P<۰/۰۵). این اختلافات احتمالاً به این علت می‌باشد که پاسخ اسپرم نژادهای مختلف و حتی تفاوت فردی بین قوچ‌ها به انجماد متفاوت می‌باشد (تانسر و همکاران ۲۰۱۱).



شکل ۴- مقایسه‌ی درصد اسپرم‌های ناهنجار بین قوچ‌های مختلف در سطوح مختلف ترهالوز

Figure 4. Compare the percentage of abnormal sperm between different rams with different level of trehalose

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

Dissimilar letters show significantly different ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

ویژگی اسپرم منجمد ذوب شده در سطوح ۱۰۰ و ۷۵ میلی‌مولار ترهالوز بهتر از سطح ۵۰ میلی‌مولار و همچنین گروه شاهد بود، ولی درصد اسپرم‌های ناهنجار در بین سطوح مختلف و نیز گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. مقایسه بین روزهای مختلف نشان داد ترهالوز در روزهای آخر تأثیر بیشتری نسبت به گروه شاهد داشت و می‌توان گفت ترهالوز در نگهداری طولانی مدت اسپرم قوچ ممکن است تأثیر بگذارد. پاسخ قوچ‌های مختلف به سطوح مختلف قند استفاده شده متفاوت بود. در بین گروه‌های قوچ مورد آزمایش برای درصد اسپرم‌های زنده نژاد قزل بهتر از آمیخته‌ی قزل- مرینوس و مرینو- مغانی بود، و برای درصد تحرک و حرکت پیشرونده و درصد اسپرم‌های ناهنجار آمیخته‌ی قزل- مرینوس بهتر از نژاد قزل و آمیخته‌ی مرینو- مغانی بود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات و حسن نیت جناب آقای دکتر سید عباس رأفت و جناب آقای مهندس حبیب چراغی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

Aboagla EME and Terada T, 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. Biology of reproduction 69(4): 1245-1250.

Aisen EG, Medina VH and Venturino A, 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. Theriogenology 57(7): 1801-1808.

Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H and Venturino A, 2005. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. Cryobiology 50(3): 239-249.

Asadpour R, Pourseif MM, Moghadam G, Jafari R, Tayefi H and Mahmodi H, 2012. Effect of vitamin B12 addition to extenders on some physicochemical parameters of semen in crossbred rams. African Journal of Biotechnology 11 (54): 11741-11745.

Badr MR, Abdelmalak MG and Hassan MH, 2010. Effect of trehalose on cryopreservation, oxidative stress and DNA integrity of buffalo spermatozoa. Journal of Reproduction and Infertility 1: 50-57.

Berlinguer F, Leoni GG, Succu S, Mossa F, Galioto M, Madeddu M and Naitana S, 2007. Cryopreservation of European Mouflon (Ovis Gmelini Musimon) Semen During the non-Breeding Season is Enhanced by the Use of Trehalose Reproduction in Domestic Animals 42(2): 202-207.

Bohlool Z, Mohammadi M, Mehr MRA and Hossein-Zadeh NG, 2015. Effect of different concentrations of trehalose and glycerol on the freezability of ram semen using soybean lecithin-based diluents. Animal Production Science 55(5), 666-671.

Bucak MN, Ateşşahin A, Varışlı Ö, Yüce A, Tekin N and Akçay A, 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. Theriogenology. 67(5): 1060-1067.

Bucak MN, Ateşşahin A and Yüce A, 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. Small Ruminant Research 75(2): 128-134.

Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I and Carroll D, 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology 13(4): 17-27.

Higashiyama T, 2002. Novel functions and applications of trehalose. Pure and Applied Chemistry 74(7): 1263-1269.

Hu JH, Li QW, Li G, Jiang ZL, Bu SH, Yang H and Wang LQ, 2009. Retracted: The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. Animal Reproduction Science 112(1): 107-118.

Hu JH, Zan LS, Zhao XL, Li QW, Jiang ZL, Li YK and Li X, 2010. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. Journal of Animal Science 88(5): 1657-1662.

Jafaroghli M, Khalili B, Farshad A and Zamiri MJ, 2011. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. Small Ruminant Research 96(1): 58-63.

Kasimanickam R, Kasimanickam V, Pelzer KD and Dascanio JJ, 2007. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4 C. Animal Reproduction Science 101(1): 60-73.

Khalili B, Farshad A, Zamiri MJ, Rashidi A and Fazeli P, 2009. Effects of sucrose and trehalose on the freezability of Markhoz goat spermatozoa. Asian-Australasian Journal of Animal Science 22: 1614-1619.

Kozdrowski R, 2009. The effect of trehalose on post-thaw viability and fertility of European brown hare (Lepus europaeus Pallas, 1778) spermatozoa. Animal Reproduction Science 116(3): 326-334.

Küçük N, Aksoy M, Uçan U, Ahmad E, Naseer Z, Ceylan A and Serin İ, 2014. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. Cryobiology 68(3): 327-331.

Liu Z, Foote RH and Brockett CC, 1998. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. Cryobiology 37(3): 219-230.

Men NT, Kikuchi K, Nakai M, Fukuda A, Tanihara F, Noguchi J, Kaneko H, Linh NV, Nguyen BX, Nagai T and Tajima, A, 2013. Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection.Theriogenology 80(9): 1033-1044.

Meyers SA, 2012. Cryostorage and oxidative stress in mammalian spermatozoa. In Studies on Men's Health and Fertility (pp. 41-56). Humana Press.

Motta JPR, Paraguassú-Braga FH, Bouzas LF and Porto LC, 2014. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. Cryobiology 68(3): 343-348.

Naing SW, Wahid H, Mohd Azam K, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T and San, MM, 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. Animal Reproduction Science 122(1): 23-28.

Najafi A, Zhandi M, Towhidi A, Sharafi M, Akbari Sharif A, Khodaei Motlagh M and Martinez-Pastor F, 2013. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. Cryobiology 66(3): 275-282.

Nalley WMM, and Arifiantini RI, 2011.The viability of local ram semen in TRIS buffer with three different egg yolks. Animal Production 13(1). 39-44

Rudolph AS, Crowe JH and Crowe LM, 1986. Effects of three stabilizing agentsproline, betaine, and trehalose on membrane phospholipids. Archives of Biochemistry and Biophysics 245(1): 134-143.

Salamon S and Maxwell WMC, 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Animal Reproduction Science 37(3): 185-249.

Shankar-Reddy SN and Jagan Mohanarao Gand Atreja SK, 2010. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (Bubalus bubalis) sperm quality following cryopreservation. Animal Reproduction Science 119(3): 183-190.

Soylu MK, Nur Z, Ustuner B, Dogan, I, Sagirkaya, H, Gunay U and Ak K, 2007. Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. Bulletin-Veterinary Institute In Pulawy. 51(2): 241.

Tuncer PB, Sarıözkan S, Bucak MN, Ulutaş PA, Akalın PP, Büyükleblebici Sand Canturk F, 2011. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. Theriogenology 75(8): 1459-1465.

Tuncer PB, Taşdemir U, Büyükleblebici S, Özgürtaş T, Coşkun E, Erol H, Aidin F Nand Gürcan IS, 2013. Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen–thawed Angora buck semen. Small Ruminant Research 113(2): 383-389.

Uysal O and Bucak MN, 2009. The role of different trehalose concentrations and cooling rates in freezing of ram semen. Ankara Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 56: 99-103.

Watanabe M, Kikawada T and Okuda T, 2003. Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of Polypedilum vanderplanki. Journal of Experimental Biology 206(13): 2281-2286.

Watson PF, 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science 60: 481-492.

Woelders H, Matthijs 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(2): 93-105.

Yamashiro H, Wando JR, Okoth E, Sugimura S, Moisyadi S, Sato E, Rege EO and Mwai AO, 2011. A case study on cryopreservation of African sheep semen for the Red Maasai, Dorper breeds and their crosses. African Journal of Agricultural Research 6(4): 844-848.

The influence of different trehalose concentrations on sperm parameters of frozen-thawed semen of different rams during preservation in the reproductive season

P Dolati Doorbash[1], Gh Moghaddam[2*] and H Ahmadian[1]

Received: July 4, 2015 Accepted: April 2, 2016
[1]MSc Gratuated student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: Email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

Abstract

BACKGROUND: The sheep artificial insemination with frozen-thawed semen have a low fertility rate because cryopreservation of ram semen is difficult. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to investigate the effect of supplementation of diluent with different trehalose concentrations on during of storage cryopreservation of different rams' semen in reproductive season. **METHODS:** Ejaculate samples were collected from six adult rams. Samples immediately were transported to the laboratory. After a primary evaluation, semen samples were diluted, with a Tris-based extender complemented with 50, 75, 100 m*M* trehalose and an extender containing no sugar as a control group. Semen samples were aspirated into 0.25 ml straws, cooled to 5°C and after frozen finally stored in liquid nitrogen. The frozen straws were evaluated for motility, progressive motility, percentage of live sperm and morphology for 15 days. **RESULTS:** Achieved results showed that the highest percentage of alive sperms belonged to 75 m*M* trehalose and control group had the lowest percantage of alive sperms. The highest percentage of motility and progressive motility were recorded in concentrations of 75 m*M* and 100 m*M*, while the control group had the lowest percentage of motile sperm and progressive motility, on the other hand, no significant differences were observed in the percentages of abnormality the extender containing of trehalose and control group. **CONCLUSIONS:** The highest percentage of alive sperms recorded for the Ghezel rams. Percentage of motility, progressive motility and abnormality in Ghezel-Merinos rams were better than other groups. The results of this study showed trehalozse improved cryopreservation of ram semen.

Keywords: Artificial insemination, Cryopreservation, Extender, Ram