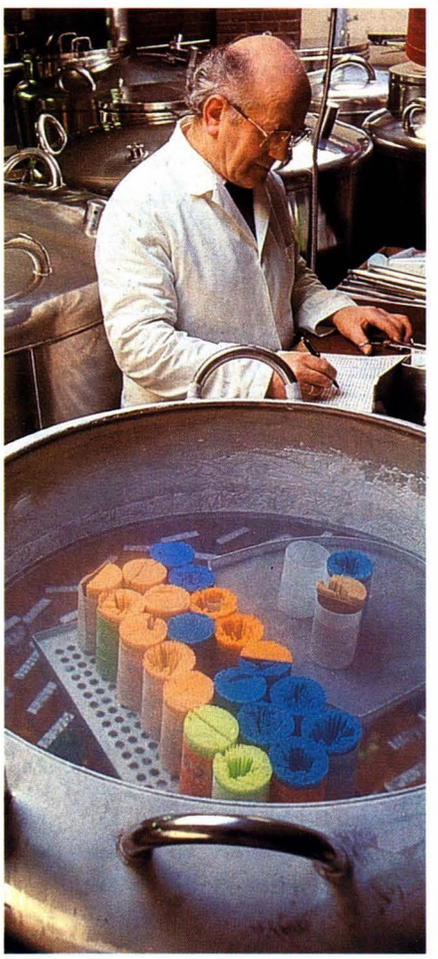
انجماد اسپرم قوچ در محلول هیپرتونیک حاوی رافینوز

تحقیق: دکتر یوسف جعفری‌آهنگری - عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات دامپروری کشور
دکتر راجرز آکسفورد و دکتر یوآن آپ‌دوی - اعضاء هیأت علمی دانشگاه ولز انگلستان

اشاره: مقاله علمی حاضر در گردهمایی جامعه دامپروری انگلستان (۱۹۹۳) ارائه شده و چکیده آن در مجله Animal production (1993), Volume 56, Part 3, شماره ۶۰ به چاپ رسیده است.

چکیده

آزمایشات اولیه نشان داده است که افزایش ۶۶ میلی‌مولار رافینوز به بافرتریس موجب افزایش فشار اسمزی بافر از (mosm/litre) ۳۴۴ به (mosm/litre) ۴۵۵ و همچنین باعث افزایش درصد اسپرمهای با حرکت جلو رونده از ۳۱٪ به ۴۰٪ شده است. منی از ۵ قوچ نژاد تکسل جمع‌آوری و مخلوط و سپس به نسبت ۱ به ۲ با بافرتریس زرده تخم‌مرغ (کنترل) و با بافر حاوی رافینوز رقیق شده است. منی رقیق شده با بافر تریس به صورت پلتهای ۰/۲ میلی‌لیتری، منی رقیق شده با بافر تریس حاوی رافینوز به صورت پلتهای ۰/۱ میلی‌لیتری و در پایوتهای ۰/۲۵ میلی‌لیتری منجمد شده است. ۱۰۸ میش نژاد کوهستانی ولز با استفاده از اسفنجهای آغشته به پروژسترون و تزریق گونادوتروپین سرم مادیان آبستن (PMSG) به طور همزمان فحل شدند و ۵۶ تا ۵۸ ساعت بعد از آن تلقیح مصنوعی به روش سرویکس در میشها با استفاده از منی ذوب شده که حاوی 120×10^6 اسپرماتوزوآ بود، انجام شد. در ارزیابی منی ذوب شده در آزمایشگاه، اسپرماتوزوآهایی که در بافر حاوی رافینوز منجمد شده بودند به طور معنی‌داری حرکت جلو رونده بیشتری داشتند ($P<0.001$). درصد تخریب اکروزوم پائین‌تر بوده ($P<0.001$) ولی اسپرماتوزوآی رقیق شده در بافرکنترل، مقاومت بیشتری را نسبت به تغییر فشار اسمزی داشته است ($P<0.001$). درصد میشهایی که پس از تلقیح مجدداً فحل نشده‌اند به ترتیب ۲۱٪، ۲۰٪، ۳۱٪ و درصد بره‌زایی میشها به ترتیب ۱۲٪، ۱۴٪، ۱۵٪ برای سه تیمار کنترل، پلت حاوی رافینوز و پایوت حاوی رافینوز بوده است. تفاوت بین تیمارها از نظر آماری معنی‌دار نبوده است ($P<0.001$). کورولاسیون معنی‌داری بین قدرت شنای اسپرم با درصد میشهایی که مجدداً فحل نشده‌اند ($r=0.904, P<0.1$) و درصد اسپرمهای دارای حرکت جلو رونده با درصد میشهایی که بره‌زائیدند مشاهده شده است ($r=0.945, P<0.1$).



مقدمه

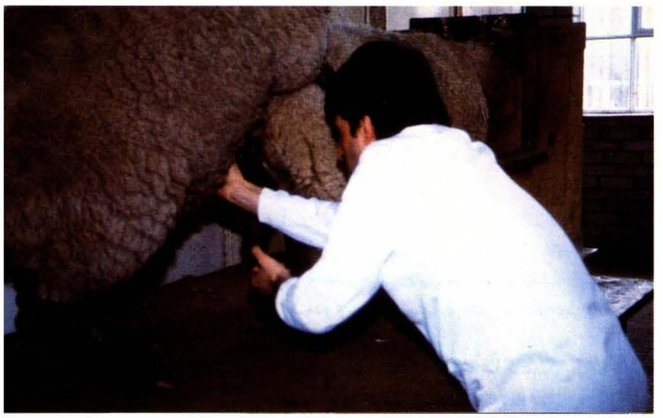
هنگامی که اسپرم قوچ منجمد می‌شود، ابتدا با تشکیل بلورهای یخ در اطراف سلول، بخشی از آبهای داخلی سلول اسپرماتوزوآ بر اثر فشار اسمزی به بیرون رانده می‌شود (۱۱)، در نتیجه، انجماد سریع موجب کاهش مقدار از دست دادن آب داخلی سلولی شده و باعث تشکیل سریع بلورهای کوچک‌تر یخ در داخل سلول می‌شود (۱۲). در صورتی که سلول اسپرماتوزوآ به طور خیلی سریع در ازت مایع منجمد شود، زنده نخواهد ماند. زیرا محیط داخل سلول وقت کافی برای از دست دادن آب نخواهد داشت، این در حالی است که از دست دادن آب در حدی لازم است تا اسپرماتوزوآ بتواند در مراحل سرد شدن و انجماد زنده بماند (۵).

گلیسرول به طور وسیعی به عنوان یک عامل محافظ سلول در مرحله انجماد اسپرم گاو نر (۱۳) و اسپرم قوچ (۲) استفاده میشود. خصوصاً برای اسپرم قوچ، گلیسرول به عنوان یک محافظ قوی و مطلوب عمل نکرده است (۱۶).

توضیح احتمالی پدیده فوق می‌تواند این باشد که بعد از افزودن گلیسرول، سلولهای اسپرم نتوانسته‌اند با مایع رقیق کننده خود به تعادل برسند تا از طریق خروج به موقع آبهای آزاد داخل سلول از تشکیل بلورهای یخ بزرگ در مرحله انجماد جلوگیری به عمل آید.

Salamon (۱۴) دریافت که بعد از آب کردن اسپرم

شکل ۱- جمع‌آوری قوچها برای تلقیح مصنوعی



شکل ۲- جمع‌آوری اسپرم با مهبل مصنوعی از قوچ در حال سرویس دادن

منجمد شده و ارزیابی آن، قندهایی که دارای وزن ملکولی بالاتری هستند (رافینوز و لاکتوز) بهتر از قندهای با وزن ملکولی پایین‌تر (فروکتوز و گلوکز) از اسپرم در مرحله انجماد محافظت می‌نمایند. Watson (۱۹) مسئله فوق را بدین صورت طرح کرده است که، قندهایی که قدرت نفوذ از دیواره سلولی را ندارند (رافینوز و لاکتوز)، می‌توانند محافظت کننده‌های بهتری برای سلول اسپرم در مرحله انجماد باشند. چون قندهای فوق باعث افزایش میزان آب از دست رفته سلول می‌شوند.

البته ساکاریدهای موجود در خارج سلول که قدرت نگهداری بخش قابل ملاحظه‌ای از آب را دارند می‌توانند باعث ویتریفیکاسیون [1] (شیشه‌ای شدن) آب خارج سلولی شوند. پدیده فوق می‌تواند موجب خروج بخشی از آب داخل سلولی نیز شود. همچنین قدرت پیوند ساکاریدهای فوق در خارج از سلول نیز می‌تواند باعث جلوگیری از تشکیل بلورهای یخ خارج سلولی در خلال انجماد شده و بر اثر انجماد سریع فقط بلورهای یخ کوچک تشکیل می‌شوند که بی ضرر هم می‌باشند. Mazur (۱۰ و ۱۲) معتقد است که بلورهای کوچک یخ برای سلول بی‌ضرر بوده، اما تشکیل دوباره بلورهای یخ بزرگ در هنگام انجماد و ذوب شدن، بر اثر انرژی آزاد سطحی برای سلول می‌تواند بسیار زیان بخش باشند.

از مقدمه فوق روشن می‌شود اصولا برای اینکه سلول در حالت انجماد زنده بماند بایستی مقداری از آب خود را از دست بدهد. افزودن یک مادهٔ غیرقابل نفوذ به داخل سلول مانند رافینوز به محلول رقیق کننده، ممکن است باعث ایجاد فشار اسمزی مطلوب از طریق خارج ساختن آب زاید داخل سلولی شود تا سلول در مراحل انجماد و ذوب محافظت شود.

هدف از این مقاله، بررسی اثر رافینوز به عنوان یک عامل ایجاد فشار اسمزی بالا (هیپرتونیک) جهت محافظت از سلول اسپرم در مرحله انجماد می‌باشد.

مواد و روشها

روشهای آزمایشگاهی

الف: اسپرم از چهار قوچ نژاد کمبریج [2] با استفاده از مهبل مصنوعی جمع‌آوری، مخلوط و به نسبت ۱ به ۲ منی و بافرتریس [3] زرده تخم‌مرغ فروکتوز [4] با غلظت نهایی، صفر میلی مولار، ۳۳ میلی مولار، ۶۶ میلی مولار، ۹۹ میلی مولار، ۱۳۲ میلی مولار، ۱۶۵ میلی مولار و ۱۹۸ میلی مولار رافینوز رقیق شده است (۱).

منی رقیق شده حاصل در یخچال تا ۵ درجهٔ سانتیگراد در عرض ۲ ساعت سرد شده است نمونه‌های سرد شده فوق بر اساس غلظت نهایی اسپرم در هفت تیمار به شرح فوق قرار گرفتند. ابتدا فشار اسمزی و درصد اسپرمهای متحرک هفت تیمار فوق به وسیلهٔ دستگاه سنجش فشار اسمزی (Wescore, Ing, 5100C) و به روش میکروسکوپی (۱) اندازه گیری شده و پس از افزودن ۴٪ گلیسرول به روش پلت (۴) منجمد شد. پلتها در ازت مایع برای ۲۴ ساعت نگهداری شده و بعد از آب کردن نمونه‌ها، فشار اسمزی و درصد اسپرمهای متحرک نیز دوباره اندازه گیری شد.

ب: در آزمایش دوم جمع‌آوری و رقیق کردن منی به روش فوق انجام گرفت، اما در این آزمایش رافینوز در ۴ سطح (۰-۳۳-۶۶-۹۹ میلی‌مولار) استفاده شد و گلیسرول در دو سطح ۳٪ و ۶٪ که معادل ۳۲۵ و ۶۵۰ میلی‌مولار بوده است. اسپرم رقیق شده در دو اندازه پلت (۰/۱ و ۰/۲ میلی‌لیتر) با ۲ تکرار (ماه سپتامبر و نوامبر) منجمد شد. اسپرم قوچ منجمد شده در محلول مخصوص ذوب کردن اسپرم (۴) مورد ارزیابی قرار گرفت.

ج: در آزمایش سوم منی قوچ در سه هفته پی در پی جمع‌آوری و در بافرتریس - زرده تخم‌مرغ محتوی ۶٪ گلسیرول (حجم/حجم) به همراه ۶۶ میلی‌مولار رافینوز و یا بدون ۶۶ میلی‌مولار رافینوز رقیق شد. بعد از سرد کردن منی رقیق شده تا ۵ درجه سانتیگراد، در پایوتهای ۰/۲۵ میلی‌لیتری پر شده تا در ماشین مخصوص انجماد سلول با درجات مختلف سرما (۲۰-، ۳۰-، ۴۰-، ۵۰- درجه سانتیگراد در دقیقه) منجمد و در ازت مایع نگهداری شود. همه پایوتها بعد از ۷ روز، به روشهای بالا ارزیابی شد.

آزمایشات مزرعه‌ای

منی از ۵ قوچ نژاد تکسل دوبار در هفته برای دو هفته متوالی جمع‌آوری شد. منی مخلوط شده در هر جمع‌آوری به ۳ قسمت مساوی تقسیم شده و هر قسمت به نسبت ۱ به ۲ (منی و بافر) با سه بافر مختلف رقیق شده است هر یک از سه محلول بافر فوق حاوی مواد مشترک به شرح زیر بودند، تریس ۴/۳۶ گرم، گلوکز ۰/۰۶ گرم، اسید سیتریک ۲/۳۴ گرم، زرده تخم‌مرغ ۱۸ میلی‌لیتر، Penicillin ۱۰۰/۰۰۰ واحد بین‌المللی، Streptomycin ۱۰۰ واحد بین‌المللی، که مجموعا حجم آن به وسیله آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. pH محلول فوق هم به وسیله اسیدکلریدریک (۱ مولار) به ۶/۸ رسانیده شد. غلظت گلیسرول برای محلول بافر رقیق شده اولی و دومی ۶٪ (حجم/حجم) و برای رقیق کننده سومی ۹٪ (حجم/حجم) بوده است. غلظت رافینوز هم در محلول بافر رقیق کننده‌های دومی و سومی ۶۶ میلی‌مولار بوده است. منی‌رقیق‌شده‌درمحلول بافراولی‌بعداز سرد شدن دراندازه‌های پلت ۰/۱ میلی‌لیتری منجمد شده است.

منی رقیق شده با محلول بافر سومی بعد از سرد شدن در پایوتهای ۰/۲۵ میلی لیتری ابتدا تا ۱۲۰- درجه سانتیگراد در عرض ۶ دقیقه منجمد شده‌اند و سپس به همراه نمونه‌های بالا در ازت مایع (۱۹۶-°c) نگهداری شدند.

ارزیابی اسپرم

درصد تحرک اسپرماتوزوآ و درصد اسپرمهای زنده قبل و بعد از انجماد (۴)، فشار اسمزی نمونه‌ها،

شکل ۳- مهبل مصنوعی، قوچ و عامل

تست آکروزوم به روش Watson (۱۸) تست قدرت شنای اسپرم با استفاده از اسپکتروفتومتر (۱) و تعیین میزان ATP موجود در نمونه‌ها (۶) اندازه گیری شدند.

همزمان کردن و تلقیح مصنوعی میشها

۱۰۸ میش نژاد کوهستانی ولز با استفاده از اسفنجهای آغشته به پروژسترون و تزریق داخل عضلانی ۳۲۰ واحد بین‌المللی سرم مادیان آبستن (PMSG) در روز بیرون کشیدن اسفنجها، به طور همزمان فحل شدند.

۵ قوچ وازکتومی شده در روز بیرون کشیدن اسفنجها وارد گله شده و ۵۶ ساعت بعد از آن تلقیح مصنوعی میشها به روش سرویکس با استفاده از ۰/۲ میلی‌لیتر از اسپرم ذوب شده که حاوی ۱۲۴×۱۰^۶ اسپرماتوزوآ بود، انجام شد. جهت انجام تلقیح مصنوعی، منی حاصل از سه تیمار به ترتیب تصادفی، به هر گروه سه رأسی از میشها تزریق شد. قوچهای فحل یاب ۱۰ روز بعد وارد گله شدند تا میشهایی را که در اثر تلقیح مصنوعی باردار نشدند را شناسایی و علامتگذاری نمایند. درصد میشهایی که مجدداً فحل نشدند و به عبارت دیگر باردار شدند به عنوان یک معیار برای اندازه گیری درصد باروری میشها قبل از بره‌زایی مورد استفاده قرار گرفت (۱۵).

تجزیه و تحلیل آماری

جدول آنالیز واریانس، کای مربع، وآنالیز همبستگی، به وسیله برنامه آماری مینی تب (Minitab) انجام شد.

نتایج

نتایج تستهای آزمایشگاهی

الف: اثر رافینوز بر تغییرات فشار اسمزی بافر تریس در نمودار ۱ نشان داده شده است. افزایش غلظت رافینوز در محلول بافر موجب بالارفتن فشار اسمزی می‌شود ($P<0.005$) که ضریب همبستگی ۰/۹۴ محاسبه گردید. اثر رافینوز بر درصد اسپرمهای متحرک قبل از انجماد و بعد از ذوب کردن در نمودار ۲ نشان داده شده است. رافینوز به طور معنی‌داری ($P< 0.005$) موجب کاهش درصد اسپرمهای متحرک در خلال سرد شدن مرحله قبل از انجماد شد. اما افزایش رافینوز تا ۶۶ میلی‌مولار درصد تحرک را در نمونه‌های ذوب شده بعد از انجماد افزایش داده است. نتایج نشان داد که رافینوز به طور معنی‌داری ($P<0.005$) موجب کاهش تحرک اسپرم در خلال سرد کردن می‌شود ولی مقدار آن در حد ۶۶ میلی‌مولار درصد تحرک اسپرم را بعد از ذوب کردن افزایش می‌دهد. افزایش بیش از ۶۶ میلی‌مولار موجب کاهش معنی‌داری ($P<0.005$) در درصد تحرک اسپرم در هر دو حالت قبل و بعد از انجماد می‌شود (نمودارهای شماره ۲ و ۳).

ب: نتایج جدول ۱ و نمودار ۳ نشان می‌دهد: اسپرمهایی که بعد از ذوب شدن در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد برای مدت ۶ ساعت نگهداری شده‌اند تا ۴ ساعت درصد تحرک منی حاوی رافینوز بالاتر از منی بدون رافینوز بوده است. همچنین نسبت کاهش درصد تحرک اسپرم رقیق شده در بافر حاوی ۶۶ میلی‌مولار رافینوز و اسپرم رقیق شده در بافر بدون رافینوز از زمان ذوب (۰ ساعت) تا ۴ ساعت نگهداری در شرایط فوق به ترتیب ۱/۷۸ و ۲/۴۸ به طور نسبی بوده است. کاهش اندازه پلت از ۰/۲ میلی‌لیتر به ۰/۱ میلی‌لیتر موجب افزایش درصد تحرک اسپرماتوزوآ بوده است. بهترین نتیجه در شرایطی به دست آمد که نمونه‌های محتوی ۴٪ گلسیرول و ۶۶ میلی‌مولار رافینوز در پلتهای ۰/۱ میلی‌لیتری منجمد شده بود.

ج: جدول شماره ۱ درصد تحرک اسپرم بعد از ذوب کردن را نشان میدهد و افزودن ۶۶ میلی‌مولار رافینوز

جدول ۱: میانگین درصد اسپرمهای متحرک جلو رونده بعد از انجماد و ذوب کردن که حاوی رافینوز به مقادیر مختلف و زمانهای متفاوت آزمایش هستند

تیمارها / نمونه‌ها (A)	۰ ساعت	۲ ساعت	۴ ساعت	۶ ساعت
۱	۳۱/۱۲(۰/۷۷)	۲۸/۵۳(۰/۷۲)a	۱۶/۸۷(۰/۹۷)a	۶/۹۸(۰/۰۴)b
۲	۳۰/۷۲(۰/۶۸)	۲۵/۶۶(۰/۸۹)b	۱۵/۳۷(۰/۹۸)b	۷/۰۱(۰/۰۴)a
ارزش F	۰/۶۲	۱۴/۷۵***	۸/۸۶*	۲۳/۱۹***
اندازه پلت (B)				
۰/۱۰ میلی‌لیتر	۳۲/۴۷(۰/۳۸)	۲۸/۳۴(۰/۸۰)	۱۸/۰۰(۰/۰۰)b	۱۰/۳۵(۰/۰۴)a
۰/۲۰ میلی‌لیتر	۳۱/۳۷(۰/۶۰)	۲۷/۳۴(۰/۸۱)	۱۶/۲۷(۰/۶۳)a	۶/۴۰(۰/۰۴)b
ارزش F	۳/۱۰	۰/۴۵	۱۱/۲۲***	۱۶/۷۳***
رافینوز (C)				
۰ میلی‌مولار	۲۷/۵۶(۱/۲۳)c	۲۲/۳۷(۱/۱۹)d	۱۱/۱۲(۰/۸۵)d	۷/۰۴(۰/۰۴)a
۳۳ میلی‌مولار	۳۰/۹۴(۰/۶۵)b	۲۸/۰۰(۰/۶۷)b	۱۶/۱۲(۰/۷۵)c	۶/۹۸(۰/۰۵)b
۶۶ میلی‌مولار	۳۵/۲۰(۰/۸۸)a	۳۰/۸۷(۰/۶۸)a	۱۹/۷۰(۱/۱۷)a	۶/۹۴(۰/۰۴)b
۹۹ میلی‌مولار	۳۱/۰۰(۰/۴۶)b	۲۷/۱۳(۱/۷۰)c	۱۷/۵۶(۰/۸۰)b	۷/۰۲(۰/۰۶)
ارزش F	۲۷/۶۵***	۲۲/۲۳***	۵۲/۱۹***	۲۲/۳۷***
گلیسرول (D)				
٪۲	۲۹/۵۰(۰/۶۷)b	۲۶/۵۹(۰/۸۱)	۱۵/۰۶(۰/۷۹b)	۷/۰۲(۰/۰۳)a
٪۴	۳۲/۳۴(۰/۶۹)a	۲۷/۵۹(۰/۸۷)	۱۷/۲۰(۰/۸۶)a	۶/۹۷(۰/۰۴)b
ارزش F	۳۰/۵۶***	۱/۷۸	۱۷/۷۸***	۲۰/۳۰***

A= نمونه (سپتامبر در مقابل اکتبر)
B= اندازه پلت (۰/۱ میلی‌لیتر در مقابل ۰/۲ میلی‌لیتر)
C= رافینوز (۰ در مقابل ۳۳ در مقابل ۶۶ در مقابل ۹۹ میلی‌مولار)
D= گلیسرول (۲٪ در مقابل ۴٪)

* $p<0/05$
*** $P<0/005$

جدول ۲: میانگین اسپرمهای متحرک جلو رونده که در درجه حرارتهای مختلف انجماد.

ساعت/تیمارها	۰ ساعت	۲ ساعت	۴ ساعت	۶ ساعت
تکرار (A)				
۱	۱۹/۶۴(۰/۸۴)	۱۳/۹۷(۰/۸۳)	۶/۹۸(۰/۶۱)	۲/۴۵(۰/۵۷)
۲	۱۹/۹۸(۰/۸۸)	۱۴/۰۲(۰/۸۴)	۶/۹۸(۰/۶۱)	۲/۴۵(۰/۵۷)
ارزش F	۰/۱۹	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
قوچها(B)				
۱	۱۷/۱۸(۰/۹۵)c	۱۲/۳۵(۰/۸۶)b	۵/۹۵(۰/۵۵)b	۲/۱۵(۰/۴۴)b
۲	۱۹/۹۴(۰/۹۲)b	۱۳/۱۷(۰/۸۲)b	۶/۰۹(۰/۶۳)b	۱/۷۵(۰/۵۲)b
۳	۲۳/۵۶(۱/۱۴)a	۱۷/۶۹(۱/۳۵)a	۹/۹۳(۱/۰۲)a	۷/۵۰(۰/۸۷)a
ارزش F	۱۴/۲۰***	۸/۶۹***	۵/۵۳***	۷/۵۷***
هفتهها (C)				
۱	۱۷/۶(۱/۲۹)b	۱۱/۷۵(۰/۹۸)b	۴/۴۷(۰/۵۵)c	۱/۵۳(۰/۳۷)b
۲	۱۸/۷۷(۰/۷۳)b	۱۲/۸۳(۰/۹۳)b	۷/۱۵(۰/۵۹)c	—
۳	۲۲/۶۹(۱/۵۰)a	۱۶/۶۵(۰/۹۷)a	۹/۰۰(۰/۹۰)a	۴/۹۰(۰/۷۰)a
ارزش F	۱۱/۹۳***	۷/۹۸***	۴/۷۷**	۱۹/۱۲***
تیمارها (D)				
۰ میلیمترمولار	۱۷/۷۶(۰/۸۲)b	۱۲/۶۹(۰/۷۹)b	۶/۲۵(۰/۵۶b)	۱/۸۲(۰/۴۷)b
۶۶ میلیمولار	۲۱/۸۶(۰/۸۲)a	۱۵/۳۰(۰/۸۴)	۷/۶۹(۰/۶۵)a	۳/۰۹(۰/۶۲)a
ارزش F	۲۶/۸۶***	۸/۷۴	۵/۰۵*	۶/۱۲*
نرخ سرد کردن (E)				
-۵۰	۱۴/۴۰(۰/۸۵)c	۹/۴۵(۰/۵۹)c	۵/۷۳(۰/۴۹)b	۰/۷۵(۰/۴۹)b
-۴۰	۱۸/۰۳(۱/۱۰)b	۱۳/۵۳(۱/۲۹)b	۵/۲۰(۰/۹۶)b	۲/۹۵(۰/۶۹)a
-۳۰	۲۳/۳۴(۱/۱۵)a	۱۴/۲۵(۱/۲۰)b	۷/۶۶(۰/۵۹)a	۲/۸۷(۰/۶۹)a
-۲-	۲۳/۴۶۰/۹۶)a(	۱۸/۷۵(۰/۸۷)a	۸/۵۹(۱/۱۴)a	۲/۵۰(۰/۹۴)a
ارزش F	۳۱/۱۲***	۱۸/۶۹***	۳/۳۵*	۵/۵۳*

*P<۰/۰۵

**P<۰/۰۱

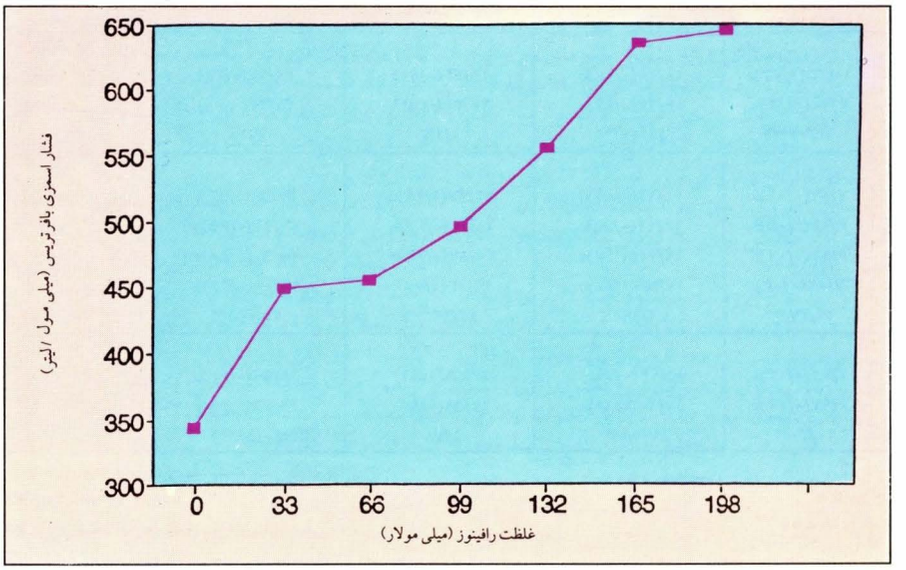
***P<۰/۰۰۵

A= تکرار (در مقابل ۲)

B= قوچها (۱ و ۲ و ۳)

C= هفتهها (۱ و ۲ و ۳)

D= تیمارها (بافر تریس گلیسرول (۹٪) بدون رافینوز در مقابل همان بافر به اضافه ۶۶ میلیمولار رافینوز)



نمودار ۱- اثر رافینوز (میلیمولار) بر تغییرات فشار اسمزی بافرتریس

باعث افزایش معنیدار درصد اسپرمهای متحرک شد. برای انجماد اسپرم در پایوتهای ۰/۲۵ میلیلیتری، بهترین نتیجه در شرایطی به دست آمد که منی حاوی رافینوز با سرمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا درجه حرارت ۱۲۰- درجه سانتیگراد منجمد و سپس به ازت مایع ۱۹۶- درجه سانتیگراد منتقل شد.

نتایج آزمایش مزرعهای

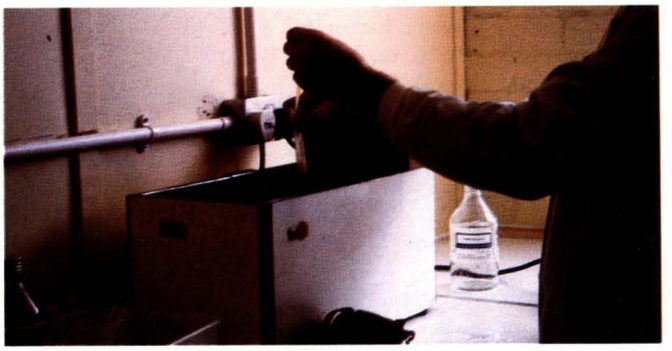
نتایج ارزیابی منی استفاده شده برای تلقیح میشها در جدول شماره ۳ نشان داده میشود. درصد میشهای تلقیح شدهای که به فحلی بر نگشتهاند و درصد برهزایی میشهای تلقیح شده در جدول ۴ نشان داده شده است. درصد تحرک اسپرماتوزوآ و درصد اسپرمهای زنده و تست قدرت شنای اسپرم به طور معنیداری ($P<0.05$) برای منی حاوی رافینوز نسبت به منی بدون رافینوز در مرحله قبل از انجماد پایینتر بوده است. ولی مقدار ATP بالاتر بوده است. بعد از ذوب منی حاوی رافینوز با مخلوط کردن در محلول مخصوص ذوب کردن اسپرم (۴۹)، درصد اسپرمهای متحرک و زنده به طور معنیداری ($P<0.05$) نسبت به منی رقیق شده در بافر تریس بدون رافینوز بالاتر بوده است. تست قدرت شنای اسپرم نشان داد که پایوتهای حاوی رافینوز دارای قدرت شنای بالاتری نسبت به پلتهای بدون رافینوز بودهاند ($P<0.05$) به هر حال درصد بازیابی تحرک اسپرم برای پلت استاندارد (تیمار ۱)، پلتهای حاوی رافینوز و پایوتهای حاوی رافینوز ۵۷٪، ۶۷٪ بوده است. درصد بازیابی قدرت شنای اسپرم برای سه نمونه بالا به ترتیب ۱۴٪ ۲۵٪ و ۷٪ بوده است. درصد بازیابی شنای اسپرم به طور معنیداری ($P<0.05$) برای نمونه حاوی رافینوز بالا بوده است.

ارزش کای مربع برای درصد عدم برگشت میشهای تلقیح شده به فحلی و درصد برهزایی میشهای تلقیح شده به ترتیب ۱/۰۵ و ۰/۱۵۷ بوده است که هیچ اختلاف معنیداری را بین تیمارها نشان نداده است.

جدول شماره ۵ ضریب همبستگی بین خصوصیات منی و قدرت باروری آن را نشان میدهد. رابطه معنیداری بین درصد تحرک اسپرم و درصد برهزایی وجود دارد. تست قدرت شنای اسپرم بعد از ذوب، همبستگی معنیداری را با میزان ATP اسپرمهای زنده ($P<0.05$)، با میزان ATP کل اسپرماتوزوآ ($P<0.02$) و با درصد میشهای تلقیح شدهای که فحل نشدهاند ($P<0.1$) داشته است.

بحث

کاهش درصد تحرک اسپرم و قدرت شنای اسپرم ($P<0.05$) برای منی رقیق در بافر حاوی رافینوز نسبت به منی رقیق شده در بافر بدون رافینوز در مرحله قبل از انجماد را میتوان به فشار اسمزی هیپرتونیک رافینوز مربوط دانست که موجب از دست دادن آب و کاهش مصرف گلوکز به وسیله سلول شده است (۱). با توجه به اینکه افزودن رافینوز به بافر استاندارد تریس موجب افزایش درصد اسپرمهای زنده پس از انجماد و ذوب



شکل ۴- رقیق کردن سرم در حمام آب گرم

شکل ۵- ذخیره اسپرم منجمدشده در مخزن ازت مایع

مـــنی مـــی‌گردد، تـــئوری ضـــرورت از دست دادن آب(دهیدراسیون) برای حفاظت از سلول در مرحله انجماد (۵) به وسیله آزمایشات حاضر در این مقاله مورد تأیید قرار می‌گیرد. همچنین در آزمایشات حاضر زنده ماندن بهتر اسپرماتوزوآ پس از انجماد و ذوب بر اثر افزودن رافینوز و انجماد سریع پس از آن جهت نگهداری درازت مایع،مؤید تئوری دهیدراسیون است.

در آزمایشات مزرعه‌ایی که درصد عدم برگشت فحلی میشهای تلقیح شده به عنوان معیاری از میزان باروری برای مقایسه سریع استفاده شد (۱۵) هیچ تفاوت معنی‌داری را بین تیمارها نشان نداد. اعداد و ارقام بره‌زایی نیز تفاوت معنی‌داری را بین تیمارها نشان نداده است. بنا به دلایل خاص تجارتی، تلقیح مصنوعی در اواخر سپتامبر قبل از فصل جفت‌گیری انجام شد که در این حالت بعضی از میشها بعد از تلقیح مصنوعی به حالت عدم سیکل فحلی برگشتند که این امر موجب عدم شناسایی آنان به وسیله قوچ فحل یاب شد. همچنین میزان مرگ و میر جنینی در اوایل فصل جفت‌گیری بالا گزارش شده است (۳). به ویژه در میشهایی که به وسیله اسپرم ذوب شده به جای اسپرم تازه تلقیح شده‌اند نیز مرگ و میر جنینی بالا گزارش شده است (۸ و ۹).

تا کنون گزارشی درباره استفاده از رافینوز در انجماد اسپرم به صورت آزمایشات فوق گزارش نشده است. اما عملکرد بافرتریس - گلوکز - زرده تخم‌مرغ و بافرسیترات - رافینوز - زرده تخم‌مرغ برای انجماد اسپرم قوچ را محققین استرالیایی (۱۷) مقایسه کرده و پس از تلقیح اسپرم ذوب شده بره‌زایی به ترتیب ۴۰٪ (۲۸/۷۰) و ۴۴/۸٪ (۳۰/۶۷) بوده است.

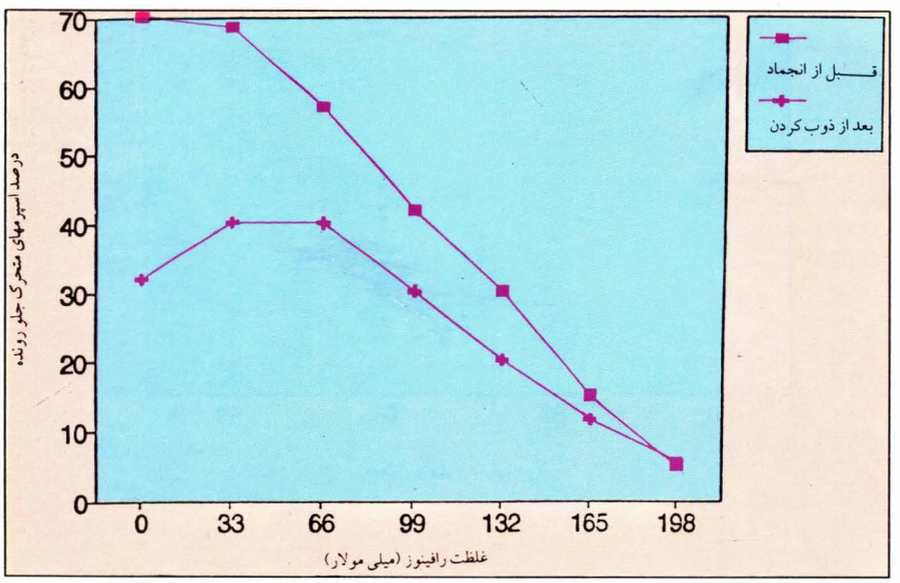
نتیجه

در این مطالعه بدون هیچ اثر منفی در قدرت باروری اسپرم قوچ، قدرت زنده ماندن و تحرک آن، با استفاده از محلول با فشار اسمزی بالای حاوی رافینوز افزایش یافته است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای مهندس مظاهر صفدریان و خانم ناهید میرزاخانی برای همکاری در تنظیم و تایپ این مقاله قدردانی می‌شود.

نمودار ۲- اثر رافینوز (میلی‌مولار) بر درصد اسپرمهای متحرک قبل از انجماد و بعد از ذوب کردن



پاورقی‌ها

1. Vitrification
2. Cambridge
3. Tris [(hydroxymethyl) aminomethane]
4. Egg-Yolk Fructose diluent
5. Texel rams

منابع مورد استفاده

1. Ahangari, Y.J., 1992. Cryopreservation of

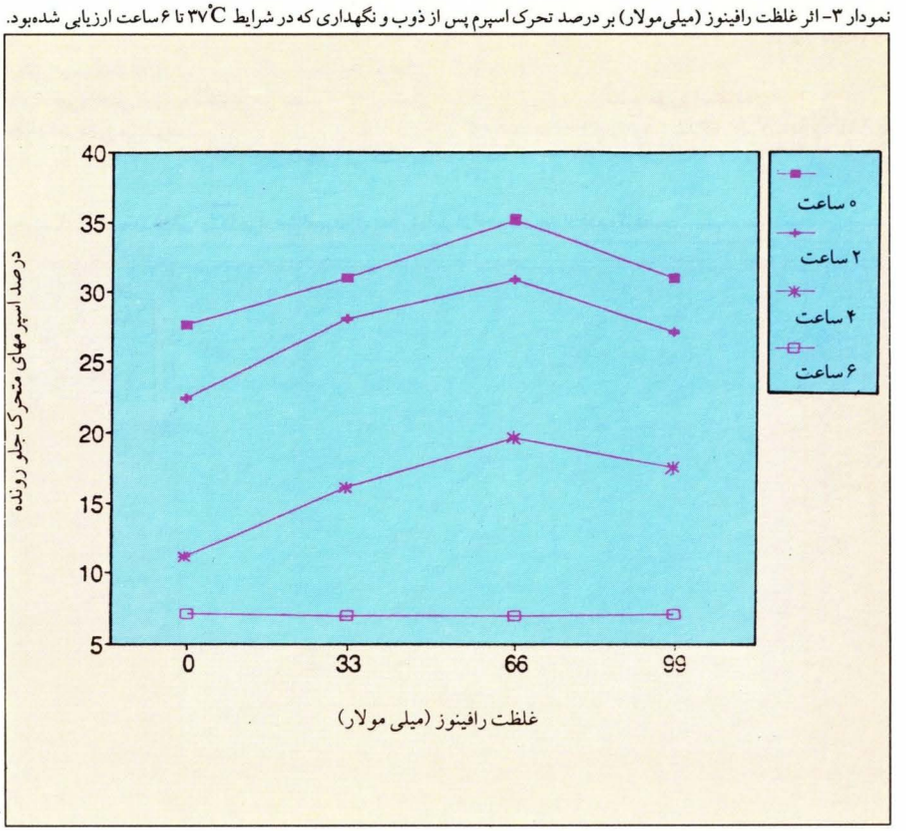
جدول ۳: اثر رفینوز بر روی صفات منی رقیق شده در مراحل قبل و بعد از انجماد به صورت پلت و یا در پایوت منجمد

روشهای انجماد منی قوچ				
صفات ارزیابی‌شده	پلت استاندارد	پلت حاوی رافینوز	پایوت حاوی رافینوز	ارزش F
قبل از انجماد				
درصد تحرک	۶۳/۰۰(۰/۴۵)a	۵۹/۰۰(۰/۶۸)b	۶۰/۰۰(۰/۰۰)b	۳۲/۵۰***
درصد اسپرم زنده	۶۴/۵۰(۰/۲۲)	۵۹/۶۷(۰/۳۳)b	۶۰/۰۰(۰/۰۰)b	۱۹۶/۷۵***
درصد آکروزوم غیر طبیعی	۲۷/۸۳(۰/۹۸)b	۲۸/۰۰(۰/۸۹)b	۳۱/۵۰(۱/۵۷)a	۳۳۷/۰۰***
درصد اسپرمهای مقاوم به فشار اسمزی	۴۲/۵۰(۱/۱۲)a	۴۰/۳۳(۱/۰۵)b	۳۹/۰۰(۰/۴۷)c	۳۳۷/۰۰***
تست قدرت شنای اسپرم	۱/۷۷(۰/۱۵)b	۱/۳۷(۰/۰۹)c	۱/۵(۰/۱۷)a	۱/۵۳**
میزان ATP موجود	۱۳۲۰(۱/۰۸)a	۲۱/۴۸(۰/۴۲)b	۱۸/۹۴(۰/۹۶)a	۳۶/۳۴***
پس از انجماد				
درصد تحرک	۳۶/۷۶(۰/۷۶)b	۴۰/۱۷(۲/۳۲)a	۴۰/۰۰(۲/۲۴)a	۱۹۱/۳***
درصد اسپرم	۳۸/۶۷(۰/۶۷)b	۴۱/۵۰(۲/۰۶)a	۴۱/۵۰(۲/۰۱)a	۲۰/۳***
درصد آکروزوم‌غیر طبیعی	۵۳/۰۰(۱/۲۹)a	۴۸/۶۷(۰/۶۱)b	۴۷/۶۷(۱/۵۲)b	۲۰/۱۹***
درصد اسپرمهای مقاوم به فشار اسمزی	۱۰/۳۳(۰/۳۳)a	۶/۸۳(۰/۵۴)b	۷/۰۰(۰/۴۵)b	۷۲/۵۹***
تست قدرت شنای اسپرم	۰/۳۴(۰/۰۴)b	۰/۲۸(۰/۰۲)c	۰/۴۰(۰/۰۰۱)a	۱۴۷/۵***
میزان ATP موجود	۱۰/۳۴(۱/۳۲)a	۵/۵۰(۰/۵۰)b	۱۲/۵۰(۲/۰۶)a	۶/۳**

***P<0.005

**P<0.01

نمودار ۳- اثر غلظت رافینوز (میلی‌مولار) بر درصد تحرک اسپرم پس از ذوب و نگهداری که در شرایط ۳۷°C تا ۶ ساعت ارزیابی شده‌بود.



ram semen for artificial insemination. ph.D. Thesis. University of Wales, Bangor, UK.

2. Colas, G., 1975. Effect of initial temperature addition of glycerol and dilution on the survival and fertilising ability of deep-frozen ram semen. J. Reprod. fert., 42:277.

3. Cooper R.J, 1982, The agricultural notebook, primrose McConnel,s. Editor R.J. Halley. Butterworths.

4. E. Evans, G. and Maxwell, W.M.C, 1987. Salamon, artificial insemination of sheep and goats.

5. Fahy, G.M. Macfarlane, D.R., Angell, C.A. and Meryman, H.T, 1984: Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology., 21:407.

6. Grudova, C., Kaludina, T., Dacheva, D. and Okoliska, l. 1988, Influence of some cryoprotectors of ATP concentration in ram spermatozoa at different stages of cryoconservation. proc.
of the 11th Inter. cong. anim. Reprod, Dublin. paper No. 249.

7. Lightfoot R.C. and Salamon, S., 1969, Freezing ram spermatozoa by the pellet method. II. The effect of method of dilution, dilution rate, glycerol concentration, and duration of storage at -5°c prior to freezing on survival of spermatozoa. Aust J. Biol. Sci., 22:1547-1560.

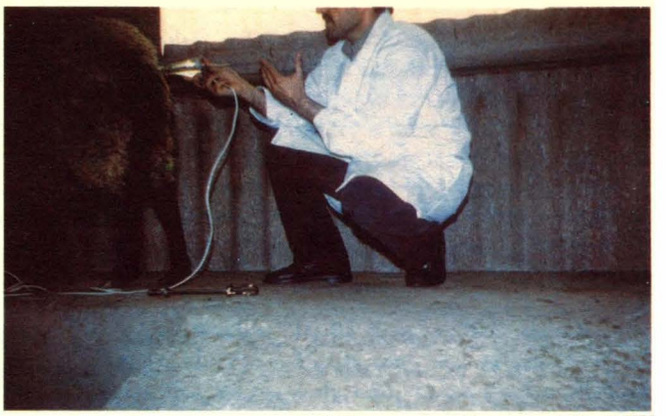
8. Lightfoot, R.C. and Salamon, S., 1970, Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method I. Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewes. J. Reprod. Fert. 22:385-398.

9. Langford, G.A., Marcus, G.J., Hackett, A.J., Ainsworth, L., Woolynetz, M.S. and Peters, H.F. (1979). A comparison of fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. can. J. Anim. SCI., 59:685-691.

10. Mazur, P., 1966, Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. Cryobiology. vol.2:181-192.

11. Mazur, p., 1970, Cryobiology: The freezing of biological systems. Science. N.Y., 166:939.

12. Mazur, p., 1980. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. proc. of AI. IX Inter. Cong. Anim. Reprod. & AI, Madrid. p99.



شکل ۶- تلقیح مصنوعی داخل رحمی در میش‌ها

شکل ۷- تلقیح مصنوعی داخل رحمی در میش‌ها

جدول ۴: میزان باروری میشهای تلقیح شده به وسیله منی منجمد و ذوب شده قوچ که در بافر استاندارد و بافر حاوی رافینوز رقیق شدند و به روش پلت و یا پایوت منجمد شده‌اند.

روشهای انجماد اسپرم قوچ	تعداد میشهای تلقیح شده	درصد میشهایی که بعد از تلقیح مصنوعی فحل نشده‌اند	درصد میشهای تلقیح شده‌ای که بره زائیده‌اند
پلت استاندارد	۳۴	۲۱(۴/۳۴)	۱۲(۴/۳۴)
پلت حاوی رافینوز	۳۵	۲۰(۷/۳۵)	۱۵(۵/۳۴)
پایوت حاوی رافینوز	۳۹	۳۱(۱۲/۳۹)	۱۵(۶/۳۹)

جدول شماره ۵: ضریب همبستگی (r) بین صفات اسپرم ارزیابی شده و میزان باروری

	درصد تحرک اسپرم	تست قدرت شنای اسپرم	میزان کل ATP	درصد عدم برگشت به فحلی+
قدرت شنای اسپرم	۰/۰۰			
میزان ATP به ازای کل اسپرم	-۰/۱۸۵	۰/۹۸۳***		
میزان ATP به ازای اسپرم زنده	-۰/۲۴۱	۰/۹۷۱**	۰/۹۹۸***	
درصد عدم برگشت به فحلی+	۰/۴۲۷	۰/۹۰۴*	۰/۸۱۰	
درصد بره‌زایی	۰/۹۴۵*	۰/۳۲۷	۰/۷۰۰۰/۱۴۷	

+ درصد عدم برگشت به فحلی همان درصد میشهایی است که پس از تلقیح مصنوعی فحل نشدند.

*P<۰/۰۱

**P<۰/۰۵

***P<۰/۰۲

13. polge, C. and Rowson, L.B.A, 1952, Fertilising capacity of bull sperm after freezing at -79°c. Nature., 169:626-627.

14. Salamon, S, 1968, Deep freezing of ram semen: Recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. Aust. J. Biol. Sci., 21:351-360.

15. Salamon. S. and lightfoot, R.J, 1970, Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. III. The effect of insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing. J. Reprod. Fert. 22:409-423.

16. Slavik, T, 1987, Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. J. Reprod. Fert., 79:99-103.

17. Visser, D. and Salamon, S. 1973, Fertility of ram spermatozoa frozen in a tris based diluent. Aust. J. Biol. Sci., 29:513-516.

18. Watson, P.F.1975, Use of giemsa stain to detect changes in acrosome of frozen ram spermatozoa. Vet. Rec., 97:12-15.

19. Watson, P.F.1979, The preservation of semen in mammals. In Oxford reviews of Reproductive Biology, Ed. finn, C.A., Oxford press. Vol. 1:283-350.