اثر افزودن عصاره رزماری به رقیق‌کننده حاوی سطوح مختلف گلیسرول بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ‌های مغانی

محمد حسین ناجی[۱]، ابوالقاسم لواف[۱]، بهزاد همتی[۲*]

تاریخ دریافت:۱۳۹۶/۰۶/۱۵
تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۰۸/۱۸

چکیده

هدف از پژوهش پیش رو مطالعه بررسی اثرات افزودن غلظت‌های مختلف عصاره رزماری به همراه غلظت‌های مختلف گلیسرول به رقیق‌کننده، بر ویژگی‌های جنبایی، زنده مانی و یکپارچگی غشایی اسپرم قوچ‌های مغانی در طی مراحل انجماد- ذوب بود. برای اینکار از تعداد جهار راس قوچ با میانگین سنی ۳ تا ٤ سال به صورت دو بار در هفته و به مدت سه هفته (٦ تکرار) اسپرم گیری صورت گرفت. پس از انتقال اسپرم به آزمایشگاه و ارزیابی اولیه، اسپرم‌ها برای حذف اثرات فردی با هم مخلوط شده و به تعداد ٦ تیمار آزمایشی که شامل ۳ سطح عصاره رزماری (۰، ۲ و ٤ درصد حجمی/حجمی) و دو سطح گلیسرول (۵ و ۷ درصد) بود تقسیم گردید. پس از آن تیمارها برای مدت ۲/۵ ساعت در دمای پنج درجه سلسیوس قرار داده شدند تا به تعادل برسند. پس از این مرحله اسپرم‌ها به پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شد. پس از آن پایوت‌ها بوسیله یک روش استاندارد توسط بخار ازت مایع منجمد شدند و جهت ذخیره‌سازی در داخل ازت مایع غوطه‌ور گردیدند. فراسنجه‌های اسپرم، از جمله جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی و یک‌پارچگی غشایی توسط نرم‌افزار کاسا (CASA) ارزیابی شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزودن ۲ درصد عصاره رزماری به همراه ۵ درصد گلیسرول به محیط انجمادی اسپرم قوچ سبب بهبود جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشایی پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی شد که نسبت به سایر تیمارها تفاوتی معنی‌دار ایجاد کرده بود ($P < 0.05$). از نظر فراسنجه‌های VCL، STR، ALH، VAP هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیماری مشاهده نشد($P> 0.05$). بر اساس یافته های این تحقیق، افزودن عصاره رزماری به همراه ۵ درصد گلیسرول به رقیق کننده اسپرم قوچ‌های مغانی سبب بهبود فراسنجه-های کیفی پس از یخ‌گشایی می‌شود.

کلمات کلیدی: اسپرم قوچ، گلیسرول، عصاره رزماری، انجماد- یخ‌گشایی، جنبایی اسپرم

۱- گروه علوم دامی ،واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی ، کرج، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی ، کرج، ایران

*عهده دار مکاتبات: bzdhmt@gmail.com

مقدمه

انجماد منی پستانداران، تحولی اساسی در نگهداری منی (Purdy, 2006) و حفاظت از انجماد سلول اسپرم، راهی برای حفظ ژرم پلاسم[۱] (پروتوپلاسم سلول جنسی) بوده که می‌تواند با حفظ DNA گونه‌ها، در دامپروری، آبزی پروری و حفظ تنوع زیستی کاربرد داشته (Holt, 2000) و بانک‌های ذخیره اسپرم، می‌توانند همراه با دیگر تکنولوژی‌های تولید مثلی، در بهبود نژادها (Purdy, 2006) و حفاظت گونه‌های وحشی و بومی در حال انقراض، نقش داشته باشند (Quinn et al., 1980). همچنین با انجماد اسپرم، امکان قرنطینه کردن آن (Purdy, 2006)، انتقال آن به فاصله‌های خیلی دور (Leboeuf *et al*., 2000) ، کنترل بیماری‌ها و حفظ بانک‌های ژنتیکی ممکن می‌شود. جهت پیشرفت در روش‌های انجماد اسپرم (Purdy, 2006) و رسیدن به بیشترین نرخ بازیابی و باروری اسپرم یخ گشایی شده (Leboeuf *et al*., 2000)، آگاهی از پیچیدگی غشای پلاسمایی اسپرم گونه‌های مختلف (Holt, 2000)، بر هم کنش بین ترکیبات غشا، و تاثیر سردسازی، انجماد و یخ گشایی روی غشای اسپرم ضروری می‌باشد (Aboagla and Terada, 2004).

غشای پلاسمایی اسپرم، مدل کامل و عالی جهت بررسی اثر عوامل برونزادی[۲] مختلف، روی غشاها بوده و نقش بیولوژیکی منحصر به فردی را در فرآیند باروری ایفا می‌کند (Purdy, 2006). انجماد و یخ‌گشایی، تکامل غشای اسپرم را افزایش و منجر به واکنش آکروزومی سلول اسپرم شده، همچنین فرآیندهای ظرفیت پذیری و واکنش‌آکروزمی، جنبایی اسپرم را تحت تاثیر قرار داده، از طرفی دیگر عمر و توانایی آن را در واکنش با دستگاه تولید مثل ماده و باروری کاهش می‌دهد (Holt, 2000).

در مراحل حفاظت از انجماد سلول اسپرم، عوامل کلیدی زیادی مثل ترکیب پلاسمای منی (Tuli et al., 1981)، ترکیب شیمیایی رقیق‌کننده‌ها، نوع و غلظت حفاظت‌کننده‌های انجمادی[۳]، دمای نگهداری، میزان دمای انجماد، دوره تعادل دهی، روش انجماد و یخ‌گشایی، رادیکال‌های آزاد و کنترل بهداشت روی عمر سلول اسپرم اثر گذاشته و تعادل بین این عوامل جهت کسب نتایج رضایت بخش، اهمیت دارد (Holt, 2000).

تمام روش‌های انجماد سلولی بر اساس استفاده از یک یا چند ماده محافظ سرما توسعه یافته است. لازمه یک محافظ سرمایی، بالا بودن قدرت نفوذ و سمیت پایین آن است. به طور کلی ترکیبات محافظ انجماد می‌توانند به گروه‌هایی با روش‌های عمل متفاوت تقسیم شوند. گلیسرول به همراه موادی همچون متانول، اتیلن گلیکول و دی متیل سولفوکساید به عنوان عوامل محافظ سرمای درون سلولی یا نفوذ کننده تقسیم می‌شوند، که وزن مولکولی آن ها نسبتا کم است. این مواد از تجمع مولکول‌های آب با یکدیگر برای تشکیل کریستال‌های یخ در درون اسپرم جلوگیری می‌کنند و برای آب‌گیری آب داخل سلولی ضروری هستند. همچنین نقطه انجماد پایین آن‌ها، زمان بیشتری برای آبگیری ایجاد می‌کند (Blash *et al*., 2000).

گلیسرول وسیع‌ترین عامل محافظ انجمادی استفاده شده برای اسپرم است و دامنه‌ی وسیعی از فاکتورها عمل آن را روی زنده‌مانی و ظرفیت باروری اسپرم تحت تاثیر قرار می‌دهد (Anel *et al*., 2003). انجماد بدون گلیسرول، غلظت مواد خارج سلولی را افزایش

۱ - Germplasm

۲ - Exogenous

۳ - Cryoprotectant

و تراوایی غشا را تغییر می‌دهد؛ به گونه‌ای که برخی مواد از سلول به بیرون می‌روند و تغییرات pH ناشی از ترکیبات غیرالکترولیتی سبب آسیب‌هایی به اسپرم می‌شود. خاصیت حفاظتی گلیسرول مربوط به توانایی برقراری پیوند آن با آب است و با افزایش حلالیت نمک در رقیق‌کننده‌ها باعث کاهش فشار اسمزی رقیق‌کننده می‌شود (Blash *et al*., 2000). افزودن گلیسرول به مایع منی قبل از انجماد، شامل مرحله موازنه است که در طی این مرحله آب درون سلولی اسپرم به واسطه شیب غلظت اسمزی خارج شده و گلیسرول جایگزین آن می‌شود و به این ترتیب مانع از تشکیل کریستال‌های یخ درون‌سلولی شده و سلول‌ها را در برابر آسیب حاصل از تشکیل کریستال‌های یخ محافظت می‌کند. گلیسرول به سلول اسپرم نفوذ کرده و سلول را به صورت جزیی دهیدراته می‌کند، از این رو خطر تبلور آبی را کاهش می دهد (Mosenene, 2009).

رادیکال‌های آزاد جزئی از مولکول‌های مشتق شده از اکسیژن هستند که به دلیل دارا بودن یک الکترون جفت نشده یا بیشتر، مولکول‌های بسیار واکنش‌پذیر و فعال محسوب می‌شوند و مولکول‌های نظیر خود را مورد حمله قرار می‌دهند تا الکترون آن را بدست آورند. در نهایت مولکول پذیرنده خود تبدیل به رادیکال آزاد می‌شود که منجر به آسیب سلولی می‌گردد. از طرفی دیگر سطح فیزیولوژیکی رادیکال‌های آزاد، به حفظ هموستازی بوسیله سیگنال‌های انتقال دهنده کمک می‌کند (Aitken and Roman, 2009). رادیکال‌های آزاد نقش دوگانه‌ای را در باروری دارند. از نظر فیزیولوژیکی رادیکال‌های آزاد به بلوغ اسپرم، ظرفیت پذیری[۴]، بیش فعال شدن اسپرم[۵]، واکنش اکروزومی و آمیختگی اسپرم- تخمک[۶] کمک می‌کنند و از نظر پاتولوژیکی رادیکال‌های آزاد باعث پراکسیداسیون لیپید، آسیب DNA و القای آپوپتوز می‌شوند و می‌توانند باعث آسیب‌های شدید در اسپرم گردند (Saleh and Agarwal, 2002). اسپرم‌ها به طور ویژه‌ای مستعد آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد هستند، به دلیل اینکه غشای پلاسمایی اسپرم دارای فسفولیپیدها، اسیدهای چرب اشباع، اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه[۷] (PUFA) و استرول‌های زیادی است. رادیکال‌های آزاد باعث القای پراکسیداسیون لیپیدی به ویژه هنگام محافظت انجمادی در غشا اسپرم شده و پراکسیداسیون اسیدهای چرب ناشی از آن دارای اثرات سمی بر روی اسپرم است که منجر به کاهش عملکرد اسپرم می‌گردد این آسیب پراکسیداتیو موجب کاهش یک‌پارچگی غشا، آسیب به عملکرد سلول، کاهش جنبایی و کاهش توانایی باروری اسپرم می‌شود (Holt, 2000).

سازوکارهای متفاوتی برای مهار تنش اکسیداتیو و کاهش آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد (ROS) وجود دارد که یکی از آنها استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در محیط است. برخی از آنتی‌اکسیدان‌هایی که در این فرآیند موثر هستند عبارتند از: آنتی اکسیدان‌های گیاهی، کارنیتین‌ها، ویتامین C، ویتامین E، ترکیبات فنلی، گلوتاتیون، برخی مواد معدنی ریزمغذی مانند روی، سلنیوم و برخی آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی مانند BHT و BHA (Agarwal and Sekhon, 2010). آنتی‌اکسیدان‌ها به دلیل اینکه الکترون خود را به رادیکال آزاد می‌دهند باعث پایداری آن می‌شوند بنابراین باعث می‌شوند که زنجیره اکسیداسیون شکسته شود. از طرف دیگر باید میزان اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها در یک نسبت خاص حفظ شود و هر گونه تغییر در جهت افزایش این نسبت به سمت اکسیدان‌ها، شرایط استرس اکسیداتیو را ایجاد می‌کند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی رادیکال‌های مازاد را از محیط خارج ساخته و سبب ایجاد تعادل بین آنتی‌اکسیدان‌ها و تنش اکسیداتیو می‌شوند (Kefer *et al*., 2009; Da Silva *et al*., 2010).

۴- Capacitation

۵ - Hyperactivation

۶- Fertilization

۷- Poly unsaturated fatty acid

گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) از خانوادهٔ نعناعیان (*Lamiaceae*) است. اثرات آنتی اکسیدانی این گیاه به خوبی شناخته شده است. برگ و سرشاخه‌های گلدار گیاه، اندام داروئی رزماری را تشکیل می‌دهد. برگ و سرشاخه‌های گلدار گیاه رزماری هنگام شروع باز شدن گل‌ها و در فصول بهار و تابستان جمع‌آوری می‌گردد. عمده‌ترین ترکیبات موجود در روغن فرار گیاه را ۱و۸ ـ سینئول (1,8-Cineol)، بورنئول (Borneol)، کامفر (Campher)، بورنیل استات (Bornyl acetate)، آلفاپی‌نن (α-Pinene)، بتا- پینن و اسیدهای فنلی مانند اسید رزمارینیک (Rosmarinic acid) تشکیل می‌دهند که بسته به شرایط جغرافیائی محل کشت گیاه، میزان و درصد هر یک از این مواد متغیر می‌باشد (Thorsen and Hildebrandt, 2003; Peng *et al*., 2005). آثار آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری نیز در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی بررسی شده است. در برخی از این موارد، آثار فوق با آثار آنتی‌اکسیدان‌های شناخته شده‌ای نظیر BHA (Botylated Hydroxy Anisole) و BHT (Botylated Hydroxy Aoluene) برابری می‌نماید (Sebranek *et al*., 2005). BHT و BHA آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی هستند که بیشتر در صنایع غذایی و برای جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌های مواد غذایی استفاده می‌شوند. گزارش شده است که قدرت آنتی‌اکسیدانی این دو ترکیب در مواد غذایی با سایر آنتی- اکسیدان‌های شناخته شده مرسوم برابری می‌کند (Soobrattee *et al*., 2005; Hinneburg *et al*., 2006). چندین مطالعه، خواص آنتی اکسیدانی رزماری را را اثبات کرده است، به طوری که این خاصیت رزماری از چای سبز کمتر و از ویتامین E بیشتر است. در پژوهشی که تورک و همکاران (۲۰۱٦) برروی اثر رزماری در بیضه بلدرچین‌های ژاپنی تحت استرس گرمایی انجام دادند به این نتیجه رسیدند که مکمل سازی جیره با رزماری باعث کاهش اکسیداسیون لیپیدی شده و باعث افزایش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی می‌شود. همچنین زنگانه و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که افزودن عصاره رزماری به رقیق کننده اسپرم بز باعث بهبود فراسنجه های کیفی اسپرم پس از فرایند انجماد و یخ گشایی می‌شود.

بنابراین با توجه به وجود تاثیر آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری، هدف از پژوهش پیش رو، ارایه راهکاری نوین برای انجماد و بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم گوسفند پس از یخ‌زدن با افزودن غلظت‌های مختلف عصاره رزماری (۰، ۲ و ٤ درصد حجمی/حجمی) به رقیق‌کننده به همراه غلظت‌های مختلف گلیسرول (۵ و ۷ درصد) به عنوان محافظ سرما بر ویژگی‌های جنبایی، زنده مانی و یکپارچگی غشایی اسپرم گوسفند در طی مراحل انجماد- ذوب بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از چهار راس قوچ مغانی با میانگین سنی ۳-٤ سال برای اسپرم گیری استفاده شد. قوچ‌ها در شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان نگهداری شدند. پس از عادت‌دهی و آموزش قوچ‌ها برای اسپرم‌گیری، جمع‌آوری منی به صورت هفته‌ای دو بار به مدت سه هفته و در فصل تولیدمثلی به وسیله مهبل مصنوعی[8] انجام شد. نمونه‌های منی درون فلاسک عایق دارای آب ۳۷- ۳۵ درجه سلیسیوس سریعا به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب گرم قرار داده شدند. بی‌درنگ پس از بررسی‌های اولیه نمونه‌های دارای غلظت بیشتر از $۱۰^{۹}$ × ۲/۵ اسپرم درمیلی‌لیتر، حجم بین ۲- ۰/۷۵ میلی‌لیتر، جنبایی کل بیشتر از ۷۰ درصد و ریخت‌شناسی کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیرطبیعی در هر انزال به عنوان نمونه طبیعی در نظر گرفته شدند. پس از آن برای از میان برداشتن اثر فردی، نمونه‌های منی با یکدیگر آمیخته شدند. مواد شیمیایی مورد نیاز در این آزمایش و اجزای تشکیل دهنده رقیق‌کننده از شرکت سیگما (*SIGMA ALDRICH St. Louis, MO, USA*) خریداری شده بودند.

8 Artificial Vagina

نمونه‌ی منی مخلوط شده به شش بخش مساوی جهت رقیق‌سازی در محیط‌های انجماد مربوطه تقسیم شدند. تیمارهای آزمایشی شامل **تیمار ۱)** رقیق کننده حاوی ۵ درصد گلیسرول و بدون عصاره رزماری (R0G5)، **تیمار ۲)** رقیق کننده حاوی ۷ درصد گلیسرول و بدون عصاره رزماری (R0G7)، **تیمار ۳)** رقیق کننده حاوی ۵ درصد گلیسرول و ۲ درصد عصاره رزماری (R2G5)، **تیمار ٤)** رقیق کننده حاوی ۷ درصد گلیسرول و ۲ درصد عصاره رزماری (R2G7)، **تیمار ۵)** رقیق کننده حاوی ۵ درصد گلیسرول و ٤ درصد عصاره رزماری (R4G5) و **تیمار ٦)** رقیق کننده حاوی ۷ درصد گلیسرول و ٤ درصد عصاره رزماری (R4G7) بودند. رقیق‌سازی به نسبت ۱ حجم منی و ۲۰ حجم محیط‌های انجماد (حاوی تیمارهای آزمایشی) در دمای اتاق انجام شد. پس از رقیق‌سازی، برای تعویض گلیسرول با آب موجود در اسپرم، نمونه‌های رقیق شده برای مدت ۱۵۰ دقیقه در یخچال قرار داده شدند تا دمای آن به حدود ٤ تا ۵ درجه سلسیوس برسد. اسپرم‌ها پس از رقیق و سرد شدن تا دمای ٤ تا ۵ درجه سلسیوس، به پایوت‌های (استرا) ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شده و انتهای آن‌ها به‌وسیله پودر پلی‌وینیل الکل[۹] بسته شد. سپس با استفاده از جعبه‌ی استایروفوم[۱۰] پایوت‌ها در فاصله چهار سانتی‌متری از بخار نیتروژن قرار داده شده و پس از ۱۰ دقیقه در داخل نیتروژن مایع شناور شدند. در مرحله پایانی، پایوت‌ها به گوبلت‌های نشان‌دار منتقل شده و تا زمان ارزیابی فراسنجه‌های کیفی در نیتروژن مایع نگه‌داری شدند. پس از ذخیره‌سازی به مدت چند هفته، پایوت‌ها به صورت جداگانه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آب گرم جهت ارزیابی میکروسکوپی ذوب شدند. جنبایی اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر) تعیین شد. به این منظور سه پایوت از هر گروه تیماری در هر تکرار (هفته) یخ‌گشایی شدند و جنبایی اسپرم با استفاده از سامانه کامپیوتری ارزیابی اسپرم[۱۱] (CASA; Sperm 3.1, Russia) ارزیابی شد. فراسنجه‌های ارزیابی شده مربوط به تحرک در این برنامه شامل جنبایی کل[۱۲]، جنبایی پیش‌رونده[۱۳]، درصد خطی بودن جنبایی[۱٤] (LIN)، راستی مسیر طی شده[۱۵] (STR)، سرعت در مسیر منحنی[۱٦] (VCL)، جنبایی عرضی سر[۱۷] (ALH)، میانگین سرعت در مسیر[۱۸] (VAP) و سرعت در مسیر مستقیم[۱۹] (VSL) بودند.

برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از آزمون هاس[۲۰] (HOST) استفاده شد. با توجه به اینکه اسمولاریتی محیط هاس ۱۰۰ میلی‌اسمولار و اسمولاریته مورد نیاز برای اسپرم قوچ ۳٦۰-۳۲۵ میلی اسمول است، بنابراین اسپرم‌های سالم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. برای این کار ۳۰ میکرولیتر از منی با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از گذشت این زمان نمونه‌های انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری فاز کنتراست (بزرگنمایی ٤۰۰ برابر) ارزیابی و در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم

۹ Poly Vinyl Alcohol
۱۰ Styrofoam Box
۱۱ Computer Assisted System Analyzer (CASA)
۱۲ Total motility
۱۳ Progressive motility
۱۴ Linearity
۱۵ Sperm track straightness
۱۶ Curvilinear velocity
۱۷ Lateral head displacement
۱۸ Average path velocity
19 Straight line velocity
20 Hypo-Osmotic Swelling Test

شمارش شده و درصد اسپرم‌های با دم پیچ خورده و یا متورم (اسپرم‌های دارای غشای پلاسمایی سالم) نسبت به اسپرم‌های بدون پیچ‌خوردگی (دارای غشای پلاسمایی ناسالم) محاسبه شد. همچنین برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین استفاده شد. برای این کار ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ی اسپرم را برداشته و بر روی لام قرار داده می‌شود سپس ۲۰ میکرولیتر رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین بر روی نمونه ریخته و با سر سمپلر به آرامی نمونه مخلوط می‌شود. پس از تهیه گسترش و خشک شدن نمونه، لام ها زیر میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی ٤٠٠ مشاهده می‌شوند و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته می‌شود. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های مرده (رنگ گرفته) و زنده (بی رنگ یا نیمه رنگ گرفته) محاسبه شد.

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با شش تکرار توسط رویه‌ی GLM نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل شد و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند:

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

نتایج و بحث

جنبایی (تحرک) اسپرم تیمارهای مختلف پس از فرآیند یخزدن-یخ گشایی در این پژوهش در جدول یک گزارش شده است. جنبایی مهم‌ترین فراسنجه‌ای است که پس از فرآیند یخ‌گشایی نشان از کارآمد بودن یا نبودن اسپرم یخزده دارد.

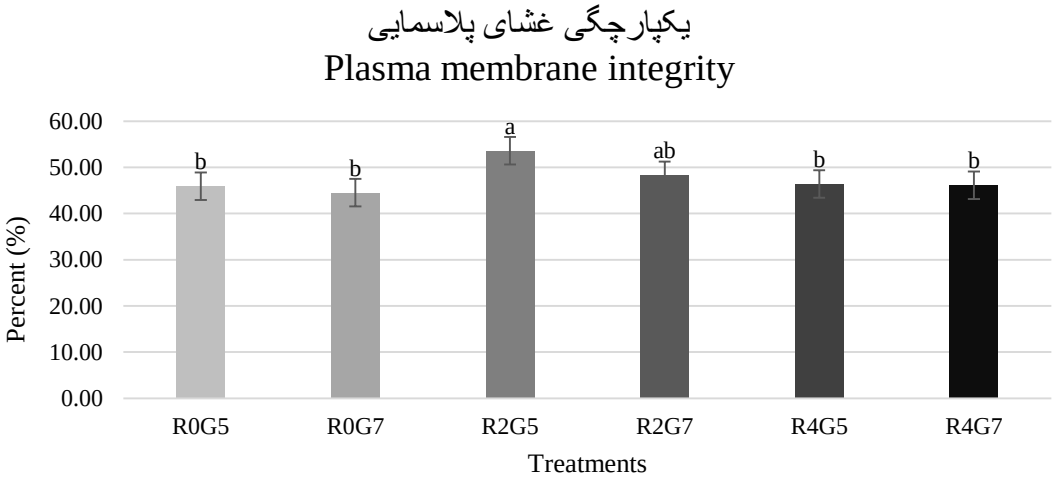
جدول ۱- اثر سطوح مختلف عصاره رزماری به همراه سطوح گلیسرول بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم قوچ پس از یخ‌گشایی

Table 1. The effect of addition of Rosemary extract to the extender on post thaw motion characteristics of Moghani ram semen

Variable/Treat	R0G5	R0G7	R2G5	R2G7	R4G5	R4G7	SEM
TM (%)	٤٧/١٧	٤٤/٥٥	٥٥/٣٣	٤٦/٣٣	٤٥/١٧	٤٥/٠٠	٣/٤٠
PM (%)	٢٦/٨٣	٢٧/٦٧	٣٦/٣٣	٢٧/٠٠	٢٩/٠٠	٢٧/٣٣	٤/١٣
LIN (%)	٤٨/٤٩	٤٨/٩٢	٥٥/٩٨	٤٨/٩٠	٥٢/٩٩	٤٨/٦٥	٤/٤٤
VSL, µm/s	٥٠/٧٣	٤٨/٠١	٥٧/٧١	٥٠/٢٣	٥٥//٠٨	٥٢/٦٦	١١/٨٠
VCL, µm/s	١٠٥/٦٣	١٠٠/٥٦	٥١/٠٨	٤٧/٨٤	٤٩/٨٥	٥٣/٧٣	٤/١٦
VAP, µm/s	٦٤/٥٠	٦١/٨١	٢٢/١٥	١٨/٣٤	٢٠/٠٦	٢١/٢٣	٣/٧٠
ALH, µm	١/٥٧	١/١٢	١/٦٠	١/٤٠	١/٤٩	١/٤٤	٠/٣٧
STR (%)	٧٨/٦٦	٧٨/٨٧	٨٥/٢٠	٧٩/٢٢	٨٤/٣٧	٧٩/٥٤	٥/٩٦

VCL: سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده، VSL: سرعت اسپرم در خط مستقیم، VAP: میانگین سرعت در مسیر مستقیم، LIN: معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد است، STR: معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد، ALH: حداکثر دامنه حرکات جانبی بر حسب میکرومتر، SEM: خطای استاندارد میانگین، R0G5: رقیق کننده حاوی ۵ درصد گلیسرول و بدون عصاره رزماری، R0G7: رقیق کننده حاوی ۷ درصد گلیسرول و بدون عصاره رزماری، R2G5: رقیق کننده حاوی ۵ درصد گلیسرول و ۲ درصد عصاره رزماری، R2G7: رقیق کننده حاوی ۷ درصد گلیسرول و ۲ درصد عصاره رزماری، R4G5: رقیق کننده حاوی ۵ درصد گلیسرول و ۴ درصد عصاره رزماری، و R4G7: رقیق کننده حاوی ۷ درصد گلیسرول و ۴ درصد عصاره رزماری.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که افزودن ۲ درصد عصاره رزماری به همراه ۵ درصد گلیسرول (R2G5) سبب افزایش جنبایی کل اسپرم‌های تیمار شده نسبت به سایر گروه‌های تیماری شده و از نظر آماری تفاوت معنی‌دار ایجاد کرده است (P< 0.05). همچنین میزان جنبایی پیش‌رونده در گروه تیماری R2G5 نسبت به همه گروه‌های دیگر به جز گروه R4G5 (P> 0.05) تفاوت معنی‌دار ایجاد کرده است (P< 0.05). علی رغم اینکه میزان فراسنجه VSL در گروه تیماری R2G5 از نظر عددی بالاتر از گروه‌های دیگر است اما از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌ها به جز گروه R0G7 (P< 0.05) ندارد (P> 0.05). همچنین از نظر فراسنجه‌های VCL، STR، ALH، VAP هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیماری مشاهده نشده است (P> 0.05).



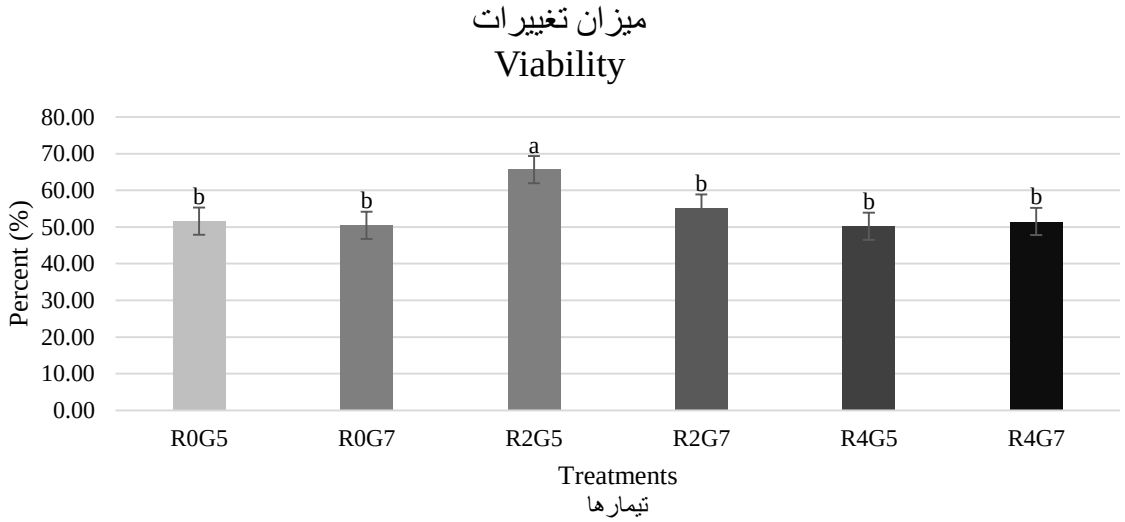
نمودار ۱- اثر سطوح مختلف عصاره رزماری به همراه سطوح گلیسرول بر یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم قوچ پس از یخ گشایی

a، b، c: میانگین های هر ردیف با حروف غیرهمسان اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

رقیق کننده حاوی ۵ درصد گلیسرول و بدون عصاره رزماری، R0G7: رقیق کننده حاوی ۷ درصد گلیسرول و بدون عصاره رزماری، R2G5: رقیق کننده حاوی ۵ درصد گلیسرول و ۲ درصد عصاره رزماری، R2G7: رقیق کننده حاوی ۷ درصد گلیسرول و ۲ درصد عصاره رزماری، R4G5: رقیق کننده حاوی ۵ درصد گلیسرول و ۴ درصد عصاره رزماری، و R4G7: رقیق کننده حاوی ۷ درصد گلیسرول و ۴ درصد عصاره رزماری

a

نمودار یک نشان می‌دهد که افزودن ۲ درصد عصاره رزماری به رقیق کننده به همراه ۵ درصد گلیسرول سبب بهبود یکپارچگی غشایی اسپرم‌های تیمار شده می‌شود. از نظر آماری تیمار R2G5 نسبت به همه گروه‌های تیماری به جز گروه R2G7 (P> 0.05) تفاوت معنی‌دار ایجاد کرده است (P< 0.05).



نمودار۲-اثر سطوح مختلف عصاره رزماری به همراه سطوح گلیسرول بر زنده‌مانی اسپرم قوچ پس از یخ گشایی

a، b، c: میانگین های هر ردیف با حروف غیرهمسان اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

رقیق کننده حاوی ۵ درصد گلیسرول و بدون عصاره رزماری، R0G7: رقیق کننده حاوی ۷ درصد گلیسرول و بدون عصاره رزماری، R2G5: رقیق کننده حاوی ۵ درصد گلیسرول و ۲ درصد عصاره رزماری، R2G7: رقیق کننده حاوی ۷ درصد گلیسرول و ۲ درصد عصاره رزماری، R4G5: رقیق کننده حاوی ۵ درصد گلیسرول و ۴ درصد عصاره رزماری، و R4G7: رقیق کننده حاوی ۷ درصد گلیسرول و ۴ درصد عصاره رزماری

براساس نتایج ارایه شده در نمودار ۲، زنده مانی اسپرم‌های تیمار شده با ۲ درصد عصاره رزماری به همراه ۵ درصد گلیسرول (R2G5)، بیشتر از سایر گروه‌های تیماری بود که از نظر آماری با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌دار داشت ($P< 0.05$).

در این پژوهش، از اسانس رزماری برای کاهش و جلوگیری از اثرات مخرب فرایند انجماد- یخ گشایی روی اسپرم قوچ استفاده شده است. با توجه به اینکه غشای پلاسمایی اسپرم دارای اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) زیادی است که می‌تواند به راحتی در حضور رادیکال‌های آزاد فعال (ROS) تحت پراکسیداسیون لیپیدی قرار گیرند، این آسیب اکسیداتیو موجب کاهش یکپارچگی غشا، آسیب به عملکرد سلول، کاهش جنبایی و کاهش توانایی باروری اسپرم برای تلقیح مصنوعی می‌شود. اقدام به انجماد اسپرم، قابلیت تحرک و زنده مانی اسپرم را بعد از یخ گشایی تحت تاثیر قرار می‌دهد، اگر چه غشای پلاسمایی و یکپارچگی غشای آکروزوم از عوامل مهم لقاح محسوب می‌شوند، با این حال، به نظر می‌رسد که تنش اکسیداتیو از عوامل کنترل کننده ضروری محسوب می‌شود. اسپرمی که به لحاظ عملکردی طبیعی است، سطوح پائینی از ROS را تولید می‌کند، اما در اثر فرآیندهای سرد کردن و انجماد کانال‌های یونی کلسیم تحریک شده و یک شیوع وابسته به کلسیمی از ROS را نشان می‌دهد، که در نهایت منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود. همچنین انجماد تنش‌های فیزیکی و شیمیایی بر روی غشای اسپرم ایجاد می‌کند که باعث کاهش جنبایی، یکپارچگی غشا و پتانسیل باروری اسپرماتوزوا می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار اسپرم‌ها با اسانس الکلی رزماری به طور موثری جنبایی کل و پیشرونده، زنده مانی و یکپارچگی عملکرد غشاء را بعد از یخ گشایی در سطح آماری ۵ درصد بهبود بخشید. همچنان که در مطالعه حاضر نشان داده شد، این بهبود در جنبایی کل و پیشرونده ممکن است با یکپارچگی ساختاری و عملکردی غشایی و زنده‌مانی اسپرم ارتباط داشته باشد. تاثیر اسانس رزماری بر ویژگی‌های اسپرم در سطح صفر درصد ممکن است به دلیل اثرگذاری

کمتر آن در بهبود یکپارچگی غشای اسپرم که با جنبایی اسپرم ارتباط دارد باشد. در پژوهشی اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری بر ویژگی‌های منی خوک بعد از انجماد مطالعه شد و به نتایج مشابه با نتایج مطالعه حاضر دست یافتند. همچنین دقیق کیا و همکاران (۲۰۱٤) نشان دادند که اثر رزماری تنها مربوط به بعد از یخ‌گشایی نمی‌شود و نرخ‌های بالاتری از جنبایی را طی انکوباسیون برای یک مدت معین پس از یخ گشایی سبب می‌شود (Daghigh-Kia *et al*., 2014). در مطالعه‌ای دیگر هیو و همکاران (۲۰۰۹) اثر عصاره گیاه رزماری را روی اسپرم خوک مورد بررسی قرار دادند و بعد از یخ‌گشایی بیان داشتند که این عصاره در سطوح ۰/۵ و یک میلی‌گرم/میلی‌لیتر جنبایی کل و یکپارچگی آکروزمی و غشایی را بهبود می‌بخشد که نتایج هر دو تحقیق کاملا با نتایج پژوهش حاضر در یک راستا بود. این نتایج نشان داد که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نقش مهمی را در جلوگیری از اکسیداسیون اسپرم و نیز حفظ جنبایی اسپرم در طی انجماد بازی می‌کنند. اما در پژوهشی که توسط جرز و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد، نشان داده شد که عصاره رزماری به تنهایی بر روی فراسنجه‌های اسپرم اثر مثبتی نداشته و فقط زمانی‌که به همراه زرده تخم مرغ در رقیق‌کننده استفاده شود می‌تواند برخی از فراسنجه‌ها نظیر جنبایی کل و پیش‌رونده و زنده‌مانی را بهبود بخشد (Jerez-Ebensperger *et al*., 2015). همچنین خدایی مطلق و همکاران (۲۰۱٤) نشان دادند که افزودن ۲ درصد عصاره رزماری به رقیق کننده بر پایه لسیتین سویا سبب بهبود جنبایی کل و پیشرونده نسبت به سطوح ٤ و ٦ درصد شده اما میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها را تحت تاثیر قرار نداد (Motlagh *et al*., 2014). زنگانه و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش کردند که افزودن ۲ درصد عصاره رزماری باعث کاهش سطح مالون دی آلدهید (شاخصی برای ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدی) نسبت به گروه‌های تیماری دیگر و گروه شاهد شده است در حالی‌که این میزان رزماری اثری بر روی جنبایی کل و پیشرنده نداشت (Zanganeh *et al*., 2013).

گلیسرول رایج‌ترین سرما محافظی است که برای انجماد اسپرم گونه‌های دامی به خصوص قوچ استفاده می‌شود. در مطالعه‌ای کاندا و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که درصد اسپرم‌های متحرک بز پس از یخ‌گشایی با استفاده از ٦ درصد از محافظت کننده‌های انجمادی نفوذپذیر گلیسرول، اتیلن گلیکول، دی متیل سولفوکساید، به ترتیب برابر ۳۵، ۱۳ و ۲۱ درصد بود. آن‌ها هم‌چنین گزارش کردند که استفاده همزمان از گلیسرول ٦ درصد و دی متیل سولفوکساید ۵/۹ درصد اثرات سینرژیسم روی حرکت پیش‌رونده اسپرم منجمد شده داشت (٤۵درصد) در حالی که استفاده جداگانه از گلیسرول و دی متیل سولفوکساید به ترتیب ۳۳ و ۱۵درصد جنبایی پس از یخ‌گشایی اسپرم‌ها را باعث شدند. نتیجه گیری که توسط کاندا و همکاران (۲۰۰۰) صورت گرفت نشان می‌دهد که افزودن گلیسرول باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم نسبت به سایر سرما محافظ‌ها می‌شود. همچنین نشان دادند که استفاده از اسیدهای آمینه همراه با ۰/۸۷ مولار گلیسرول و ۰/۷٦ مول دی متیل سولفوکساید به طور قابل توجهی حرکت پیش‌رونده اسپرم بز را پس از یخ‌گشایی بهبود بخشید (Kundu *et al*., 2000). آموا و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که استفاده از ۵ درصد گلیسرول در رقیق کننده بر پایه‌ی تریس جهت انجماد اسپرم بز عملکرد بهتری نسبت به دوزهای ۳-٤ درصد گلیسرول داشت (Amoah and Gelaye, 1997). در پژوهش حاضر نیز نتایج بدست آمده نشان دادند که استفاده از ۵ درصد گلیسرول در محیط انجمادی اسپرم قوچ باعث بهبود جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشایی شد. اما نکته حایز اهمیت این است که این اثر در حضور ۲ درصد عصاره آنتی اکسیدانی رزماری ایجاد شد در حالیکه سطح ۵ درصد گلیسرول به همراه سطح ٤ درصد عصاره رزماری اثر قابل توجهی نسبت به گروه شاهد نداشت. در ارتباط با این موضوع نجفی و همکاران (۲۰۱۳) نتایج مشابهی را در استفاده از ۵ درصد گلیسرول نسبت به ۷ درصد به همراه برخی از قندها بدست آورند که با نتایج پژوهش حاضر در یک راستا بود (Najafi *et al*., 2013). گلیسرول اضافه شده به رقیق کننده مایع منی موجب تغییر در شکل‌گیری و اندازه بلورهای یخ می‌شود و آب سلول‌ها را گرفته و با

یون‌های فلزی کمپلکس ایجاد می‌نماید و سپس به سرعت وارد اسپرم‌های زنده شده و مورد اکسیداسیون قرار می‌گیرد (Leboeuf *et al*., 2000). اضافه کردن گلیسرول ممکن است به صورت تک مرحله‌ای، دو مرحله‌ای، سه مرحله‌ای و در دماهای ۳۵/۵ تا ۳۷ درجه سلسیوس باشد. غلظت نهایی محافظت کننده‌های انجمادی نفوذپذیر در رقیق کننده‌ها متغیر می‌باشد و از طریق سمیت و یا اثرات سودمندی که بر روی اسپرم دارد، تعیین می‌شود (Batista *et al*., 2009). عده‌ای از محققین اعتقاد دارند که باتوجه به ورود سریع گلیسرول به درون سلول، احتمالا اثر برون‌سلولی نیز می‌تواند داشته باشد. البته بایستی اشاره نمود که زمان تعادل و عادت پذیری اسپرم در رقیق کننده حاوی گلیسرول از یک ساعت تا چند ساعت متفاوت می‌باشد (Leboeuf *et al*., 2000).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که افزودن ۲ درصد حجمی عصاره رزماری به همراه ۵ درصد حجمی گلیسرول باعث بهبود کیفیت اسپرم قوچ پس از فرآیند یخ زدن و یخ گشایی می‌شود.

منابع

Aboagla, E.M.-E., Terada, T., 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. Theriogenology 62, 1160-1172.

Agarwal, A., Sekhon, L.H., 2010. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. Human Fertility 13, 217-225.

Aitken, R.J., Roman, S.D., 2009. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, 154-171.

Amoah, E., Gelaye, S., 1997. Biotechnological advances in goat reproduction. Journal of Animal Science 75, 578-585.

Anel, L., de Paz, P., Alvarez, M., Chamorro, C.A., Boixo, J.C., Manso, A., Gonzalez, M., Kaabi, M., Anel, E., 2003. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. Theriogenology 60, 1293-1308.

Batista, M ,.Nino, T., Alamo, D., Castro, N., Santana, M., Gonzalez, F., Cabrera, F., Gracia, A., 2009. Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. Theriogenology 71, 1307-1315.

Blash, S., Melican, D., Gavin, W., 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. Theriogenology 54, 899-905.

Da Silva, F., Marques, A ,.Chaveiro, A., 2010. Reactive oxygen species: a double-edged sword in reproduction. Open Veterinary Science Journal 4, 127-133.

Daghigh-Kia, H., Olfati-Karaji, R., Hoseinkhani, A., Ashrafi, I., 2014. Effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) extracts and glutathione antioxidants on bull semen quality after cryopreservation. Spanish Journal of Agricultural Research 12, 98-105.

Hinneburg, I., Damien Dorman, H., Hiltunen, R., 2006. Antioxidant activities of extracts from selected

culinary herbs and spices. Food chemistry 97, 122-129.

Holt, W., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science 62, 3-22.

Jerez-Ebensperger, R., Luño ,V., Olaciregui, M., González, N., de Blas, I., Gil, L., 2015. Effect of pasteurized egg yolk and rosemary honey supplementation on quality of cryopreserved ram semen. Small Ruminant Research 130, 153-156.

Kefer, J.C., Agarwal, A., Sabanegh, E., 2009. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. International Journal of Urology 16, 449-457.

Kundu, C., Chakraborty, J., Dutta, P., Bhattacharyya, D., Ghosh, A ,.Majumder, G., 2000. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. Cryobiology 40, 117-125.

Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Animal Reproduction Science 62, 113-141.

Mosenene ,T.M.B., 2009. Characterization and cryopreservation of semen of four south african chicken breeds, University of the Free State Bloemfontein.

Motlagh, M.K., Sharafi, M., Zhandi, M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Soleimani, M., Zeinoaldini, S,. 2014 .Antioxidant effect of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze–thawing process of ram sperm. Cryobiology 69, 217-222.

Najafi, A., Zhandi, M., Towhidi, A., Sharafi, M., Sharif, A.A., Motlagh, M.K., 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, 275-282.

Peng, Y., Yuan, J., Liu, F., Ye, J., 2005. Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 39, 431-437.

Purdy, P., 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research 63, 215-225.
Quinn, P.J., Chow, P.Y., White, I.G .۱۹۸۰ ,.Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. Journal of Reproduction and Fertility 60, 403-407.

Saleh, R.A., Agarwal, A., 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. Journal of andrology 23, 737.

Sebranek, J.G., Sewalt, V.J.H., Robbins, K.L., Houser, T.A., 2005. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. Meat Science 69, 289-296.

Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 579, 200-213.

Thorsen, M.A., Hildebrandt, K.S., 2003. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts: Aspects of accurate quantification. Journal of Chromatography A 995, 119-125.

Tuli, R.K., Singh, M., Matharoo, J., 1981. Effect of different equilibration times and extenders on deep freezing of buffalo semen. Theriogenology 16, 99-104.

Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneh, A., Najafi, A., Nabi, M.M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., 2013. Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Ruminant Research 114, 120-125

Improvement of the Moghani goat sperm quality by adding rosemary extract and glycerol to the extender

Mohammad Hossain Naji[1], Abolghasem Lavvaf[1], Behzad Hemati[2*]

Received Date: 06/09/2017

Accepted Date: 09/11/2019

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of adding different levels of Rosemary extract with two different dose of glycerol on the motility, viability and membrane integrity of Moghani rams semen after freeze-thawing process. Semen was collected from four healthy and mature Moghani rams (3-4 years), twice a week for 3 weeks. Afterward the samples were evaluated and pooled for altering individual effects. After that the pooled semen was divided in to aliquots and extended with the treatments including 3 levels (0, 2 and 6 percent of rosemary extract with 5 or 7 percent of glycerol. then semen equilibrated at 5 ºC for 2 h, and aspirated into 0.25 mL straws. After equilibration, straws were frozen in liquid nitrogen vapor and plunged into liquid nitrogen for storage. Sperm parameters, including motility, viability, membrane integrity, and progressive motility by CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) software were assessed. The results showed that the treatment supplemented with 2 percent of rosemary extract including 5 percent of glycerol could improve total and progressive motility, viability and membrane integrity ($P<0.05$). There were no any significant differences for VCL, VSL, ALH and VAP parameters among the experimental treatments ($P> 0.05$). In conclusion it is proposed that addition of 2 percent of rosemary extract with 5 percent of glycerol could improve the quality of Moghani ram sperms parameters after freeze-thawing process.

Key words: Ram semen, Glycerol, Rosemary extract, freeze-thawing, Sperm motility

1) Department of Animal Science Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran.

2) Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran.

* Corresponding author: bzdhmt@gmail.com