اثرات افزودن رافینوز و ترهالوز بر شاخص‌های کیفیت اسپرم گاومیش بعد از ذوب

خدیجه پیری باغچه‌جکی [۱*]، جمشید قیاسی‌قلعه‌کندی [۱]، رحیم بهشتی [۲]

چکیده

هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر سطوح مختلف رافینوز و ترهالوز بر کیفیت اسپرم گاومیش بعد ازذوب بود. برای این منظور تعداد ۲۰ انزال از چهار راس گاومیش نر در مرکز تحقیقات و پرورش گاومیش شمال غرب کشور جمع‌آوری شد. نمونه‌های منی با کیفیت عالی و داشتن بیش از ۷۰ درصد اسپرماتوزوییید با تحرک رو به جلو در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با رقیق کننده تجاری بایوکسل دارای سطوح مختلف رافینوز و ترهالوز (صفر، ۲۵ و ۷۵ میلی‌مول)، رقیق شد و پس از مرحله تعادل در دمای چهار درجه سلسیوس ظرف مدت چهارساعت، در نی‌های ۰/۵ میلی‌لیتری پلاستیکی با اعمال زمان انجماد مشخص قبل از ورود به ازت مایع، منجمد و داخل کانتینرهای حاوی ازت مایع نگه‌داری شدند. پس از دو هفته، ذوب نمونه نی‌های منجمد مورد نظر در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه صورت گرفت. در این راستا میزان تحرک و برخی فراسنجه‌های کیفی نمونه‌های مورد نظر پس ازذوب با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست صفحه گرم مجهز به سیستم ارزیابی کامپیوتری الگوی تحرک اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان دادند، افزودن مقادیر صفر، ۲۵ و ۷۵ میلی‌مول رافینوز و ترهالوز در رقیق کننده تجاری بایوکسل برای انجماد منی گاومیش سبب بهبود میزان تحرک و برخی فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از ذوب نشد (P>۰/۰۵).

واژگان کلیدی: *اسپرماتوزوییید، گاومیش، رافینوز، ترهالوز.*

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲

مقدمه

منی منجمد به‌طور گسترده در تلقیح مصنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما فرآیندهای انجماد و رفع انجماد موجب ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود که تحرک بعد از ذوب، قابلیت زنده‌مانی، فعالیت آنزیمی درون سلولی، باروری و عملکرد اسپرم را مختل می‌کند (۱۴و ۸، ۷). یکی از مهم‌ترین عوامل موثر در انجماد منی، محتوی و نوع رقیق کننده برای اسپرم قبل از انجماد می‌باشد. رقیق کننده معمولا حاوی یک ماده محافظت کننده از سرما و مواد افزودنی مغذی می‌باشد، که اسپرماتوزوییدها را در حین انجماد و ذوب محافظت می‌نماید (۱۴و ۱۳، ۱۲). قندها با فسفولیپیدها در غشای پلاسمایی تعامل داشته و بقای اسپرم را در زمان انجماد افزایش می‌دهند. رافینوز تری ساکاریدی با وزن مولکولی زیاد و فرمول شیمیایی $C_{18}H_{22}O_{16}.5H_2O$ است که متشکل از گلوکز، فروکتوز و گالاکتوز می‌باشد (۱۴). رافینوز نفوذپذیری کمی در غشای سلولی داشته و نقش حفاظت از یخزدگی دارد و در تعامل با لیپیدها و پروتیین‌های غشای اسپرم، تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی را در طول انجماد کاهش و باعث حفظ فشار اسمزی می‌گردد (۱۴و ۳).

ترهالوز دی‌ساکاریدی متشکل از دو واحد گلوکز و قندهای غیراحیا کننده با فرمول شیمیایی $C_{12}H_{22}O_{11}.2H_2O$ می‌باشد که با غلظت بسیار زیاد در اکثر موجوداتی که امکان مقاومت در برابر دهیدراتاسیون کامل را دارند مانند قارچ‌ها، مخمرها و برخی باکتری‌ها وجود دارد (۲). بررسی بر محتوای ترهالوز مخمرها اثبات کرد که ترهالوز به‌عنوان یک محافظت کننده با کارایی بالا و تقویت کننده مقاومت ترکیبات سلولی از قبیل غشاهای پلاسمایی و پروتئین‌ها عمل می‌کند که این یافته‌ها استفاده از ترهالوز را به‌عنوان یک مـاده محافظ در زمینه‌های متنوعی سبب شده است (۱).

هدف از این تحقیق، بررسی اثرات سطوح مختلف رافینوز و

۱*ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، گروه علوم دامی، شبستر، ایران. khadijehpiri@yahoo.com

۲ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، گروه دامپزشکی، شبستر، ایران.

تره‌هالوز در رقیق‌کننده بایوکسل بر خصوصیات کیفی اسپرم گاومیش بعد از ذوب بود.

مواد و روش کار

این تحقیق در مرکز پرورش و اصلاح نژاد گاومیش شمال‌غرب کشور واقع در استان آذربایجان‌غربی، شهرستان ارومیه با استفاده از چهار راس گاومیش نر با میانگین سنی (٤/٢±٠/٤) از اکوتیپ بومی (آذربایجان) انجام پذیرفت. عمل جمع‌آوری منی با استفاده از مهبل مصنوعی مخصوص گاومیش هفته‌ای دو بار، در ساعات اولیه صبح و طی فصل بهار انجام گرفت. بلافاصله پس از جمع‌آوری کیفیت منی از لحاظ تراکم و تحرک زیر میکروسکوپ صفحه گرم ارزیابی و ثبت شد.

پس از ارزیابی اولیه، نمونه‌های منی اخذ شده با استفاده از رقیق کننده تجاری بایوکسل حاوی مقادیر صفر، ٢٥ و ٧٥ میلی‌مول تره‌هالوز (Sigma-Aldrich, 0167) و رافینوز (Sigma-Aldrich,83400) رقیق گردید و بعد از طی یک ساعت سرد شدن در بن‌ماری ٣٧ درجه سلسیوس و اعمال زمان تعادل به مدت چهار ساعت در دمای چهار درجه سلسیوس، با استفاده از دستگاه بسته‌بندی اتوماتیک در نی‌های ٠/٥ میلی‌لیتری (با احتساب ٢٠×١٠^{٦} اسپرماتوزوییید در هر نی) بسته‌بندی و در ازت مایع منجمد شدند. نی‌های ٠/٥ میلی‌لیتری منی منجمد تهیه شده بعد از دو هفته به تفکیک گروه‌های آزمایشی از کانتینر ازت مایع بیرون آورده شده، در بن‌ماری دارای آب ٣٧ درجه سلسیوس به مدت ٤٠ ثانیه، عمل ذوب بر روی آن‌ها انجام گرفت. برای هر نمونه مورد نظر حداقل پنج نی استفاده شده و فاکتورهای میکروسکوپیک منی شامل میزان درصد تحرک، درصد اسپرماتوزوییدهای با حرکت پیش رونده رو به جلو (P)، و شاخص‌هایی نظیر سرعت خط منحنی (VCL)، سرعت خط مستقیم (VSL)، شاخص جنبش (WOB)، شاخص سیر مستقیم (STR)، شاخص خطی بودن (LIN)، سرعت سیر (VAP)، دامنه جابجایی جانبی سر (ALH) و فرکانس ضربان عرضی (BCF) به تفکیک برای نمونه‌های منی رقیق شده مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت. حداقل ٢٠٠ اسپرماتوزوئید، به‌صورت تصادفی از چهار میدان میکروسکوپی برای مشاهده درصد اسپرماتوزوئیدهای متحرک و درصد اسپرماتوزوئیدهایی با حرکت پیش رونده انتخاب و نتایج آن ثبت شد. داده‌های به‌دست آمده از این تحقیق با استفاده از نرم افزار آماری SAS (مدل ٨/١ ، ٢٠٠١) مدل خطی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی Tukey's Studentized Range (HSD) استفاده شد (١٥).

نتایج

میزان و الگوی تحرک اسپرماتوزوئیدهای منجمد متعاقب ذوب برای گروه کنترل و نیز گروه‌های آزمایشی حاوی مقادیر متفاوت از آنتی آکسیدان‌های تره‌هالوز (صفر، ٢٥ و ٧٥ میلی‌مول) و رافینوز (صفر، ٢٥ و ٧٥ میلی‌مول) و اثر متقابل رافینوز و تره هالوز در زمان‌های صفر و شش ساعت بعد از ذوب به تفکیک در جداول ١ الی ٤ آمده است. بر این اساس افزودن رافینوز و تره‌هالوز با مقادیر صفر، ٢٥ و ٧٥ میلی‌مول و بررسی اثر متقابل سه جانبه باعث کاهش میزان تحرک کلی، درصد اسپرماتوزوئیدهای با حرکت پیش رونده، سرعت خط منحنی، سرعت خط مستقیم، سرعت سیر، شاخص خطی بودن، دامنه جابه‌جایی جانبی سر و شاخص سیر مستقیم گردید ($P<٠/٠٥$). اما تاثیری بر اسپرم‌های پیش رونده با سرعت کم، اسپرم‌های بی‌حرکت، WOB و BCF نداشت [($P<٠/٠٥$) (جداول ١ و ٢)]. نگه‌داری نمونه‌های مورد نظر متعاقب ذوب و انکوباسیون نی‌ها در دمای ٣٧ درجه سلسیوس در داخل بن ماری در طی شش ساعت و ارزیابی دوباره نمونه‌ها نشان دادند، با گذشت زمان میزان و شاخص‌های الگوی حرکتی اسپرماتوزوییید در تمامی گروه‌های آزمایشی و نیز کنترل کاهش یافت [($P<٠/٠٥$) (جداول ٣ و ٤)].

جدول ۱ـ مقایسه میانگین اثرات افزودن سطوح مختلف رافینوز و تره‌هالوز به رقیق کننده بایوکسل بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاومیش بلافاصله پس از رفع انجماد

ترکیبات تیماری			صفات مورد بررسی							
رقیق کننده	رافینوز (Mm)	تره‌هالوز (Mm)	درصد تحرک	اسپرم های پیش رونده P (%)	اسپرم های پیش رونده با سرعت زیاد تیپ A	اسپرم های پیش رونده با سرعت کم تیپ B	اسپرم های بی حرکت تیپ C	اسپرم های بی جان تیپ D	سرعت خط منحنی VCL (Mm/s)	سرعت خط مستقیم VSL (Mm/s)
بایوکسل	۰	۰	۱۲/۱۳^{a}	۱۰/۳۷۶^{a}	۳/۹۶۸^{a}	۶/۴۰۸^{a}	۱/۷۵۶^{b}	۸۷/ ۸۷^{b}	۱۳/۷۳۰^{a}	۳/۶۹۰^{a}
بایوکسل	۲۵	۰	۳/۲۳۴^{c}	۱/۸۵۲ ^{d}	۰/۳۱۸^{b}	۱/۵۳۴^{c}	۱/۳۸۲^{b}	۹۶/۷۶۶^{a}	۱۰/۲۹۶^{b}	۱/۳۶۴^{b}
بایوکسل	۷۵	۰	۱/۹۹^{d}	۰ /۹۲۶^{d}	۰/۳۳۸^{b}	۰/۵۸۸^{c}	۱/۰۶۲^{b}	۹۸/۰۱^{a}	۹/۵۰۸^{c}	۱/۴۹۸^{b}
بایوکسل	۰	۲۵	۱۰/۱۶۸^{a}	۶/۶۲^{b}	۰/۹۹^{b}	۵/۶۲۸^{a}	۳/ ۵۴۸^{a}	۸۹/۸۳۲^{b}	۱۲/۳۴۸^{a}	۲/۲۵۲^{a}
بایوکسل	۲۵	۲۵	۷/۴۴۲^{b}	۵/۰۰۸^{b}	۰/ ۲۳۶^{b}	۴/۷۷۲^{b}	۲/۴۳۸^{a}	۹۲/۵۵۸^{a}	۱۱/۸۳۶^{a}	۱/۸۶۲^{b}
بایوکسل	۷۵	۲۵	۴/۹۴^{c}	۱/۸۵۲^{d}	۰	۱/۸۵۲^{c}	۳/۰۸۶^{a}	۹۵/۰۶۰^{a}	۱۰/۸۱۰^{b}	۱/۰۳۸^{b}
بایوکسل	۰	۷۵	۳/۶۵۸^{c}	۱/۱۸۲^{d}	۰	۱/۱۸۲^{c}	۲/۴۷۶^{a}	۹۶/۳۴۴^{a}	۱۰/۲۴۶^{b}	۱/۳۷۴^{b}
بایوکسل	۲۵	۷۵	۶/۸۷۴^{b}	۳/ ۴۵۴^{c}	۰/۷۲۸^{b}	۲/۷۲۶^{c}	۳/۴۱۸^{a}	۹۳/۱۲۶^{a}	۱۲/۳۲۸^{a}	۱/۸۵۸^{b}
بایوکسل	۷۵	۷۵	۳/۹۴۲^{c}	۱/۵۸۴^{d}	۰/۲۶۴^{b}	۱/۳۲c	۲/ ۳۵۸^{a}	۹۶/۰۵۸^{a}	۱۱/۷۳۲^{a}	۱/۰۵۴^{b}
خطای معیار میانگین (SEM)			۰/۱۷۵	۰/۱۷۷	۰/۱۷۵	۰/۱۷۷	۰/۰۹۸	۰/۱۴۸	۰/۰۳۹	۰/۱۷۵
ارزش P			۰/۰۰۳	۰/۰۰۴	۰/۰۳۷	۰/۱۲۹	۰/۲۷۳	۰/۰۰۳	۰/۰۱۶	۰/۰۰۷

a-b,... در هر ستون، اعدادی که دارای حروف مشابه نیستند، اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

جدول ۲ـ مقایسه میانگین اثرات افزودن سطوح مختلف رافینوز و تره‌هالوز به رقیق کننده بایوکسل بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاومیش بلافاصله پس از رفع انجماد

ترکیبات تیماری			صفات مورد بررسی							
رقیق کننده	رافینوز (Mm)	تره‌هالوز (Mm)	سرعت سیر VAP(Mm/s)	جابه‌جایی زاویه‌دار MAD(D)	دامنه جابه‌جایی سر ALH(Mm/s)	فرکانس ضربان عرضی BCF(HZ)	شاخص خطی بودن LIN(%)	شاخص جنبش WOB(%)	شاخص سیر مستقیم STR(%)
بایوکسل	۰	۰	۵/۹۳۶^{a}	۷/۸۴۲^{b}	۰/۸۷۶^{a}	۱/۷۱۶^{a}	۱۹/۶۸^{a}	۳۷/۳۱۶^{a}	۴۶/۵۳۰^{a}
بایوکسل	۲۵	۰	۳/۱۷۸^{b}	۱۴/۳۲۴^{a}	۰/۷۵۲^{b}	۰/۶۱۶^{b}	۱۱/۶۱۶^{b}	۳۲^{a}	۳۷/۷۲۶^{b}
بایوکسل	۷۵	۰	۳/۰۳۲^{b}	۱۳/۱۵۲^{a}	۰/۷۰۴^{b}	۰/۴۷۸^{c}	۱۴/۲۲۲^{b}	۲۸/۷۰۲^{b}	۴۲/۱۵۲^{a}
بایوکسل	۰	۲۵	۴/۴۳^{a}	۱۳/۱۸۴^{a}	۰/۸۲۴^{a}	۰/۸۶۶^{b}	۱۴/۹۳۸^{b}	۳۱/۶۰۲^{a}	۴۱/۷۴۶^{a}
بایوکسل	۲۵	۲۵	۳/۹۷۸^{b}	۹/۱۴۸^{b}	۰/۸۴۶^{a}	۰/۷۷۴^{b}	۱۴/۷۷۶^{b}	۳۱/۸۴۰^{a}	۴۳/۸۵۲^{a}
بایوکسل	۲۵	۷۵	۳/۱۸۶^{b}	۱۴/۲۴۶^{a}	۰/۷۶۸^{b}	۰/۸۸۲^{b}	۸/۷۸۰^{c}	۲۵/۳۳۸^{b}	۳۵/۸۰۲^{b}
بایوکسل	۷۵	۰	۳/۱۸۸^{b}	۱۳/۵۷۴^{a}	۰/۷۴۸^{b}	۰/۵۳۸^{c}	۱۳/۹۶۰^{b}	۳۰/۵۹۸^{a}	۴۲/۴۱۰^{a}
بایوکسل	۲۵	۷۵	۳/۹۸۲^{b}	۰/۸۲۴^{c}	۰/۸۸۰^{a}	۰/۸۲۴^{b}	۱۳/۳۳۶^{b}	۳۰/۲۴۸^{a}	۴۲/۰۲^{a}
بایوکسل	۷۵	۷۵	۳/۰۹۸^{b}	۰/۷۸۴^{c}	۰/۸۳۲^{a}	۰/۷۸۴^{b}	۷/۵۸۴^{c}	۲۴/۷۸۶^{b}	۳۴/۴۸۴^{b}
خطای معیار میانگین (SEM)			۰/۰۴۷	۰/۱۱	۰/۰۰۲	۰/۰۱۳	۰/۱۸۵	۰/۱۷۹	۰/۲۳۲
ارزش P			۰/۰۰۴	۰/۰۶۰	۰/۰۳۳	۰/۰۶۳	۰/۰۳۶	۰/۰۰۴	۰/۰۶۰

a-b,... در هر ستون، اعدادی که دارای حروف مشابه نیستند، اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

جدول ۳ـ مقایسه میانگین اثرات افزودن سطوح مختلف رافینوز و تره‌هالوز به رقیق کننده بایوکسل بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاومیش شش ساعت پس از رفع انجماد

ترکیبات تیماری			صفات مورد بررسی							
رقیق کننده	رافینوز(Mm)	تره‌هالوز(Mm)	درصد تحرک	اسپرم های پیش رونده‌با سرعت زیاد تیپ A	اسپرم های پیش رونده با سرعت کم تیپ B	اسپرم های بی حرکت تیپ C	اسپرم های بی جان تیپ D	سرعت خط منحنی VCL (Mm/s)	سرعت خط مستقیم VSL (Mm/s)
بایوکسل	۰	۰	a٤/٤٥٦	a۳/۷۳۲	a۱/۱۸۸	b۰/۷۲۰	b۹۵/۵٤٤	a۱۰/٤۷٦	a۱/٤۸۲
بایوکسل	۲۵	۰	c۰/٦۲۲	c۰/۳۲۸	۰	b۰/۲۹٤	a۹۹/۳۷۸	c۸/۸۱۸	b۰/۸٦٤
بایوکسل	۷۵	۰	c۰/٤۵٤	۰	۰	b۰/٤۵٤	a۹۹/۵٤٦	b۹/۱۱۸	b۰/٦۱۲
بایوکسل	۰	۲۵	b۱/۷۲۸	b۱/۰۱٤	۰	b۰/۷۱٤	a۹۸/۲۷۲	b۹/٤٦۲	a۱/۷۹۸
بایوکسل	۲۵	۲۵	b۲/۷۱۸	a۲/۰۱۰	b۰/۱۷٦	b۰/۷۱۰	a۹۷/۲۸۲	a۱۰/۵۸۲	a۱/۲۱۲
بایوکسل	۷۵	۲۵	b۱/۱۷۸	۰	۰	a۱/۱۷۸	a۹۸/۸۲۲	a۱۰/۹۱۲	a۱/۱
بایوکسل	۰	۷۵	c۰/٤۷٦	۰	۰	b۰/٤۷٦	a۹۹/۵۲٤	b۹/۷	b۰/۷۹٦
بایوکسل	۲۵	۷۵	b۱/۱۲۲	c۰/۳۷۰	۰	b۰/۷۵۲	a۹۸/۸۷۸	a۱۰/۱۸٦	a۱/٤٦۰
بایوکسل	۷۵	۷۵	۰	۰	۰	۰	a۱۰۰	c۸/۲۳٦	b۰/۸۷۸
(SEM)خطای معیار میانگین			۰/۰٤٦	۰/۰٤۹	۰/۰۲٦	۰/۰۲۸	۰/۰٤٦	۰/۰۲٤	۰/۰۱٤
ارزش P			۰/۰۰۱	۰	۰	۰/۸٦۹	۰	۰/۰۰۵	۰

a-b,... در هر ستون، اعدادی که دارای حروف مشابه نیستند، اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

جدول ٤ـ مقایسه میانگین اثرات افزودن سطوح مختلف رافینوز و تره‌هالوز به رقیق کننده بایوکسل بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاومیش شش ساعت پس از رفع انجماد

ترکیبات تیماری			صفات مورد بررسی						
رقیق کننده	رافینوز(Mm)	تره‌هالوز(Mm)	سرعت سیر VAP(Mm/s)	جابه‌جایی زاویه‌دار MAD(D)	دامنه جابجایی جانبی سر ALH(Mm/s)	فرکانس ضربان عرضی BCF(HZ)	شاخص خطی بودن LIN(%)	شاخص جنبش WOB(%)	شاخص سیر مستقیم STR(%)
بایوکسل	۰	۰	a۳/۲۹۲	a۱۲/۳٤۸	a۰/۷٤٦	a۱/۰۰٦	b۱۰/٤٦۰	b۲٦/۷۸٤	c۳۳/٦۰۸
بایوکسل	۲۵	۰	b۲/۵۰٦	c۸/۲۷٦	b۰/٦٦٤	b۰/٤٦۲	c۸/۷٤٤	c۲٤/٦٤۸	c۳۲/۲۵٤
بایوکسل	۷۵	۰	b۲/۳۵	c۸/۹۷٦	b۰/٦۹٤	b۰/٦۱٦	c٦/۱۵٤	c۲۲/٤۱۸	d۲۸/۵٦۰
بایوکسل	۰	۲۵	b۲/۵٦	c۸	a۰/۷۰٦	b۰/۵۰٤	cv/۵۹٤	c۲۵/۲۹۰	c۳٤/۱۰٦
بایوکسل	۲۵	۲۵	a۳/۱۵٦	b۱۰/۸۸٤	a۰/۷۷۸	b۰/٦۸۰	c۸/۳۰٦	b۲۵/۹۵٦	c۳۱/۹۷٤
بایوکسل	۷۵	۲۵	b۲/۹٦٦	a۱۲/۷۳٤	a۰/۷۹٤	b۰/۷۱٤	b۱۰/۵۰٤	b۲٦/۲٦۸	b۳۹/۰٤۰
بایوکسل	۰	۷۵	b۲/٦۲۸	b۱۰/٤٤۲	a۰/۷۱٦	b۰/٦۹۸	cv/۹۲٦	c۲٤/۷۱۸	c۳۳/۳۰٤
بایوکسل	۲۵	۷۵	a۳/۱۳٤	b۱۰/٦۳۲	a۰/۷۵٦	b۰/۸۷۲	a۱۵/٤۲۲	a۳۱/۱٤٤	a٤۵/٤۱٦
بایوکسل	۷۵	۷۵	b۲/۲۱۸	d٤/۰۳	b۰/٦۳۲	b۰/۲۲۸	b۱۰/۰۸٦	c۲٤/٦۱۰	b۳۹/۳۱٤
(SEM)خطای معیار میانگین			۰/۰۱۵	۰/۰۷۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰٦	۰/۱۱۳	۰/۱۱٦	۰/۱۸۸
ارزش P			۰	۰/۰۰۵	۰/۰۷۹	۰	۰/۲۲۰	۰/٤۷۳	۰/٦٤۸

a-b,... در هر ستون، اعدادی که دارای حروف مشابه نیستند، اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

بحث

نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر نشان دادند، استفاده از آنتی اکسیدان‌های ترهالوز و رافینوز و اثر متقابل این آنتی اکسیدان‌ها در فرآیند عمل‌آوری و انجماد اسپرم با استفاده از رقیق کننده بایوکسل باعث کاهش میزان تحرک و فراسنجه‌های کیفی مورد مطالعه اسپرم متعاقب ذوب و شش ساعت پس از ذوب شده است. Patra و همکاران (۲۰۰۱) و Livine و همکاران (۱۹۹۹) اثرات آنتی اکسیدانی رافینوز را در اسپرم بز بررسی کردند، رافینوز به وسیله اثر متقابل با لیپیدها و پروتئین‌های غشا پلاسمایی اسپرم سبب کاهش کم آبی سلول طی فرآیند انجماد می‌شود (۱۲و ۱۱). Agca و همکاران (۲۰۰۲) و Storey (۱۹۹۸) دریافتند، رافینوز مانع تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی و حفظ فشار اسمزی می‌شود (۱۶و ۳).

Fiser و همکاران (۱۹۸۹) نشان دادند، مکمل ترهالوز یا رافینوز در رقیق کننده بر پایه تریس ویژگی‌ها و توانایی یخ‌زدگی را در منی گوسفند بهبود می‌بخشد (۹). Aisen و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند، رقیق کننده شامل ترهالوز فعالیت آنتی اکسیدانی اسپرم قوچ را بهبود و استرس‌های اکسیداتیو ایجاد شده در فرآیند انجماد را کاهش می‌دهد (٤). در تحقیق حاضر افزودن مقادیر صفر، ۲۵ و ۷۵ میلی‌مول رافینوز و نیز صفر، ۲۵ و ۷۵ میلی‌مول ترهالوز و اثر متقابل ترهالوز در رافینوز در رقیق کننده بایوکسل در زمان‌های صفر و ٦ ساعت پس از ذوب در گاومیش باعث بهبود عملکرد اسپرم نشد. احتمالا این مغایرت می‌تواند به دلیل سطوح مختلف رافینوز و ترهالوز، نوع رقیق کننده مورد استفاده، نوع دام و زمان‌های متفاوت بررسی پس از ذوب باشد. Bucak و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند، ترهالوز تحرک اسپرم قوچ را پس از ذوب بهبود بخشید (٦). در تحقیق حاضر افزودن مقادیر صفر، ۲۵ و ۷۵ میلی‌مول رافینوز و نیز صفر، ۲۵ و ۷۵ میلی‌مول ترهالوز و اثر متقابل ترهالوز در رافینوز در رقیق کننده بایوکسل در گاومیش در زمان‌های صفر و ٦ ساعت پس از ذوب باعث کاهش درصد تحرک اسپرم شد که نتایج تحقیق محقق فوق با این تحقیق مغایرت دارد. این مغایرت احتمالا به دلیل سطوح مختلف ترهالوز، نوع رقیق کننده مورد استفاده، گونه دام مورد مطالعه و زمان‌های متفاوت ذوب باشد.

در مطالعه‌ای Hu و همکاران (۲۰۰۹) ملاحظه کردند، رقیق کننده حاوی ترهالوز به طور قابل توجهی فعالیت کاتالاز، گلوتاتیون و گلوتاتیون پراکسیداز را در مقایسه با گروه شاهد در منی گاو افزایش داد (۱۰).

Atessahin و همکاران (۲۰۰۸) دریافتند، رقیق کننده حاوی ترهالوز فعالیت کاتالاز، گلوتاتیون و گلوتاتیون پراکسیداز منی بز را افزایش داد (۵). Aboagla و همکاران (۲۰۰۳) به این نتیجه رسیدند، رقیق کننده اسید سیتریک بر پایه تریس به همراه ترهالوز باعث بهبود کیفیت اسپرم بز در فرآیند انجماد شد، به‌علاوه با توجه به سیالیت غشا اثرات حفاظتی ترهالوز در حین انجماد اسپرم بز تایید گردید (۲). در تحقیق حاضر افزودن سطوح مختلف رافینوز و ترهالوز و اثر متقابل ترهالوز در گاومیش در زمان‌های صفر و٦ ساعت پس از ذوب باعث افزایش درصد آسیب‌های وارده به اسپرم و کاهش کیفیت آن در طی فرآیند انجماد- ذوب گردید که با نتایج محققین دیگر متفاوت بود (۷ و ٦، ۵، ۲). به طور کلی تحقیق حاضر نشان داد که افزودن ترکیباتی نظیر ترهالوز و رافینوز به رقیق کننده جدید و تجاری مانند بایوکسل قبل از فرآیند انجماد منی گاومیش، نه تنها تاثیری در بهبود شاخص‌های ارزیابی منی منجمد بعد از یخ‌گشایی نظیر میزان درصد تحرک اسپرماتوزوییدها و برخی فراسنجه‌های کیفی اسپرم نداشت بلکه اثرات منفی معنی‌داری نیز دارد.

فهرست منابع

۱- حامی، ک.، ملا حسینی، م. (۱۳۹۰): تولید ترهالوز توسط مخمرها و جنبه‌های بیوتکنولوژی آن با تاکید بر کاربردهای آن در صنایع غذایی. اولین سمینار ملی امنیت غذایی؛ ۱.

2- Aboagla, E. M., Terada, T. (2003): Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during Freezing. Biol. Reprod. 69: 1245-1250.

3- Agca, Y., Gilmore, J., Byers, M., Woods, E., liu, J., critser, J. K. (2002): Osmotic Characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extender and sugers. Biol. Repord. 67: 1493-1510.

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

5- Atessahin, A., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Kizil, M. (2008): Effect of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. Small Rum. Res. 77: 38-44.

6- Bucak, M. N., Tekin, N. (2007): Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of rams semen. Small.Rum. Res. 73: 103-108.

7- Bansal, A. K., Bilaspuri, G. S. (2011): Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions.Review Article.Veter. Medi. Inter. 7: 1-12.

8- Chen, Y., Foote, R. H., Brockett, C. C. (1993): Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine and blood serum on survival of frozen bull sperm. Cryobiology. 30: 23-31.

9- Fiser, P.S., Fairfull, R. W. (1989): The effect motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. Cryobiology. 26(1): 64-69.

10- Hu, J. H., Li, Q. W., Li, G., Jiang, Z. L., Bu, S. H., Yang, H., Wang, L. Q. (2009): The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. Anim. Repord. Sci. 112: 107-118.

11- Livine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L., Stadtman, E. R. (1999): Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage, Mech. Ageing Dev. 107: 323-332.

12- Patra, R. C., Swarup, D., Dwivedi, S. K. (2001): Antioxidant effect of alphatocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. Toxicology. 162: 81-88.

13- Ranjhan, S. K., Pathak, N. N. (1993): Text book on buffalo production, 3rd, Masjid Rod. Tangpura. NewDehli. 20-25-25.

14- Rasul, Z., Anzar, M., Jalali, S., Ahmad, N. (2003): Effect of buffering system on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 59: 31-41.

15- SAS Institute, (2001). SAS state software: Changes and Enhancement through release 8.2. SAS institute, Inc; Cary, NC.

16- Storey, B. T., Noiles, E. E., Thompson, K. A. (1998): Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. Cryobiology. 37: 46-58.