اثرات افزودن ژل رویال به رقیق‌کننده تریس ـ زرده تخم مرغ بر فراسنجه‌های اسپرم قوچ افشاری پس از نگهداری به صورت مایع

سارا امینی[۱]، رضا معصومی،[۱*] بهنام رستمی[۱]، محمدحسین شهیر[۱]

چکیده

مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثرات محافظتی ژل رویال در رقیق‌کننده تریس بر فراسنجه‌های تحرک، زنده‌مانی، ناهنجاری‌های مورفولوژیک و تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ در طول نگهداری به صورت مایع به مدت ۷ روزانجام گرفت. تعداد ٦٤ نمونه اسپرم از ٤ راس قوچ افشاری با میانگین سن چهار سال با استفاده از واژن مصنوعی جمع‌آوری شد. پس از بررسی اولیه، نمونه‌های منی با هم مخلوط شده و سپس با رقیق‌کننده تریس ـ زرده بدون ژل رویال(شاهد) یا همراه با غلظت‌های مختلف ژل رویال (۵٪، ۳٪، ۱٪)رقیق گردید. تحرک کلی نمونه‌های منی با استفاده از سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (CASA) مورد بررسی قرار گرفت. فراسنجه‌های مورفولوژی و زنده‌مانی با روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین و یکپارچگی غشا با آزمون تورم هیپواسموتیک (HOST) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌های رقیق‌شده به صورت مایع به مدت یک هفته در دمای ٤^{0C} نگهداری شدند. نتایج نشان داد که درصد تحرک کل نمونه‌های منی مایع پس از هفت روز نگهداری در دمای ٤^{0C} در تیمار ۳ درصد (۲/۸٦±۵۱/۲۵) به طور قابل توجهی از دیگر تیمارها بالاتر بود($P<۰/۰۵$). درصد اسپرم‌های دارای غشای سالم در نمونه‌های رقیق‌شده در رقیق‌کننده‌ی حاوی ۳ درصد ژل رویال(۲/۹٦±٤٦/۵۳) به طور معنی‌داری از گروه شاهد بالاتر بود($P<۰/۰۵$). درصد اسپرم‌های زنده درگروه ۳ درصد(۳/۳۷±۵٦/۹٦) و ۱ درصد(۲/۸۳±٥٤/٦٨) ژل رویال به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود ($P<۰/۰۵$). به طور کلی، نتایج آزمایش حاضر نشان داد که افزودن ۳٪ ژل رویال به رقیق کننده تریس موجب بهبود فراسنجه‌های اسپرم قوچ در مدت ذخیره‌سازی به صورت تازه گردید.

واژگان کلیدی: *قوچ، مایع منی ، ژل رویال، اسپرم*

تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۹/۲۲، تاریخ پذیرش ۱۳۹٦/۱۲/۱۹

مقدمه

در سال‌های اخیر، پژوهش‌های متعددی جهت بهبود روش‌های ذخیره‌سازی اسپرم قوچ به صورت مایع (تازه) و یا منجمد انجام گردیده است (۲۹). تلقیح مصنوعی روشی است که امکان استفاده بهینه از قوچ‌های برتر را فراهم می‌کند(۳۰). تلقیح مصنوعی که با استفاده از مایع منی رقیق‌شده تازه، سرد شده و یا منجمد انجام می‌شود، میزان پیشرفت ژنتیکی در پرورش گوسفند را افزایش می‌دهد(۲۳). حساسیت بالای اسپرم قوچ به تنش‌های اعمال شده در زمان عمل‌آوری و ذخیره‌سازی منی از جمله رقیق‌سازی، سرد کردن، انجماد و یخ‌گشایی سبب شده است که تلقیح مصنوعی در گوسفند در مقایسه با گاو توسعه کمتری داشته باشد(۳۰). با توجه به آسیب‌های وارد شده به اسپرم در هنگام انجماد/یخ‌گشایی و در نتیجه، کاهش باروری ناشی از تلقیح مصنوعی اسپرم ذوب شده، استفاده از اسپرم قوچ به صورت سرد و رقیق شده می‌تواند یک جایگزین عملی مناسب برای تلقیح مصنوعی با اسپرم منجمد باشد(۲۱و۱۷). کرابو (۷) نشان داد که باروری اسپرم خوک نگهداری شده در دماهای پایین حدود نصف باروری اسپرم تازه می‌باشد، اگرچه نتایج این مطالعه قابل تعمیم به سایر گونه‌ها نمی‌باشد. رقیق کننده‌های منی حاوی موادی با خواص ویژه هستند که به نگهداری طولانی‌تر اسپرم کمک می‌کنند. این مواد در تامین انرژی مورد نیاز سلول‌های اسپرم، حفاظت اسپرم از آسیب‌های دمایی، کاهش تنش‌های فیزیکی و شیمیایی ناشی از سرد کردن و انجماد/ذوب و در نهایت، ایجاد یک محیط مناسب برای زنده ماندن موقت سلول‌های اسپرم نقش دارند (١٦). به منظور جلوگیری از آسیب اسپرم در طول فرآوری و انجماد از رقیق‌کننده‌های مختلف بر پایه‌ی زرده‌ی تخم مرغ، لسیتین سویا و شیر استفاده می‌شود (۵). همچنین، به منظور کاهش آسیب‌های ناشی از فرایند انجماد، از محافظت‌کننده‌های انجماد در رقیق‌کننده استفاده می‌شود (۲۸).

*۱- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران (rmasoumi@znu.ac.ir)

اضافه کردن آنتی اکسیدان‌های مختلف بـه رقیـق کننـده اسـپرم، یکی از راهبردهای موثر در حفظ باروری اسپرم، پس از انجمـاد است (۲۲،۵). اثرات مثبت اسـتفاده از ترکیبـات آنتـی اکسـیدانی نظیـر بـوتیلات هیدروکسـی تولـوئن، ویتـامین E، سیسـتئین، تائورین، گلوتاتیون احیا شده و سوپراکسید دیسموتاز و بسـیاری از مواد آنتی اکسیدانی دیگر در مطالعـات پیشـین گـزارش شـده است (۲۸). تنش اکسیداتیو و تولیـد رادیکـال‌هـای آزاد در طـی مراحل سرد کردن و ذخیره‌سازی اسپرم اجتنـاب ناپـذیر بـوده و بنابراین، افزودن آنتی اکسیدان در رقیق‌کننده‌هـای اسـپرم توصـیه شده است (۲۲). ژل رویال به علت ویژگی‌های زیستی سـودمند اجزای تشکیل دهنده آن بـه عنـوان یـک آنتی‌اکسـیدان در نظـر گرفته می‌شود (۳۲و۲). ژل رویال یـک ترکیـب غلـیظ و شـیری رنگ است که توسط زنبوران عسل کارگر جوان ترشـح شـده و برای تغذیه لاروها مـورد اسـتفاده قـرار مـی‌گیـرد(۱۵). از نظـر شیمیایی، ژل رویال تازه شامل آب (۷۰–۵۰ درصد)، پروتئین‌هـا (۹–۱۸ درصد)، کربوهیدرات‌ها (۱۸–۷ درصد)، چربی‌هـا (۸–۳ درصد)، نمک‌های معدنی (حدود ۱/۵ ٪) و مقدار کمی پلی‌فنول و ویتامین‌ها اسـت. محصـول لیـوفیلیزه، شـامل حـدود۵ ٪ آب، ۲۷–۴۱ درصد پروتئین، ۳۱–۲۲ کربوهیـدرات و ۳۰–۱۵ درصـد چربی است (۲۷،۳). آنالیز ترکیبات شیمیایی نشان مـی‌دهـد کـه ژل رویـال شـامل تعـداد زیـادی مـواد فعـال ماننـد 10-HDA، پروتئین آنتی‌باکتریال، یک فـاکتور تحریـک کننـده رشـد و نمـو اندام‌های دستگاه تناسلی در موش‌های نـر و پـروتئین 350KDa که تحریـک‌کننـده تکثیـر مونوسـیت‌هـای انسـانی اسـت، مـی-باشد.ثابت شده که ژل رویال دارای چندین فعالیـت دارویـی در حیوانات آزمایشگاهی از جمله فعالیت اتساع عروق و کاهنـده‌ی فشار خون، افزایش نرخ رشد، اثرضـد باکتریـایی، فعالیـت ضـد تومـوری، اثـرات کاهنـده کلسـترول و فعالیـت ضـد التهـابی است(۲۸).

ژل رویال به عنوان ماده‌ای جهت بهبود باروری در بلدرچین‌هـا، خرگوش‌ها، و انسـان اسـتفاده شـده اسـت (۱٤). ژل رویـال از طریق افزایش کیفیت اووسیت‌ها و اسپرم، باروری را در زنـان و مردان بهبود می‌بخشد (۲۵). مصرف ژل رویال در موارد نـاتوانی جنسی و پیر شدن در انسان توصیه شـده اسـت(۱۱). برخـی از پژوهشگران از ژل رویال جهت بلوغ اووسـیت گـاو در شـرایط آزمایشـگاهی اسـتفاده کـرده‌انـد(۱۹) و ایـن مـاده را بـه عنـوان جایگزینی برای سرم گوساله به عنوان منبعیجهت بلوغ اووسـیت پیشنهاد داده‌اند(۲٤). مـرادی و همکـاران (۲۳) نشـان دادنـد کـه افزودن ژل رویال به رقیق کننده اسپرم در غلظت‌های پایین (نـیم و یک درصد) تحرک و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم قوچ را در طول ذخیره‌سازی و سرد کردن مایع بهبود می‌بخشد. اخیرا نشان داده شده است کـه افـزودن ۰/۵ و ۰/۷۵ ٪ ژل رویـال بـه رقیق کننده بر پایه لستین سـویا موجـب افـزایش نـرخ تحـرک، بهبود تمامیت DNA و بهبود یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم بز پس از انجماد و انکوباسیون در دمای 37^{0C} گردید (۱). علاوه بر این، افزودن ۱ ٪ ژل رویال به رقیق کننـده اسـپرم گـاو مـیش موجب بهبـود صـفات کیفـی اسـپرم از قبیـل زنـده‌مانی، بهبـود یکپارچگی غشای پلاسمایی و غشای اکـروزم پـس از انجمـاد–یخگشایی گردید (۳۲). هدفاز پژوهش حاضـر، بررسـی اثـرات افزودن ژل رویال به رقیق‌کننده بر خصوصیات اسپرم قـوچ پـس از نگهداری به صورت مایع بود.

مواد و روش کار

۱- حیوانات و جمع‌آوری منی

این مطالعـه در طـی فصـول پـاییز و زمسـتان ۱۳۹٤ در مزرعـه تحقیقاتی و آزمایشگاه انجماد اسپرم گروه علوم دامـی دانشـکده کشاورزی دانشگاه زنجان انجـام گرفـت. نمونـه‌هـای منـی از ٤ راس قوچ افشاری بالغ و سالم (٤ ساله) به مدت هشت هفتـه و هفته‌ای دو بارجمع‌آوری گردید. جیره غذایی یکسان بـر اسـاس توصیه‌های NRC(۲۰۰۱) و دسترسی آزاد به آب و آجر معـدنی در تمام طول دوره آزمایش برای تمام حیوانـات فـراهم گردیـد. قبل از جمع‌آوری منی، پوست آلت تناسلی هر قوچ تمیز شـد و نمونه منی با استفاده از واژن مصنوعی جمـع‌آوری شـد و بـرای جلوگیری از اختلاف‌های فردی، نمونه‌های منی با هـم مخلـوط

شدند. تنها نمونه‌هایی با بیش از ۷۰ ٪ تحرک برای فرآوری بیشتر انتخاب شدند. در مجموع، ١٦ آزمایش مستقل برای این مطالعه انجام شد.

۲- تهیه رقیق‌کننده‌ها و بررسی شاخص‌های منی

رقیق‌کننده بر اساس ترکیب تریس (٣/٦٣٤ گرم)، اسید سیتریک (۱/۹۹گرم)، فروکتوز (۰/۵گرم)، آب مقطر (۱۰۰میلی‌لیتر)، زرده تخم‌مرغ (۱۵٪) و گلیسرول (۵٪) برای رقیق‌سازی مایع منی تهیه گردید (همه‌ی اجزای شیمیایی رقیق‌کننده از شرکت Merck آلمان تهیه شدند). هر نمونه منی پیش از هر مطالعه‌ی آزمایشگاهی، از نظر رنگ، حجم، pH، غلظت و تحرک مورد ارزیابی قرار گرفت و پس از آن به چهار مقدار مساوی تقسیم گردید و با یک رقیق‌کننده پایه حاوی غلظت‌های مختلف (۰، ۱، ۳و۵ ٪) ژل رویال (Biosource, Australia®) با نسبت ۱:۲۰رقیق شدند. نمونه‌های رقیق شده به صورت مایع در دمای ٤^{0C} به مدت ۷ روز (١٦٨ساعت) نگهداری شدند. فراسنجه‌های کمی و کیفی اسپرم پیش از سرد شدن (انکوباسیون در دمای ٣٧^{0C} به مدت یک ساعت) و همچنین پس از نگهداری در دمای ٤^{0C} به مدت یک هفته، اندازه‌گیری شدند.

۲-۱- اندازه‌گیری تحرک اسپرم

تحرک کلی نمونه‌های منی با استفاده از سیستم آنالیز کامپیوتری منی (CASA) شرکت هوشمند فن آور مورد بررسی قرار گرفت. این نرم‌افزار جهت استفاده در انسان، موش، گاو و گوسفند قابل برنامه‌ریزی بوده و پیش از انجام آزمایش با استفاده از تنظیمات نرم افزار، جهت اندازه‌گیری فراسنجه‌های حرکتی اسپرم قوچ، تنظیم گردید.برای این کار، ۱۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده مربوط به هر تیمار برروی لام مخصوص اسپرم (٣٧^{0C}) قرار داده شد و برروی آن یک لامل گرم قرار گرفت. حرکت اسپرم در ٣٧^{0C} با استفاده از یک میکروسکوپ فاز کنتراست (بزرگ‌نمایی۱۰×) مورد بررسی قرار گرفت. برای هر نمونه دست کم پنج میدان در هر قطره آنالیز شد.

۲-۲- اندازه‌گیری درصد زنده‌مانی

زنده‌مانی اسپرم در نمونه‌ها به وسیله روش رنگ‌آمیزی ائوزین ـ نیگروزین تعیین شد. این رنگ با ۰/٦٧ گرم ائوزین، ۱۰ گرم نیگروزین، ۰/۹ گرم کلروسدیم حل شده در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه شد.برای رنگ‌آمیزی، ۱۰ میکرو لیتر از نمونه رقیق شده با ۱۰ میکرو لیتر از رنگ برروی یک لام قرار داده شده و سپس گسترش تهیه شد. درصد زنده‌مانی به وسیله شمارش ۲۰۰ سلول در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست (بزرگ‌نمایی ٤٠×) ارزیابی شد. در این روش رنگ‌آمیزی، سلول‌هایی که رنگ ارغوانی را به صورت جزئی یا کامل جذب نمایند، به عنوان سلول مرده و سایر سلول‌ها به عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شد.

۲-۳- ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم با استفاده از آزمون هیپواسموتیک

یکپارچگی غشای اسپرم با استفاده از آزمون هیپواسموتیک (HOST) مورد بررسی قرار گرفت. محلول هیپواسمتیک ازحلنمودن ۱/۳۷۵ گرم دی ـ فروکتوز و ۰/۷۵ گرم سیترات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر تهیه گردید. ابتدا ۱۰ میکرولیتر منی رقیق شده به ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک در لوله‌های آزمایش اضافه شده و در ٣٧^{0C} به مدت ٤٥ دقیقه انکوبه شدند. ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط بر روی یک لام قرار داده شده و با یک لام دیگر پخش شد و پس از خشک شدن، با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ٤٠× تعداد ۲۰۰ اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های اسپرم با تورم یا دم حلقه شده به عنوان اسپرم با غشای عملکردی در نظر گرفته شدند (٦).

۳- تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت اندازه‌گیری‌های تکرار شده انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ تحلیل شده و میانگین تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه گردید.

نتایج

حجم (میلی‌لیتر)، غلظت (اسپرم در هر میلی‌لیتر) و تحرک موجی (۱ تا ۵) در نمونه‌های منی قوچ‌ها، در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱ـ صفات کمی و کیفی نمونه‌ها قبل از مخلوط‌کردن و رقیق‌سازی

فراسنجه	میانگین(M)	خطای استاندارد(SE)
حجم(ml)	۱/۰۹	۰/۰۶۹
غلظت($\times 10^9$)	۳/۰۳	۰/۱۸۳
حرکت موجی(۵-۱)	٤/۵۲	۰/۱٤۵

۱- نتایج منی تازه

همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، درصد تحرک اسپرم قبل از سرد شدن، در نمونه‌های رقیق شده با نسبت‌های مختلف ژل رویال و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (P>۰/۰۵) همچنین درصد اسپرم دارای غشای سالم و اسپرم زنده در گروه‌های مختلف آزمایشی در نمونه‌های منی تازه تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (P>۰/۰۵)، اما مقدار آنها در گروه سه درصد ژل رویال از بقیه گروه‌ها بالاتر بود. در گروه سه درصد ژل رویال، کمترین درصد اسپرم ناهنجار (۱۰/۰±۹۳/۱۹) نسبت به گروه‌های دیگر مشاهده شد (جدول۲).

جدول۲ـ اثرات افزودن نسبت‌های مختلف ژل رویال در رقیق کننده بر فراسنجه‌های اسپرم پیش از سرد شدن

	تیمارها (درصد ژل رویال)			
فراسنجه‌ها	۰٪ (شاهد)	۱٪	۳٪	۵٪
تحرک کل(٪)	۸۰/۳۱±۱/٤۰	۷۸/۰٦±۱/۲۳	۷۹/۳۱±۱/۵۲	۷۸/۱±۹۳/۲٤
یکپارچگی غشا(٪)	٦۰/۳۷±۳/۵٦	٦۱/۳۱±۳/٦۸	۷٤/٤۰±۲/۹۱	٦۰/۳±٦۵/۵۵
زنده مانی(٪)	۸۱/۹۳±۱/۲۹	۸۰/۷۱±۱/٤۰	۸۲/٤۰±۱/۵٦	۷۹/۱±۷۵/۷۷
ناهنجاری اسپرم(٪)	۱۱/۰±۰۹/۲۷^{ab}	۱۱/۰±۰۹/۲۵^{ab}	۱۰/۰±۹۳/۱۹^{b}	۱۱/۰±۳۱/٤٦^{a}

^{a,b} حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح (P>۰/۰۵) می‌باشد.

۲- نتایج منی مایع سرد شده پس از هفت روز

نتایج حاصل از نگهداری منی به صورت مایع در ٤^{0C} به مدت ۷ روز و گرم کردن آن در ۳۷^{0C} به مدت ۱۰ دقیقه، نشان داد که تیمار حاوی ۳٪ ژل رویال به طور معنی‌داری تحرک اسپرم را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، درصدهای ۱ و ۳٪ ژل رویال در رقیق کننده باعث اختلاف معنی‌داری در درصد زنده مانی اسپرم گردید. ژل رویال هیچ تاثیر معنی‌داری بر درصد اسپرم با ناهنجاری مورفولوژیک نداشت. نتایج نشان داد که پس از ۷

جدول ۳ـ اثرات افزودن نسبت‌های مختلف ژل رویال در رقیق کننده بر فراسنجه‌های اسپرم پس از سرد شدن

	تیمارها (درصد ژل رویال)			
فراسنجه‌ها	۰٪ (شاهد)	۱٪	۳٪	۵٪
تحرک کل(٪)	۳۸/۱±۷۵/۷۳^{bc}	٤۷/۲±۱۲/۲٦^{ab}	۵۱/۲±۲۵/۸٦^{a}	۳٦/۱±۰٦/۷٤^{c}
یکپارچگی غشا(٪)	۳٤/۱±۸۷/۷۳^{bc}	٤۰/۲±٤٦/۲٤^{ab}	٤٦/۲±۵۳/۹٦^{a}	۳۰/۲±۲۱/۱۰^{c}
زنده‌مانی(٪)	٤۷/۲±۵۳/۵۷^{b}	۵٤/۲±٦۸/۸۳^{a}	۵٦/۳±۹٦/۳۷^{a}	٤۳/۲±٦۸/٦۹^{b}
ناهنجاری اسپرم(٪)	۱۳/۸۱±۰/۲۵	۱۳/۹۰±۰/۳۷	۱۳/۷۸±۰/۱۷	۱۳/۰±۵٦/۲۹

^{a,b,c} حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌داری در سطح(P>۰/۰۵)می‌باشد.

روز نگهداری اسپرم به صورت مایع، ژل رویال می‌تواند غشای پلاسمایی را از آسیب‌های ذخیره‌سازی به‌صورت مایع محافظت کند. بالاترین اثر حفاظتی ژل رویال در غلظت ۳٪ مشاهده شد که به طور معنی‌داری از گروه شاهد بالاتر بود(جدول ۳).

بحث

تنوع مشاهده شده در صفات کمی و کیفی اسپرم قوچ می‌تواند بازتاب اثرات طیف گسترده‌ای از عوامل فیزیولوژیکی، ژنتیکی، محیطی و تغذیه‌ای باشد که ممکن است بر تولید اسپرم اثر بگذارند. فصل، سن، نژاد قوچ، تکرار و فاصله‌ی بین انزال‌ها، محیط (طول روز، دما و رطوبت) و مدیریت از عوامل موثر بر خصوصیات منی می‌باشد (۳۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن ژل رویال اثرات محافظتی بر آسیب‌های ناشی از ذخیره‌سازی منی به صورت مایع دارد. نتایج آزمایش نشان داد که فراسنجه‌های عملکردی اسپرم در گروه ۳٪ ژل رویال، به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد بالاتر بودند. جالب توجه است که در مطالعه حاضر، ۷ روز پس از نگهداری منی مکمل شده با ۳٪ ژل رویال به صورت مایع در دمای 4^{0C}، عملکرد غشا، تحرک و زنده‌مانی نیمی ازسلول‌های اسپرم حفظ گردید. ممکن است که این اثر ژل رویال به دلیل وجود ترکیبات ویژه در آن بویژه سطوح بالای اسید پانتوتنیک و اسید دسنوئیک باشد که سلول‌های اسپرم را در مقابل تنش اکسیداتیو که در طول نگهداری به صورت مایع یا انجماد ـ یخ‌گشایی ایجاد می‌شوند، محافظت نماید (۱۳). همچنین افزایش در میانگین درصد خصوصیات حیاتی اسپرم را می‌توان به وجود ژل رویال در رقیق‌کننده تریس به عنوان یک منبع پروتئینی غنی از اسیدهای آمینه‌یی همچون اسید آسپارتیک نسبت داد (۱۲). پیشنهاد شده است که ژل رویال ممکن است تحرک اسپرم را از طریق ظرفیت‌پذیری جزئی سلول‌های اسپرم به عنوان ترکیبی که حاوی مقادیر بسیار بالایی از یون کلسیم است، افزایش دهد (۱۸). علاوه بر این، این اثرات می‌تواند بدلیل وجود مقادیر قابل توجهی از ویتامین E،C و آرژنین در ژل رویال باشد. ویتامین E و C جز ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که موجب خنثی شدن رادیکال‌های آزادی می‌شوند که موجب آسیب به غشاهای سلولی می‌گردند(۹و۱). اثرات آنتی اکسیدانی ژل رویال در مطالعات گوناگون قبلی مانند صدمات ناشی از سیس‌پلاتین در بیضه‌ها و توانایی پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد مثل آنیون سوپراکسید مشخص شده است (۳۱و۲۰).

مرادی و همکاران (۲۳) اثرات افزودن سطوح مختلف ژل رویال (۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰) به رقیق کننده تریس را بر فراسنجه‌های کمی و کیفی اسپرم سرد شده قوچ قزل تا ۵ روز پس از نگهداری بررسی نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن ۱٪ ژل رویال به رقیق کننده تریس موجب محافظت اسپرم در طول زمان ذخیره‌سازی ۵ روزه گردید. در مقایسه با این آزمایش، نتایج مطالعه ما نشان داد که افزایش سطح ژل رویال تا ۳٪ می‌تواند موجب افزایش تحرک، زنده‌مانی و حفظ یکپارچگی غشا سلول‌های اسپرم پس از نگهداری به مدت یک هفته شود.با در نظر گرفتن ترکیب شیمیایی ویژه ژل رویال و کارکرد پروتئین‌های آن از یک طرف و اثرات آنتی اکسیدانی قابل توجه آن از طرف دیگر، ممکن است اثرات محافظتی ژل رویال بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم را توجیه نمود.

آسیب ماتریکس لیپیدی غشا موجب از دست رفتن یکپارچگی غشا، تخریب غشا، کاهش تحرک، از دست رفتن باروری و تخریب DNA از طریق تنش اکسیداتیو می‌گردد (۳٤). گزارش شده است که ژل رویال ممکن است یکپارچگی غشا رابه عنوان ترکیبی حاوی ترکیباتی که موجب کاهش رادیکال‌های اکسیداتیو و در نتیجه کاهش تعداد مولکول‌های مورد نیاز برای پاکسازی به وسیله‌ی آنزیم سوپراکسیددیسموتاز که به طور طبیعی در پلاسمای منی برای خنثی کردن اثرات گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) بر پراکسیداسیون لیپید و جلوگیری از آسیب اسپرم وجود دارد، محافظت نماید (۳۲و۱۰). علاوه بر این، اثر حفاظتی ژل رویال ممکن است به ترکیبات شیمیایی آن به ویژه اسیدهای آمینه‌ی ضروری و اسید۱۰- هیدروکسی-۲- دسنوئیک، که نقش مهمی را در یکپارچگی غشای سلولی بازی می‌کنند، نسبت داده شود(۳۳).

علیرغم اثرات سودمند ژل رویان در سطوح ۱ تا ۳ درصد در مطالعات پیشین و مطالعه حاضر بر فراسنجه‌های زنده‌مانی، تحرک و کارکرد غشا سلول‌های اسپرم، افزودن سطوح بالای این ماده (۵٪) در مطالعه حاضر نه تنها قادر به حفظ یا بهبود فراسنجه‌های کمی و کیفی اسپرم نگردید، بلکه موجب کاهش برخی از آنها شد. شواهدی که نشان می‌دهند مواد طبیعی با اثرات آنتی‌اکسیدانی به عنوان یک شمشیر دولبه عمل می‌کنند در حال افزایش است: به این معنی که غلظت بالای آنتی اکسیدان‌های خارجی ممکن است تعادل اکسایش ـ کاهش را مختل کنند. اعتقاد بر این است که غلظت‌های بالاتر آنتی اکسیدان خارجی با فعال کردن مسیرهایی مانند افزایش تولید واسطه‌های التهابی، نیتریل‌دار کردن پروتئین‌ها، اثر گلیکاسیون و مختل‌کننده فعالیت سیستم درون‌ریز مانند یک پرواکسیدان عمل می‌کند (٤). درصد اسپرم‌های ناهنجار در گروه‌های مختلف، پس از سردسازی و نگهداری به مدت ۷ روز تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.به نظر می‌رسد که ترکیبات آنتی اکسیدانی ژل رویال از قبیل ویتامین C و E مانع از آسیب‌های اکسداتیو از یک طرف و حفظ فراسنجه‌های کیفی اسپرم از طرف دیگر شده است. درصد اسپرم‌های ناهنجار پس از انکوباسیون در دمای 37^{0C} به مدت یک ساعت در گروه ۳٪ ژل رویال کمتر از گروه ۵ ٪ ژل رویال بود. همانگونه که قبلا نیز اشاره گردید سطوح بالای ژل رویال می‌تواند به عنوان شمشیر دولبه عمل کرده و موجب تشکیل مواد پیش–اکسیدان شده و موجب آسیب‌های غشای پلاسمایی سلول‌های اسپرم گردد. انکوباسیون در دمای 37^{0C} نرخ متابولیکی اسپرم را افزایش داده و موجب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود. به نظر می‌رسد که سطح ۳٪ ژل رویال در رقیق کننده تعادل بهتری از ویتامین‌های آنتی اکسیدانی در محیط اسپرم ایجاد کرده و از آن در مقابل تنش‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند. نمونه‌های منی کمتر از پنج درصد اسپرم ناهنجار دارند در حالی که در برخی نمونه‌ها همه اسپرم‌ها ناهنجار هستند.

باروری تا زمانی که میزان اسپرم‌های ناهنجار به بیش از ۲۵ ٪ افزایش نیابد، دچار کاهش نمی‌شود(۸).

در مطالعه دیگری، اثرات سطوح پایین ژل رویال (۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵ درصد) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز پس از انجماد و انکوباسیون به مدت ٦ ساعت پس از یخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت (۱). نتایج این مطالعه نشان داد که سطوح ۰/۷۵ و ۰/۵ درصد ژل رویال موجب بهبود و افزایش فراسنجه‌های کیفی اسپرم از قبیل تحرک، تمامیت غشا پلاسمایی و غشای آکروزوم در مقایسه با سطح ۰/۲۵٪ و گروه شاهد گردید. سطوح استفاده شده ژل رویال در این آزمایش کمتر از مقادیر مطالعه ما می‌باشد. با این وجود و با در نظر گرفتن انجماد اسپرم در مطالعه آلکی و همکاران (۱)، اثرات محافظتی ژل رویال در سطوح پایین به خوبی نشان داده شده است. اگرچه خاطر نشان می‌شود که هدف از مطالعه ما برخلاف مطالعه آلکی و همکاران (۱) نگهداری اسپرم سرد شده به مدت طولانی در دمای 4^{0C} بود. علاوه بر این، در مطالعه شهزاد و همکاران (۲۰۱٦) اثرات سطوح پایین ژل رویال (۰/٤، ۰/۳، ۰/۲، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاو میش پس از انجماد و یخگشایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اضافه نمودن سطوح ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد در مقایسه با سطح ۰/٤٪ و گروه شاهد موجب بهبود تحرک اسپرم گردید درحالی که سطح ۰/۱٪ ژل رویال موجب بهبود زنده‌مانی، تمامیت غشای پلاسمایی و غشای اکروزوم در مقایسه با سایر گروه‌ها گردید (۳۲).

اگرچه اختلافات جزیی در نتایج مطالعات مختلف در خصوص بهترین سطح افزودن ژل رویال به رقیق کننده دیده می‌شود. این اختلافات می‌تواند به دلیل طول مدت و دمای نگهداری اسپرم (سرد شده یا منجمد)، کیفیت متفاوت ژل رویال استفاده شده در آزمایش‌های مختلف، تفاوت اسپرم نژادهای مختلف گوسفند (گرمسیری و سرد سیری) در برابر تنش سرمایی، کیفیت متفاوت مواد موجود در رقیق کننده

بخصوص زرده تخم مرغ و اثرات متقابل آنها با ژل رویال و تفاوت در عملکرد سیستم‌های ارزیابی اسپرم باشد.

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر اثر محافظتی ژل رویال بر تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم قوچ در فرآیند ذخیره به صورت مایع را نشان داد. فراسنجه‌های عملکردی اسپرم در تیمار تریس ـ ۳٪ ژل رویال در طول نگهداری به صورت مایع بهتر بود. در نتیجه، سطح ۳٪ ژل رویال به عنوان سطح بهینه جهت حفظ اسپرم در برابر آسیب‌های ناشی از نگهداری طولانی مدت به صورت مایع پیشنهاد می‌شود.

فهرست منابع

1. Alcay, S., Toker, M.B., Onder, N.T. Gokce, E.(2017). Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa. Cryobiology. 74, 81-85.
2. Amirshahi, T., Najafi, G., Nejati, V. (2014): Protective effect of royal jelly on fertility and biochemical parameters in bleomycin-induced male rats. Iranian J. of ReprodMed.12(3): 209.
3. Bogdanov, S. (2011). Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review. Lipids, 3(8), 8-19.
4. Bouayed, J., Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants–double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. Oxid. Med. Cell. Longevity 3(4): 228–237.
5. Bucak, M.N., Tekin, N. (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. Small Rumin. Res. 73: 103-108.
6. Correa, L.M., Thomas, A., Meyers, S.A. (2007). The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to motility and morphology defects. Biol. Reprod. 77: 942–953.
7. Crabo, B.G. (1990). Preservation of boar semen: a worldwide perspective. Reprod. Dom. Anim. Suppl, 1: 3-9.
8. Dhurvey, M., Gupta, V.K., Nema, S.P., Patidar, A., Shivhare, M., Singh, N., Shakya, V. (2012). Modern semen evaluation techniques in domestic animals: A review. Double Helix Res. 3: 2278-8301.
9. Ebisch, I.M., Pierik, F.H., Jong, F.H., Thomas, C.M., Steeger, R.P. (2006). Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men? Intern. J. Androl. 29: 339–345.
10. Gancarczyk M, Kuklinska M, Sadowska J, Strzezek J, Bilinska B. (2006). Aromatization and antioxidant capacity in the testis of seasonally breeding bank voles: effects of LH, PRL and IGF–I. Theriogenology 65: 1376–1391.
11. Hadad-Kaveh, S. (1987). Winged pharmaceutist. Tehran EnghelabIslami Press, 152p.(Translated in Persian).
12. Hanes, J., Simuth, J. (1992). Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honeybee. J. Apicult Res. 31: 22-26.
13. Hove, S.R., Dimick, P.S., Benton, A.W. (1985). Composition of freshly harvested and commercial royal jelly. J Apic. Res. 24: 52–61.
14. Husein, M.Q., Haddad, S.G. (2006). A new approache in sheep using royal jelly in comparison with equine chorionic gonadotropin.Anim. Reprod. Sci. 93: 24-33.
15. Isidorova, V.A., Czyzewskaa, U., Isidorovab, A.G., Bakier, S. (2009). Gas chromatographic and mass spectrometric characterization of the organic acids extracted from some preparations containing lyophilized royal jelly. J. of Chromatogr. 877: 3776-3780.
16. Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Tibary, A.,Pelzer, K. (2011). Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4° C. Small Rumin. Res, 99(2): 208-213.
17. King, M.E., Mckelvey, W.A. C., Dingwall, W.S., Matthews, K.P., Gebbie, F.E., Mylne,

frozen-thawed semen with or without oxytocin administration. Theriogenology. 62: 1236-1244.

18. Kodai, T., Umebayashi, K., Nakatani, T., Ishiyama, K., Noda, N. (2007). Compositions of royal jelly II.Organic acid glycosides and sterols of the royal jelly of honeybees, Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 55: 1528-1531.
19. Kuran, M.E., Sirin, E.S., Onal, A.G. (2005). Effect of honyebee royal jelly on the nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. Proceeding of the 56 Annual Meeting of the European Association for Animal production, Uppsala, Sweden. 387.
20. Manas, G.E., Najafi, G. (2017). Protective effects of royal jelly on the histomorphologic, oxidative stress and sperm parameters in Ofloxacin treated rat. Comp. Clin. Pathology.1-5.
21. Maxwell, W.M.C., Watson, P.F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 42, 55–65.
22. Michael, A.J., Alexopoulos, C., Pontiki, E.A., Hadjipavlou-Litina, D.J., Saratsis, P., Ververidis, H.N., Boscos, C.M. (2009). Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 112: 119-135.
23. Moradi, A.R., Malekinejad, H., Farrokhi-ardabili, F., Bernousi, I. (2013). Royal Jelly improves the sperm parameters of ram semen during liquid storage and serves as an antioxidant source. Small Rumin. Res. 113: 346-352.
24. Onal, A.G., Kuran, M., Tapki, I., Sirin, E., Gorgulu, O. (2005). Honeybee royal jelly an alternative source to serum for in vitro maturation of ovine Oocyte. Proceeding of the 56 Annual Meeting of the European Association for Animal production, Uppsala, Sweden. 283.
25. Pavel, C.I., Mărghitaş, L.A., Bobiş, O., Dezmirean, D.S., Şapcaliu, A., Radoi, I., Mădaş, M.N. (2011). Biological activities of royal jelly-review. Sci. P. Anim. Sci. Biotech. 44(2):108-118.

M.J.A., Stewart, E., Robinson. J.J. (2004). Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of

26. Perumal, P., Selvaraju, S., Selvakumar, S., Barik, A.K., Mohanty, D.N., Das, S., Das, R.K. and Mishra, P.C. (2011). Effect of pre freeze addition of cysteine hydrochloride and reduced glutathione in semen of crossbred jersey bulls on sperm parameters and conception rates. Reprod. Domest. Anim. 46: 636-641.
27. Purdy P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. Small Rumin. Res. 63: 215–225.
28. Ramadan, M.F., Al-Ghamdi, A. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly-A Review. J. Funct. Foods. 4: 39-52.
29. Salamon, S. and Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 62: 77-111.
30. Senger, P.L. (2003). Pathways of pregnancy and parturition.2nd ed. Cadmus Professional Communication. 365.
31. Silici, S., Ekmekcioglu, O., Eraslan, G., Demirtas, A. (2009). Antioxidative effect of royal jelly in cisplatin-induced testes damage. Urology. 74(3): 545-51.
32. Shahzad, Q., Mehmood, M.U., Khan, H., Husna, A., Qadeer, S., Azam, A., Naseer, Z., Ahmad, E., Safdar, M., Ahmad, M.(2016). Royal jelly supplementation in semen extender enhances post-thaw quality and fertility of Nili-Ravi buffalo bull sperm. Anim. Reprod. Sci. 167: 83-88.
33. Tamura, S., Kono, T., Harada, C., Yamaguchi, K., Moriyama, T. (2009). Estimation and characterisation of major royal jelly proteins obtained from the honeybee Apismerifera. Food Chem. 114: 1491–1497.
34. Tuncer, P.B., Sarıözkan, S., Bucak, M.N., Ulutaş, P.A., Akalın, P.P., Büyükleblebici, S., Canturk, F. (2011). Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. Theriogenology. 75: 1459-1465.
35. Yotov, S., Fasulkov, I., Vassilev, N. (2011). Effect of ejaculation frequency on spermatozoa survival in diluted semen from Pleven Blackhead rams. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 35: 117-122.