تاثیر رقیق‌کننده‌های لاکتوز، شیر پس‌چرخ و تریس بر روی اسپرماتوزوئیدهای منجمد گاومیش

عبدالرضا رستگارنیا [1*]، وحید شفیع پور [2]

۱. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی اورمیه ، اورمیه، ایران
۲. مرکز پرورش واصلاح نژاد گاومیش ایستگاه جبل اورمیه، اورمیه، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات *a.rastegarnia@iaurmia.ac.ir*

(دریافت مقاله: ۸٦/۲/۳، پذیرش نهایی: ۸٦/۸/۲۰)

چکیده

ترکیب رقیق‌کننده منی مورد استفاده قبل از انجماد نقش اساسی را در انجماد موفقیت‌آمیز اسپرماتوزوئیدها ایفا می‌کند. هدف از انجام این تحقیق شناسایی محلول بافری مناسب برای انجماد منی گاومیش در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد کشور می‌باشد. برای این منظور تعداد ١٦ انزال دو رأس از گاومیش‌های نر مورد آزمایش جمع‌آوری گردید. نمونه‌های منی با کیفیت عالی و با داشتن بیش از ۷۰ درصد اسپرماتوزوئید با تحرک رو به جلو در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سه رقیق کننده مورد نظر تریس، شیر پس‌چرخ و لاکتوز رقیق گردید. نمونه منی رقیق شده پس از طی مرحله خنک کردن (Cooling) در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت و نیز اعمال زمان تعادل ٦-٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد متعاقب افزودن گلیسرول، در پایوت‌های ۰/۵ میلی لیتری فرانسوی با اعمال زمان انجماد مشخص قبل از ورود در ازت مایع منجمد گردیدند و در داخل کانتینرهای مخصوص نگه‌داری شدند. پس از گذشت ٤٨ ساعت از زمان انجماد، یخ گشایی (Thawing) نمونه پایوت‌های منجمد مورد نظر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. میزان تحرک و درصد اسپرماتوزوئیدهای با غشای پلاسمالمای سالم و یکپارچه و نیز آکروزوم‌های دست نخورده نمونه‌های مورد آزمایش پس از ذوب به‌ترتیب با استفاده از میکروسکوپ صفحه گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، آزمایش HOST و رنگ‌آمیزی گیمسا مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج ارزیابی میزان تحرک اسپرماتوزوئیدهای نمونه‌های منی منجمد تهیه شده بر اساس آزمون آنالیز واریانس نشان داد که درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها (میانگین± انحراف معیار) در محیط رقیق‌کننده تریس (٥٠±۳/٦) بیشتر از شیر پس‌چرخ (٤٤/٥±۲/٥) بوده و در رقیق‌کننده لاکتوز پائین (۲٤/٤±۱۰/٥) بود (P<۰/۰۱). در همین راستا درصد اسپرماتوزوئیدهای با غشای پلاسمالمای سالم و یکپارچه و نیز با آکروزوم دست نخورده برای رقیق‌کننده‌های تریس، شیر پس‌چرخ و نیز لاکتوز مورد نظر به‌ترتیب ٤١/٤±١/٢، ۳/۸±۳۲/٦ و ۹/٤±۲٤ و نیز ۳/۱±٥٤/۰، ٤/۱±٥۰/٤ و ۱۲/۲±۲۷/۳ درصد ثبت گردید (P<۰/۰۱). به‌طور کلی نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از رقیق‌کننده با بافر تریس نسبت به رقیق کننده‌های شیر پس‌چرخ و یا لاکتوز برای انجماد اسپرماتوزوئیدهای گاومیش مناسب و قابل توصیه می‌باشد.

مجله علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، ۱۳۸٦، دوره ۱، شماره ۲، ۸۸-۷۹.

کلمات کلیدی: رقیق کننده، اسپرماتوزوئید، گاومیش

مقدمه

موفقیت در ذخیره‌سازی منی به عوامل زیادی بستگی دارد که ممکن است برای هر گونه اختصاصی باشد. مهمترین مشکل برای انجماد اسپرماتوزوئیدها در اکثر گونه‌ها این است که تغییرات دمائی در طول فرایند عمل آوری، انجماد و نیز ذوب باعث وارد شدن آسیب‌های ساختاری، بیوشیمیایی و عمل کردی به اسپرماتوزوئیدها شده و به دنبال آن نسبت سلول‌های زنده و متحرک کاهش می‌یابد. این آسیب‌ها را می‌توان با سرد کردن

یخ‌گشایی بهتر و از همه مهم‌تر با استفاده از رقیق‌کننده مناسب کاهش داد. یک رقیق‌کننده مناسب نه تنها باید حجم نمونه منی را زیاد کند تا بتوان آن را برای بارور ساختن تعداد زیادی گاومیش به‌کار برد بلکه باید به نگهداری و افزایش طول عمر اسپرم کمک کند (۲ و۳). استفاده از رقیق کننده‌ها برای تأمین انرژی، محافظت اسپرم از مواد متابولیکی و تغییرات درجه حرارت و نیز مهار رشد میکروارگانیسم‌ها در انجماد اسپرم ضروری می‌باشد (۸ ، ١٤ و ١٥). اگر چه انجماد منی گاومیش انجام گردیده و گوساله گاومیش‌هایی با تلقیح مصنوعی منی منجمد متولد شده‌اند، بنابراین نتایج ارزیابی آزمایشگاهی و نیز باروری حاصل از به‌کارگیری رقیق‌کننده‌های مختلفی نظیر تریس، شیر و نیز محلول‌های بافری قندی مثل لاکتوز برای انجماد منی گاومیش تا حدودی متفاوت و بحث انگیز بوده است. برای مثال در برخی از تحقیقات صورت گرفته درصد تحرک اسپرماتوزوئیدهای منجمد گاومیش پس از یخ گشایی متعاقب استفاده از رقیق‌کننده تریس در مقایسه با رقیق‌کننده سیترات، اسید سیتریک و یا لاکتوز بهتر گزارش گردیده است (۱۷). در برخی دیگر از گزارشات درصد تحرک اسپرماتوزوئیدهای منجمد پس از ذوب زمانی که از رقیق‌کننده تریس استفاده گردیده است، تفاوتی با رقیق کننده‌های لاکتوز و سیترات (٤)، شیر (٦)، شیر پس‌چرخ و نیز سیترات (۹) نداشته است. از سوی دیگر باروری گاومیش‌هایی که با منی منجمد حاوی رقیق کننده تریس تلقیح شده بودند از رقیق کننده‌های لاکتوز و یا سیترات، پائین‌تر گزارش گردیده است (٤). اما نتایج باروری با رقیق‌کننده شیر تفاوتی نداشته است (٦). معهذا به‌دلیل نتایج متفاوت و تا حدودی بحث انگیز به‌کارگیری رقیق‌کننده‌های مختلف و همچنین کمبود منابع در زمینه انجماد منی گاومیش کشور تلاش گردید تأثیر رقیق‌کننده‌های تریس، شیر پس‌چرخ و نیز لاکتوز در این زمینه مورد بررسی قرار گیرد تا ضمن بررسی کامل آزمایشگاهی کیفیت اسپرماتوزوئیدهای منجمد متعاقب استفاده از رقیق‌کننده‌های فوق، براساس نتایج به‌دست آمده یک رقیق‌کننده با کیفیت بالا و ترکیبات مناسب جهت نگه‌داری طولانی مدت منی گاومیش برای استفاده در تلقیح مصنوعی پیشنهاد گردیده و بر مشکل افت باروری ناشی از کاهش تعداد و نیز درصد اسپرماتوزوئیدهای زنده و متحرک متعاقب انجماد غلبه یافت.

مواد و روش‌کار

این تحقیق در مرکز پرورش و اصلاح نژاد گاومیش شمال‌غرب کشور (ایستگاه جبل- ارومیه) واقع در استان آذربایجان‌غربی با عرض جغرافیایی۳۷ درجه و ۳۲ دقیقه و طول جغرافیایی ٤٥ درجه و ۵ دقیقه و با ارتفاع معادل۱۳۱۳ متر از سطح دریا انجام پذیرفت. تعداد دو رأس گاومیش نر ٤/۵ ساله از اکوتیپ‌های مختلف موجود در ایستگاه که برای جمع‌آوری و انجماد منی نگه‌داری می‌شدند، انتخاب گردید. جمع‌آوری منی از گاومیش‌های نر مورد نظر مطابق با برنامه کاری ایستگاه تلقیح مصنوعی (هفته ای دو بار در روز و در هر بار دو انزال به فاصله ۲۰-۱۵ دقیقه) در فصل پائیز با استفاده از مهبل مصنوعی مخصوص گاومیش (I.M.V، فرانسه) صورت گرفت. بلافاصله پس از پایان عمل جمع‌آوری منی، مشخصات نمونه شامل حجم، میزان اسپرماتوزوئیدهای با حرکت پیشرونده رو به جلو (Forward progressive motility) و تعداد کل اسپرماتوزوئیدها مورد شمارش قرار گرفت. برای شمارش تعداد اسپرماتوزوئیدها در هر میلی لیتر از منی اخذ شده از دستگاه فتومتر دیجیتالی (I.M.V، فرانسه) استفاده گردید. این دستگاه با استفاده از سیستم نوری (فتوالکتریکی) منی را ارزیابی کرده و توسط چاپگر کامپیوتری اطلاعاتی از قبیل تراکم اسپرماتوزوئیدها در واحد حجم نمونه منی را گزارش نمود. همچنین بر اساس اطلاعات حجم نمونه منی جمع‌آوری شده و نیز تعداد اسپرماتوزوئیدهای در نظر گرفته شده برای هر پایوت که به سیستم داده شد (۲۰ میلیون اسپرماتوزوئید)، حجم رقیق‌کننده و تعداد پایوت‌های مورد نیاز برای بسته بندی محاسبه گردید.

تهیه محلول‌های رقیق‌کننده

رقیق کننده‌های تریس، لاکتوز و شیر پس‌چرخ در همان روز جمع‌آوری منی در آزمایشگاه تلقیح مصنوعی ایستگاه جبل بر اساس پروتکل ذیل تهیه گردیدند.

رقیق‌کننده تریس

برای تهیه رقیق‌کننده تریس از پودر تریس به میزان ۲/٦٦ گرم، اسید سیتریک ۱/٤۸ گرم، گلوکز ۰/٦٤ گرم، اسیدآمینه سیستئین ۰/۱۳ گرم (ساخت شرکت Merk آلمان) در ۷۳ میلی‌لیتر آب مقطر بر اساس (جدول ۱) استفاده گردید. پنی‌سیلین به‌مقدار ۱۰۰۰ واحد بین‌المللی و نیز استرپتومایسین به‌مقدار ۱ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر رقیق‌کننده اضافه گردید. لازم به توضیح است این نسبت اجزای معمول رقیق‌کننده تریس- زرده تخم مرغ ایستگاه جبل می‌باشد که مطابق با برنامه کاری ایستگاه برای انجماد اسپرم گاومیش استفاده می‌گردد.

رقیق‌کننده لاکتوز

برای تهیه رقیق‌کننده لاکتوز از روش توصیف شده توسط Azam و همکاران (۱۹۸۸) استفاده گردید (۱). در این راستا از لاکتوز به نسبت ۱۱ درصد (٥٦/۲٥ میلی‌لیتر)، فروکتوز ٦ درصد (۱۸/۷٥ میلی‌لیتر)، زرده تخم‌مرغ (۲۰ میلی‌لیتر) و گلیسرول (٥ میلی‌لیتر) در ۱۰۰ میلی‌لیتر حجم نهایی رقیق‌کننده استفاده گردید. محلول‌های لاکتوز و فروکتوز در آب مقطر دوبار تقطیر تهیه و پنی‌سیلین و استرپتومایسین نیز با نسبت مشخص مشابه رقیق‌کننده فوق افزوده گردید (جدول ۱).

رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ

برای تهیه رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ از شیر تازه گاو، استفاده گردید. برای این منظور قبل از استفاده شیر مورد نظر جوشیده شده و به مدت یک شب داخل یخچال نگه‌داری گردید. روز بعد لایه چربی رویی آن برداشته شد سپس باقی‌مانده شیر مورد نظر به‌مدت ۱۲-۱۰ دقیقه در دمای نزدیک به جوش ۹٥-۹۲ درجه سانتی‌گراد داخل حمام بن‌ماری قرار گرفت. بعد از طی این مرحله نمونه شیر مورد نظر سرد شده و دوباره در داخل یخچال قرار گرفت تا یکبار دیگر لایه چربی رویی آن برداشته شود. در نهایت شیر مورد نظر از روی یک پارچه تنظیف کتانی عبور داده و آماده مصرف گردید (۱۱). در این راستا برای تهیه رقیق‌کننده شیر از زرده تخم‌مرغ به نسبت ٥ درصد و از گلیسرول نیز به میزان ٦ درصد حجم نهایی استفاده گردید. پنی‌سیلین و استرپتومایسین نیز با نسبت مشخص (پنی‌سیلین به‌مقدار ۱۰۰۰ واحد بین‌المللی و نیز استرپتومایسین به‌مقدار ۱ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر رقیق‌کننده) به رقیق‌کننده اضافه گردید (جدول ۱).

طرح آزمایش

بعد از ارزیابی کلی منی در گسترش ضخیم و تهیه محلول‌های رقیق‌کننده نمونه منی جمع‌آوری شده ۱٦ انزال با داشتن بیش از ۷۰ درصد اسپرماتوزوئید با تحرک رو به جلو برای بررسی تاثیر نوع رقیق‌کننده مورد استفاده برای انجماد مورد مقایسه قرار گرفتند. برای این منظور هر یک از محلول‌های رقیق کننده تهیه شده به دو حجم مساوی ٥۰ میلی‌لیتری تقسیم گردیده وجداگانه به دو بشر مدرج منتقل گردید. در این راستا برای تهیه رقیق‌کننده تریس با غلظت گلیسرول ۷ درصد، به یکی از بشرهای حاوی محلول رقیق‌کننده فوق، ٤ میلی‌لیتر گلیسرول و به بشر دیگر ۳ میلی‌لیتر گلیسرول اضافه گردید. برای تهیه رقیق‌کننده شیر حاوی ٦ درصد غلظت نهایی گلیسرول نیز نمونه رقیق‌کننده به دو قسمت مساوی حاوی ۳ درصد گلیسرول تقسیم شد. در نهایت برای تهیه رقیق‌کننده لاکتوز با غلظت نهایی ٥ درصد نیز رقیق‌کننده مورد نظر به دو قسمت حاوی ۲/٥ درصد گلیسرول تقسیم گردید. نمونه منی اخذ شده به رقیق‌کننده حاوی گلیسرول کم (در تریس) و یا به یکی از بشرهای حاوی رقیق‌کننده شیر و لاکتوز ۳ و ۲/٥ درصد گلیسرول اضافه گردید. تمامی نمونه‌های تهیه شده بعد از طی یک ساعت سرد شدن در دمای معمول ۳۷ درجه سانتی‌گراد بن‌ماری وارد یخچال شدند و به‌مدت ٦- ٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد یخچال (زمان تعادل) نگه‌داری شدند. در مرحله

بعدی سه محلول رقیق‌کننده واجد اسپرم با گلیسرول کم با رقیق‌کننده فاقد اسپرم وگلیسرول بیشتر مخلوط شده و نمونه منی رقیق شده با غلظت گلیسرول نهایی ۷ درصد (تریس)، ٦ درصد (لاکتوز)، ۵ درصد (شیر پس‌چرخ) تهیه گردید. نمونه‌های منی رقیق شده با استفاده از دستگاه مدل MRA_3 ساخت فرانسه بطور اتوماتیک در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری فرانسوی (با احتساب تعداد ۲۰ میلیون اسپرماتوزوئید در هر پایوت) بسته‌بندی گردیده و با اعمال زمان انجماد min ۲۰ / ۱۲۰- ، ٤۰ – در تانک ازت مایع منجمد و داخل کانتینرهای مخصوص نگه‌داری اسپرم منجمد تا زمان انجام آزمایش منتقل گردیدند.

بررسی تحرّک

برای ارزیابی تحرک اسپرماتوزوئیدهای نمونه پایوت‌های منی رقیق شده منجمد مورد نظر آن را از داخل کانتینر مخصوص نگه‌داری بیرون آورده و عمل یخ گشایی (Thawing) در آب گرم به‌مدت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. بلا فاصله بعد از طی این عمل یک قطره از نمونه منی ذوب شده را روی لام از پیش گرم شده قرار داده و با استفاده میکروسکوپ زمینه گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) میزان تحرک اسپرماتوزوئیدها با درشت‌نمایی٤۰× مورد ارزیابی قرارگرفت.

بررسی مورفولوژی آکروزم اسپرماتوزوئیدها

برای ارزیابی مورفولوژی اسپرماتوزوئیدهای نمونه‌های منی منجمد مورد نظر از روش رنگ آمیزی گیمسا استفاده گردید (۱۸). برای این منظور با قرار دادن یک قطره از منی ذوب شده بر روی لام از پیش گرم شده گسترش تهیه و با دمیدن هوا بلافاصله خشک گردیدند. گسترش‌های تهیه شده با استفاده از بافر فرمال سالین (سیترات سدیم ۰/۳٦۷۵، فروکتوز۰/٦۷۵۵ گرم، آب مقطر به‌میزان ۵۰۰ میلی لیتر که حاوی ۱ درصد فرمالین می‌باشد) به‌مدت ۱۵ دقیقه فیکس شده و به‌مدت ۲۰-۱۵ دقیقه با جریان آب شستشو داده شدند. در مرحله بعد لام‌ها دوباره خشک شده و به‌مدت ۹۰ دقیقه با استفاده از محلول گیمسا رنگ‌آمیزی شدند.

برای تهیه محلول گیمسا، ۳/۸ گرم پودر گیمسا در ۳۷۵ میلی‌لیتر متانل مطلق با هاون کوبیده و حل گردید. سپس گلیسرول به‌میزان ۱۲۵ میلی‌لیتر افزوده و مخلوط رنگ به‌هم زده شد. برای اندازه‌گیری فروتی‌های تهیه شده، ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول گیمسا تهیه شده با ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات $^1/_{15}$ مولار (PH=7) و ۳۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و جهت رنگ‌آمیزی استفاده گردید. گسترش‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری با درشت‌نمایی۱۰۰× با رنگ‌آمیزی امرسیون مورد بررسی قرار گرفتند. در این راستا درصد آکروزوم‌های سالم و دست نخورده (Intact acrosome) مورد شمارش قرار گرفت. همچنین آکروزوم‌های متورم (Swallon)، کنده شده و لخت (Denuded) و چروکیده (Ruffled) به عنوان آکروزوم‌های ناسالم محسوب و ثبت گردیدند (۱).

بررسی یکپارچکی غشاء اسپرماتوزوئیدها (HOST)

ارزیابی یکپارچکی غشاء پلاسمالمای اسپرماتوزوئیدهای نمونه‌های منی جمع‌آوری شده (Fresh) قبل از انجماد (Prefreeze) و نیز منجمد با استفاده از روش توصیف شده توسط Jeyendran و همکاران (۱۹۸٤) انجام گرفت (۷). برای این منظور محلول HOS با حل کردن ۰/۷۳۵ گرم سیترات سدیم و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مطابق با استاندارد توصیه شده توسط سازمان بهداشت جهانی تهیه گردید (فشار اسمزی محلول مورد نظر۱۹۰mOsm/kg~ بود). آزمایش با مخلوط کردن ۵۰ میکرولیتر از نمونه منی رقیق شده مورد نظر پس از ذوب به ۵۰۰ میکرولیتر محلول HOS آماده شده به طریقه فوق در داخل لوله آزمایش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد داخل بن ماری به‌مدت ۳۰ الی ٤۵ دقیقه صورت گرفت. بعد از طی مدت یاد شده، یک قطره از نمونه منی مورد آزمایش در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست مورد بررسی قرار گرفت و با شمارش و درصدگیری حدود ۲۰۰ اسپرماتوزوئید برای شمارش حالت تورم (Swelling) که نشان‌دهندهٔ اسپرماتوزوئیدهای

غشاء پلاسمالمایی دست نخورده بود و با حالت دم تاخورده مشخص و تکمیل گردید.

آنالیز آماری

اطلاعات به‌دست آمده به صورت میانگین±انحراف معیار (Mean±SEM) محاسبه و ارائه گردید. نتایج برای هر متغییر با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ و آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. از آزمون T و نرم افزار SPSS برای مقایسه میانگین متغیرها بین نمونه‌های تازه (Fresh) و پس از ذوب (Post thaw) استفاده گردید.

جدول۱- ترکیب اجزا در ۱۰۰ میلی لیتر از محلول‌های رقیق‌کننده لاکتوز، شیر پس‌چرخ و تریس برای انجماد منی گاومیش

ترکیب رقیق کننده	لاکتوز	شیر پس‌چرخ	تریس
لاکتوز (۱۱ درصد) (میلی‌لیتر)	٥٦/٢٥	-	-
فروکتوز (٦ درصد) (میلی‌لیتر)	۱۸/۷۵	۱ (درصد)	-
فروکتوز (گرم)	-	۱	-
شیر پس‌چرخ (میلی‌لیتر)	-	۸۹	-
تریس (گرم)	-	-	۲/٦٦
اسید سیتریک (گرم)	-	-	۱/٤۸
گلوکز (گرم)	-	-	۰/٦٤
سیستئین (گرم)	-	-	۰/۱۳
پنی سیلین (واحد/ میلی‌لیتر)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
استرپتومایسین (میلی‌گرم/ میلی لیتر)	۰/۱	۰/۱	۰/۱
آب مقطر (میلی‌لیتر)	-	-	۷۳
زرده تخم مرغ (میلی‌لیتر)	۲۰	٥	۲۰
گلیسرول (میلی‌لیتر)	٥	٦	۷

نتایج

الف) تحرک اسپرم

میزان تحرک اسپرماتوزوئیدهای نمونه منی جمع‌آوری شده (Fresh) برای استفاده در تهیه رقیق‌کننده تحت آزمایش به تفکیک در جدول ۲ آورده شده است.

در این راستا از نمونه‌های منی با درصد تحرک اسپرماتوزوئید بیش از ۷۰ درصد برای ارزیابی رقیق‌کننده مورد نظر استفاده گردید (۲/۲±۷۰). میزان تحرک اسپرماتوزوئیدها قبل از انجماد و در واقع پس از اعمال زمان تعادل (Prefreeze) به‌ترتیب برای رقیق کننده‌های منی مورد آزمایش تریس ٤/٦±٥۳، شیر پس‌چرخ ۲/٥±٥۰ و نیز برای لاکتوز ۳/۸±۳۲/٦ درصد ثبت گردید (جدول ۳). میزان درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها متعاقب ذوب (Post thaw motility) به‌ترتیب برای رقیق‌کننده‌های منی مورد آزمایش تریس ۳٦ ±٥۰، شیر پس‌چرخ ٤٤/٥±۲/٥ و نیز برای رقیق‌کننده لاکتوز ۱۰/٥±۲٤/٤ گزارش گردید (جدول ۳).

بررسی آماری با استفاده از مقایسه میانگین نمونه‌های جفت با استفاده از آزمون T اختلاف معنی‌داری را در میزان تحرک اسپرماتوزوئیدها در طی فرآیند انجماد و نیز ذوب نشان داد (P<۰/۰۱). درصد اسپرماتوزوئیدهای متحرک پس از انجماد و ذوب به صورت معنی‌داری بین رقیق‌کننده‌های مورد آزمایش (تریس، شیر و لاکتوز) متفاوت بود (P<۰/۰۱). در این راستا بین میزان تحرک اسپرماتوزوئیدها ارتباط مستقیم و معنی‌داری با درصد آکروزوم‌های سالم و دست نخورده و نیز اسپرماتوزوئیدهایی باغشاء پلاسمالمای سالم و دست نخورده مشاهده گردید (P<۰/۰٥).

ب) ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرماتوزوئیدها (HOST)

درصد اسپرماتوزوئیدهای با غشای پلاسمالمای سالم و یا در واقع متورم (Swollen) در محلول HOS یا محلول هیپواسموتیک لاکتوز با اسمولاریته مشخص(mOS ۱۹۰m/KG) که گویای اسپرماتوزوئیدهای با غشای پلاسمالمای یکپارچه و دست نخورده می‌باشد، متعاقب یخ‌گشائی (Post thaw) برای نمونه‌های منی رقیق‌شده با تریس، شیر پس‌چرخ و نیز لاکتوز به‌ترتیب ۱/۲±٤۱/٤، ۳/۸±۳۲/٦ و ۹/٤±۲٤ ثبت گردید (جدول ٤).

در همین ارتباط درصد اسپرماتوزوئیدهای متورم پس از اعمال زمان تعادل (Prefreeze) به‌ترتیب برای نمونه‌های منی رقیق شده در رقیق‌کننده تریس، شیر پس‌چرخ و نیز لاکتوز به‌ترتیب ۱/۱± ٥٤/۳، ٥/۲± ٤۳/٤ و ۲/۸±۳٥/٦ ثبت گردید (جدول ٤).

در این راستا ارتباط بین درصد اسپرماتوزوئیدهای متورم پس از انجماد و ذوب به‌صورت معنی‌داری با درصد تحرک و اسپرم‌های با آکروزم‌های سالم معنی‌دار بود (P<۰/۰٥).

ج) مورفولوژی اسپرماتوزوئیدها

درصد آکروزوم‌های سالم و دست‌نخورده پس از ذوب (Post thaw) برای نمونه‌های منی رقیق‌شده با تریس، شیر و نیز لاکتوز به‌ترتیب ۳/۱±٥٤، ٤/۱±٥۰/٤ و ۱۲/۲±۲۷/۳ ثبت گردید (جدول ٥).

همچنین درصد آکروزوم‌های سالم و دست‌نخورده قبل از انجماد و نیز پس از اعمال زمان تعادل (Prefreeze) برای نمونه‌های منی رقیق شده متعاقب استفاده از تریس، شیر و نیز لاکتوز به‌ترتیب ۱/۷±٦۸/۱، ۱/۳±٦۷/۹ و ۰/۸±٥۰/٤ گزارش گردید (جدول ٥).

درصد آکروزوم‌های سالم و دست‌نخورده پس از انجماد و ذوب به صورت معنی‌داری بین رقیق کننده‌های مورد آزمایش تریس، شیر و لاکتوز متفاوت بود (P<۰/۰۱).

جدول۲- خصوصیات نمونه‌های منی جمع‌آوری شده از گاومیش‌های نر تحت بررسی به تفکیک اکوتیپ و شماره ثبت

خصوصیات منی شماره ثبت	اکوتیپ	حجم منی	گسترش ضخیم	تراکم اسپرماتوزوئید در واحد حجم (میلیون/ml)	تحرک اسپرماتوزوئید (درصد)	اسپرماتوزوئید زنده (درصد)
(۹۱) ۲۱۱۰۰۰۱٦۹	آذربایجان	۳/۷±۰/۳۱	دودی	۲۸±۱۰۳۱/۳۱	۰/۷± ٦۹	۰/٦± ۸۰/۸
(۱۱۳) ۲۱۱۰۰۰٥٦۹	شمال	۰/۳٥ ±۲/۹۲	دودی	۱۰۰ ±۱۲۹۰/۷	۰/٤±۷۲	۰/۸±۷۸/٦

جدول۳- درصد اسپرماتوزوئیدهای متحرک در نمونه منی تازه، نمونه‌های رقیق شده قبل از انجماد و پس از ذوب تحت آزمایش

رقیق کننده	درصد اسپرماتوزوئیدهای متحرک		
	تازه	قبل از انجماد	پس از ذوب
تریس	٦۸±۱/۸	٥۳±٤/٦	٥۰±۳/٦
شیر پس‌چرخ	۷۰/۸±۱/۰	٥۰/۰±۲/٥	٤٤/٥±۲/٥
لاکتوز	٦۹/۲±۰/۸	۳۲/٦±۳/۸	۲٤/٤±۱۰/٥

جدول٤- درصد اسپرماتوزوئیدهای با غشای پلاسمالمایی سالم در نمونه منی تازه، قبل از انجماد و پس از ذوب تحت آزمایش

رقیق‌کننده	درصد اسپرماتوزوئیدهای با غشای پلاسمایی سالم		
	تازه	قبل از انجماد	پس از ذوب
تریس	٦٥±٣/٢	٥٤/٣±١/١	٤١/٤±١/٢
شیر پس‌چرخ	٦٦±١/٤	٤٣/٤±٥/٢	٣٢/٦±٣/٨
لاکتوز	٦٥±١/٩	٣٥/٦±٢/٨	٢٤/٠±٩/٤

جدول٥- درصد آکروزوم‌های سالم در نمونه منی تازه، نمونه‌های رقیق‌شده قبل از انجماد و پس از ذوب تحت آزمایش

رقیق‌کننده	درصد آکروزوم‌های سالم		
	تازه	قبل از انجماد	پس از ذوب
تریس	٨٦±٢/٢	٦٨/١±١/٧	٥٤/٠±٣/١
شیر پس‌چرخ	٨٩/٧±٠/٤	٦٧/٩±١/٣	٥٠/٤±٤/١
لاکتوز	٨٨±١/٣	٥٠/٤±٠/٨	٢٧/٣±١٢/٢

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق میزان تحرک اسپرماتوزوئیدها متعاقب یخ‌گشائی (Post thaw motility) به‌ترتیب برای رقیق‌کننده‌های مورد آزمایش تریس ٣/٦±٥٠، شیر پس‌چرخ ٢/٥±٤٤/٥ و نیز برای لاکتوز ١٠/٥±٢٤/٤ درصد مشاهده گردید (P<٠/٠١). میزان تحرک اسپرماتوزوئیدها قبل از انجماد (Prefreeze) به‌ترتیب برای رقیق کننده‌های منی مورد آزمایش تریس ٤/٦±٥٣، شیر پس‌چرخ ٢/٥ ± ٥٠ و نیز برای لاکتوز ٣/٨ ± ٣٢/٦ درصد ثبت گردید (P<٠/٠١). بررسی‌های انجام گرفته نشان می‌دهد طی فرایند انجماد آنزیم‌های مسئول تحرک اسپرم از محتویات داخل سلولی به داخل مایع پلاسمای منی نشت می‌کند. این عمل باعث ضعف و آسیب دیدن غشای پلاسمالمای اسپرماتوزوئیدها شده و آن‌ها را به دهیدراسیون و تشکیل کریستال‌های یخ هنگام انجماد حساس می‌سازد و باعث کاهش تحرک میزان اسپرماتوزوئیدها متعاقب انجماد می‌گردد (١ و ١٣). تحقیق حاضر در فصل پائیز (آبان ماه) بر روی نمونه‌های منی جمع آوری شده انجام پذیرفت. Kolves و Dimov (١٩٩٩) گزارش نمودند که فصل تاثیری در انجماد منی گاومیش ندارد (١٠). در همین راستا Gokhale و همکاران (٢٠٠٢) گزارش نمودند که درصد تحرک اولیه قبل و بعد از انجماد اسپرماتوزوئیدها با فصل سال مربوط می‌باشد (٦). در تحقیق اخیر تاثیر گاو نر و رقیق‌کننده و نیز غلظت اسپرماتوزوئیدها بر روی میزان تحرک اسپرماتوزوئیدها پس از انجماد معنی‌دار بود. در این تحقیق میزان یکپارچگی غشای پلاسمالمای اسپرماتوزوئیدهای تحت آزمایش متعاقب یخ‌گشائی به‌ترتیب برای نمونه‌های منی رقیق‌شده با تریس، شیر پس‌چرخ و نیز لاکتوز به‌ترتیب ١/٢±٤١/٤، ٣/٨±٣٢/٦ و ٩/٤±٢٤ مشاهده گردید (P<٠/٠٥). سالم بودن غشای پلاسمالمای اسپرماتوزوئیدها برای نگه‌داری تحرک، واکنش آکروزومی و سایر واکنش‌های اسپرم که برای باروری مهم است در ارتباط می‌باشد. در آزمایش HOS در اثر فشار اسمزی، آب به داخل

اسپرماتوزوئیدها نفوذ می‌کند و تعادلی بین محتویات مایع داخل سلولی و مایع خارجی فراهم می‌گردد. این عمل باعث افزایش حجم کلی اسپرم (Swelling) شده و منجر به پیچ‌خوردگی دم اسپرم می‌گردد (۱). درهمین ارتباط Jeyendran و همکاران (۱۹۸٤) گزارش نمودند که ارتباط معنی‌داری بین حالت Swelling و توانایی باروری وجود دارد (۷). بررسی‌های به‌عمل آمده نشان می‌دهد مورفولوژی اسپرماتوزوئیدها در نفوذ و باروری تخمک مهم بوده و ارتباط قوی بین درصد آکروزوم‌های سالم و باروری وجود دارد. در طی فرایند انجماد اسپرماتوزوئیدها، تغییراتی در ناحیه قدامی آکروزوم ایجاد می‌شود که با حالت تورم و کنده شدن آکروزوم‌ها مشخص می‌شود (۱). درصد آکروزوم‌های سالم و دست‌نخورده پس از ذوب برای نمونه‌های منی رقیق شده با تریس، شیر و نیز لاکتوز به ترتیب ۳/۱±٥٤، ٤/۱±٥۰/٤ و ۱۲/۲±۲۷/۳ گزارش گردید (P<۰/۰٥). همچنین درصد آکروزوم‌های سالم و دست‌نخورده قبل از انجماد و در واقع پس از اعمال زمان تعادل (Prefreeze) برای نمونه‌های منی رقیق شده با تریس، شیر و نیز لاکتوز به ترتیب ۱/۷±٦۸/۱، ۱/۳±٦۷/۹ و ۰/۸±۵۰/٤ گزارش گردید (P<۰/۰٥). Kumar و همکاران (۱۹۹۳) نشان دادند که درصد آکروزوم‌های غیر نرمال طی فرایند انجماد افزایش پیدا می‌کند (۱۱ و ۱۲). این محققین نشان دادند که درصد آکروزوم‌های غیر نرمال در رقیق‌کننده تریس از شیر و سیترات کمتر است (P<۰/۰٥). نتایج تحقیق فوق با نتایج ارزیابی آزمایشگاهی تحقیق حاضر همخوانی دارد. زنده بودن اسپرماتوزوئیدها مثل تمامی سلول‌ها پس از انجماد بستگی کامل به زمان انجماد، زمان ذوب و حتی دمایی که اسپرماتوزوئیدها قبل از ورود به داخل تانک ازت مایع متحمل می‌شوند (Intermediate sub-zero plunge temperature)، دارد که در این راستا در تحقیق حاضر برای انجماد اسپرماتوزوئیدهای گاومیش دمای ۱۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید. Sukatos و همکاران (۲۰۰۱) زمان مناسب برای انجماد اسپرماتوزوئیدهای گاومیش در فاز بخار ازت مایع (قبل از فرو بردن به داخل تانک ازت مایع) را ۱۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه گزارش کردند (۱۷) که به‌نظرمی‌رسد با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. در این

تحقیق از غلظت ۲۰ درصد زرده تخم مرغ برای تهیه رقیق‌کننده‌های تریس و لاکتوز و برای رقیق‌کننده شیر از غلظت ۵ درصد استفاده گردید. Pampapathi و همکاران (۱۹۹۷) اثرات غلظت‌های مختلف زرده تخم‌مرغ (۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) را در رقیق‌کننده‌های تریس زرده تخم‌مرغ (Tes-tris/egg yolk, tes- TYG)، سیترات زرده تخم‌مرغ (EYCG) و تریس فروکتوز- زرده تخم مرغ (Tris-froctose/egg yolk)، در انجماد اسپرماتوزوئیدهای گاومیش مورد بررسی قرار دادند. بر اساس میزان کاهش تحرک اسپرماتوزوئیدها پس از ذوب، بهترین درصد زرده تخم مرغ در رقیق کننده‌های فوق به‌ویژه در رقیق‌کننده حاوی تریس، ۲۰ درصد و در قند حاوی فروکتوز، ۵ درصد گزارش گردید که به‌نظر می‌رسد با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد (۱٤). Rasul و همکاران (۲۰۰۰) اثرات سه محلول رقیق‌کننده تریس- سدیم سیترات، تریس سدیم- اسید سیتریک و تریس- تس (Tris-tes) را بر نوع حرکت، یکپارچگی غشاء اسپرم و مورفولوژی آکروزوم‌ها متعاقب انجماد منی گاومیش مورد بررسی قرار داده‌اند. در این تحقیق بر اساس ارزیابی فرم تحرک با سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم Computer Assisted Semen Analyzer, (CASA) میزان حرکت خطی اسپرماتوزوئیدها (Linear motility) در رقیق کننده تریس- اسیدسیتریک از بقیه رقیق‌کننده‌ها بالا بود. در تحقیق آن‌ها میزان یکپارچگی غشایی اسپرم (۲/۷±٤۰/۰) و نیز درصد آکروزوم‌های سالم (٦/٤±٦۱/٤) در رقیق کننده‌های مختلف تفاوتی با هم نداشتند. معهذا بر اساس پائین بودن میزان حرکت حلقوی اسپرماتوزوئیدها (Circular)، و نیز منحنی-خطی (Curvilinear) اسپرماتوزوئیدها همچنین پائین بودن اختلالات

آکروزوم اسپرماتوزوئیدها، رقیق‌کننده تریس- اسید سیتریک مناسب تشخیص داده شده که به‌نظر می‌رسد نتایج به‌دست آمده در تحقیق ایشان با نتایج بخشی از تحقیق حاضر همخوانی دارد (١٦). Dhami و همکاران (١٩٩٦) هر دو رقیق‌کننده شیر و تریس را به نسبت مساوی برای انجماد اسپرماتوزوئیدهای منی گاومیش مناسب تشخیص دادند که به‌نظرمی‌رسد این نتایج با نتایج تحقیق حاضر همخوانی ندارد. همین محققین در گزارش قبلی خود رقیق کننده تریس را بیشتر از سیترات و لاکتوز برای انجماد اسپرماتوزوئیدهای منی گاومیش مناسب تشخیص داده بودند (٣، ٤ و ٥). Azam و همکاران (١٩٨٨) کارایی به‌کارگیری رقیق‌کننده لاکتوز- فروکتوز- زرده تخم مرغ در انجماد منی گاومیش‌های نژاد نیلی راوی را بر اساس درصد اسپرماتوزوئیدهای با یکپارچگی غشای اسپرم و نیز آکروزوم‌های سالم دست‌نخورده پس از ذوب مورد بررسی قرار دادند .

ارزیابی آزمایشگاهی نمونه‌های منی منجمد متعاقب یخ گشائی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که تنها ٩/١±٢٢/٨ درصد از اسپرماتوزوئید دارای آکروزوم دست نخورده بوده و ٩/٤±٦٨/٨ درصد از اسپرماتوزوئیدها فاقد یکپارچگی غشای اسپرم می باشد که به نظر می‌رسد با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد (١).

به‌طور کلی در این تحقیق بر اساس ارزیابی نتایج آزمایشگاهی درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها، یکپارچگی غشای پلاسمالما و نیز درصد آکروزوم‌های سالم اسپرماتوزوئیدهای نمونه‌های منی رقیق شده منجمد پس از یخ گشائی، نتیجه‌گیری شد که استفاده از رقیق‌کننده بافر تریس از رقیق‌کننده‌های شیر و یا لاکتوز برای انجماد اسپرماتوزوئیدهای گاومیش مناسب‌تر و قابل توصیه می‌باشد.

فهرست منابع

1. Azam, M., Anzar, M. and Arslan, M. (1988): Assessment of post-thaw semen quality of buffalo and sahiwal bulls using new semen assay. Pakistan Vet.J.18 (2), pp: 74-80.
2. Baruselli, P. S. (1994): Basic requirement for artificial insemination & embryo transfer in buffaloes. Buffalo. J. Suppl. 2, pp: 53-60.
3. Dhami, A.J., and Kodagali, S.B. (1990): Freezability, enzyme leakage and fertility of buffalo spermatozoa in relation to the quality of semen ejaculates and extenders. Theriogenology. 34 (5): 853-863.
4. Dhami, A., Mohan, G. and Sahni, K.L. (1993): Effect of extender and additives on preservability of cattle and buffalo semen at 5^0C and -196^0C. Indian Journal of Animal Sciences. 63(5): 492-498.
5. Dhami, A.J., Sahni, K.L., Mohan,G. and Jani,V.R. (1996): Effect of differences variables on frezeability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. Theriogenology. (10), pp: 109-120.
6. Gokhale, S.B., Joshi, P.H., Mushtaque, M. and Mokashi, S.P. (2002): Studies on the effect of hydrogen ion concentration (PH) of extender of semen characters of surti buffalo bulls. Buffalo-bulletin. 21 (2): 29-34.
7. Jeyendran, R.S., Van-dan-ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G. and Zeneveld, L.J.D. (1984): Development an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod.Fert. 70: 219-228.
8. Kaker, S.S. and Anand, S.R. (1981): Changes in adenosine 5′- triphosphate adeneylate energy changes and adenosine 3′5′- cyclic monophosphate during the freezing of buffalo semen. J.Reprod.Fertil. 62, 543-548.
9. Khan, I.Q., Ahmad, K., Akhtar, N. and Khan, A. (1988): Effect of cryopreservation on the post-thaw surviveability of buffalo bull spermatozoa without seminal plasma. Pkistan.Vet. J. 18 (4), pp: 177-179.
10. Kolev, S.V. and Dimov, K. (1999): Freezing ability of sperm from young buffalo and cattle bulls. Bulgarian-journal-of- Agriculture- Science. 5(3): 497-501.
11. Kumar, S., Sahni, K.L. and Mohan, G. (1993-a) Effect of different extender formulation on acrosomal maintenance of buffalo spermatozoa frozen in milk, Tris and sodium citrate dilutors. Indian Journal of Animal Sciences. 63 (12): 1233-1239.

12. Kumar, S., Sahni, K.L. and Mohan, G. (1993-b) Freezing of buffalo semen in milk. Tris and sodium citrate dilutors with different levels of yolk and glycerol in relation to PH of dilutors. Indian Journal of Animal Sciences. 63(5): 499-504.
13. Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D. and Rodrigues, J.L. (2002): Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better. Theriogenology. 57: 327-344.
14. Pampapathi, J., Mohan, G., Kumar, S. and Sahni. K.L. (1997): Effect of dilution rate and yolk levels on preservability of Murrah buffalo semen. Indian-journal of dairy science. 50(5): 352-358.
15. Rasul, Z., Anzar, M., Jalali, S. and Ahmad, N. (2000): Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. Animal reproduction science. 59, 31-41.
16. Rasul, Z., Ahmad, N. and Anzar, M. (2001): Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. Journal of Andrology. 22(2):278-283.
17. Sukhato, P., Thongsodseang, S., Utha, A. and Songsasen, N. (2001): Effect of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryoprederved buffalo spermatozoa. Animal Reproduction Science. (67), pp: 69-77.
18. Watson, P.F. (1975): Use of giemsa stain to detect change in the acrosome of frozen ram spermatozoa. Veterinary Record. 97: 12-15.