نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، ص. ۱۰۴-۹۸

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 6, No. 1, Spring 2014, p. 98-104

اثر مقادیر مختلف ال-گلوتامین و گلیسرول بر اسپرم پوشش‌دار شده قوچ در روند انجماد

ساناز حسن‌پور[۱] - محمد روستائی علی مهر[۲*] - مهرداد محمدی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۳

چکیده

به‌منظور بررسی مقادیر مختلف ال-گلوتامین و گلیسرول و اثر متقابل آن‌ها بر انجماد اسپرم پوشش‌دار شده قوچ نژاد تالشی، منی از ۴ راس قوچ با استفاده از واژن مصنوعی متصل به لوله حاوی تریس-فروکتوز- ۱۵٪ زرده تخم‌مرغ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها تجمیع و سانتریفیوژ شد و پس از حذف مایع فوقانی و رقیق‌سازی به ۹ قسمت تقسیم شد. به هر قسمت مقدار صفر (G_0)، ۸۰ (G_{80}) یا ۱۶۰ (G_{160}) میلی‌مول ال-گلوتامین و مقدار ۳ (g_3)، ۵ (g_5) یا ۷ (g_7) درصد گلیسرول اضافه شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از نیتروژن مایع منجمد شدند. پس از ۲ هفته نمونه‌ها یخ‌گشایی شدند و تحرک پیش-رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا آکروزوم اسپرم، در صفر، ۳، ۶ و ۹ ساعت بعد از یخ‌گشایی بررسی شد. نتایج نشان داد بعد از انجماد اثر متقابل گلیسرول و ال-گلوتامین بر تحرک و سلامت آکروزوم اسپرم پوشش‌دار شده معنی‌دار بود. بیشترین تحرک اسپرم در تیمارهای $G_{80}g_5$ (۴۵±۱/۹۵)، G_0g_7 (۴۸/۷۵±۱/۹۵) و $G_{80}g_7$ (۵۰/۷۹±۱/۹۵) و کمترین تحرک در تیمار G_0g_3 (۲۶/۵±۱/۹۵) مشاهده شد. کمترین سلامت آکروزوم در تیمار $G_{160}g_3$ (۷۶±۰/۹۴) بود. بیشترین سلامت غشا پلاسمایی و زنده‌مانی در مقدار ۸۰ میلی‌مول (به‌ترتیب ۳۶/۷۱±۱/۱۶ و ۴۵/۲۸±۱/۵۷) بود. بیشترین زنده‌مانی در مقدار ۷ درصد گلیسرول (۴۱/۷۱±۱/۵۸) مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که ۷ درصد گلیسرول و ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین احتمالا برای انجماد اسپرم پوشش‌دار شده قوچ مناسب است.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، ال-گلوتامین، انجماد، پوشش‌دار کردن، گلیسرول

مقدمه

امروزه به منظور ذخیره‌سازی بلند مدت منی دام‌ها از فرآیند انجماد استفاده می‌شود. فناوری انجماد سلول امکان استفاده از فرآورده‌های بیولوژی را در زمان‌ها و مکان‌های مختلف فراهم کرده-است. از طرفی حفظ عملکرد اسپرم پس از انجماد و یخ گشایی جهت باروری تخمک لازم است.اگر چه انجماد منی امکان ذخیره سازی بلند مدت آن‌را میسر می‌کند ولی روند انجماد سبب القا تنش های مخرب بر اسپرم می‌شود. اسپرم قوچ در مقایسه با سایر پستانداران بدلیل نسبت بالای اسیدهای چرب غیراشباع/اشباع و مقدار کم کلسترول/فسفولیپید در غشا سیتوپلاسمی حساسیت زیادی به سرما و انجماد نشان می‌دهد (۱۶). افزودن مواد سرما محافظ سبب کاهش آسیب‌ها روند انجماد خواهند شد ولی تاکنون تحقیقات انجام شده روی انجماد منی قوچ با نتایج رضایت بخش همراه نبوده‌است (۱۶).

گلیسرول به عنوان سرما محافظ نفوذپذیر به‌طور گسترده در انجماد اسپرم گونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. از طرفی مطالعات نشان داد که در بسیاری از موجودات زنده تجمع اسیدهای آمینه سبب مقاومت سلول‌ها در دماهای پایین و شوک سرمایی می‌شوند (۷). به‌علاوه اسیدهای آمینه گلوتامین، گلایسین، پرولین، آلانین و هیستیدین در مایع منی یافت شدند و با موفقیت به عنوان مواد سرمامحافظ غیر قابل نفوذ در انجماد اسپرم گونه‌های متعددی از پستانداران مانند بز، قوچ و نریان استفاده شدند (۲، ۲۰ و ۲۲).

پوشش‌دار کردن اسپرم با رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ روش مناسبی جهت جداسازی سریع مایع منی بعد از اخذ نمونه است. در این روش مدت زمان مواجهه اسپرم و مایع منی از طریق جمع‌آوری اسپرم در لوله حاوی رقیق‌کننده تریس زرده تخم‌مرغ به حداقل می‌رسد و سبب بهبود ماندگاری اسپرم می‌شود (۳۰ و ۱۵).

تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی اثر هم‌زمان ال-گلوتامین و گلیسرول بر اسپرم پوشش‌دار شده قوچ صورت نگرفته است. بنابراین هدف پژوهش حاضر ارزیابی آثار غلظت‌های مختلف ال-گلوتامین و گلیسرول بر انجماد اسپرم پوشش‌دار شده قوچ تالشی است.

۱، ۲ و ۳ - به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
(*- نویسنده مسئول: (Email: roostaei@guilan.ac.ir

مواد و روش‌ها

حیوانات

این تحقیق با استفاده از چهار راس قوچ تالشی با متوسط وزن ۵±۵۰ کیلوگرم و میانگین سنی ۲/۵ تا ۴ سال و یک راس میش با وزن ۳۵ کیلوگرم و سن ۳ سال از اوایل تا اواسط پاییز۱۳۹۰ در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان انجام‌شد. روزانه ۱۳۰۰ g یونجه خشک، ۵۹۰ g جو، ۶۲۰ g کاه در دو وعده خوراک صبح و شب در اختیار دام‌ها قرارگرفت. در طول آزمایش نمک و آجر لیسیدنی (مکمل مواد معدنی) به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرارداده‌شد.

جمع‌آوری منی

نمونه‌های منی دوبار در هفته به فاصله دو روز و به کمک واژن مصنوعی استریل و حضور میش فحل جمع‌آوری‌شد. به منظور ایجاد فحلی دائمی در میش به صورت خلاصه، به مدت ۷ روز سیدر حاوی پروژسترون در واژن میش قرارداده‌شد. زمان برداشت سیدر ۱ mL وتاسترول[1] (استرادایول بنزونات ۲ mg/mL) به صورت عضلانی تزریق شد. برای ادامه فحلی هر ۴۸ ساعت ۰/۲ mL وتاسترول تزریق شد. جهت پوشش‌دارکردن اسپرم، انزال دوم در لوله حاوی تریس-فروکتوز [۳/۲۵۸ g تریس-(هیدروکسی متیل)- آمینومتان، ۱/۸۷۰ g اسید سیتریک مونوهیدرات، ۰/۹۳ g فروکتوز و ۰/۵ mL جنتامایسین (۵۰ mg/mL) در ۱۰۰ mL آب مقطر، pH=۷] و ۱۵ درصد زرده تخم‌مرغ (حجم/ حجم) جمع‌آوری و به وسیله فلاسک عایق حاوی آب^{o}C ۳۵ به آزمایشگاه منتقل‌شد. در مجموع تعداد ۲۰ انزال در ۵ نوبت جمع‌آوری‌شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها

در آزمایشگاه نمونه‌های منی از نظر تحرک پیش‌رونده و غلظت اسپرم بر اساس توضیحات زیر مورد بررسی قرارگرفتند. نمونه‌هایی که تحرک پیش‌رونده کمتر از۸۰ درصد و غلظت کمتر از $۲/۵ \times ۱۰^{۹}$ داشتند از آزمایش حذف‌شدند. نمونه‌های منی تجمیع و با قدرت ۷۰۰×g و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ مایع‌رویی حذف‌شد و رسوب بوسیله رقیق کننده تریس-گلوکز[تریس-(هیدروکسی‌متیل)-آمینومتان ۳/ ۶۳۴ گرم، اسیدسیتریک‌مونوهیدرات ۱/ ۹۹۶ گرم، زرده تخم مرغ ۱۵ درصد و جنتامایسین ۲۵۰mg در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر،pH=۷] تا غلظت $۱/۲ \times ۱۰^{۹}$ سلول/ mL رقیق شد. سپس نمونه ها به ۹ بخش مساوی تقسیم و به‌صورت ۱:۱ (حجم/حجم) با رقیق‌کننده تریس حاوی مقدار صفر، ۱۶۰ یا ۳۲۰ میلی‌مول ال-گلوتامین (AppliChem Germany) و ۶، ۱۰ یا ۱۴ درصد گلیسرول اضافه شد و در نهایت غلظت اسپرم ۶۰۰×۱۰^{۶}/ سلول/mL، گلیسرول به ۳، ۵ یا ۷ درصد و ال-گلوتامین به ۸۰ یا ۱۶۰ میلی‌مول رسید. نمونه‌ها در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی لیتری بسته بندی شدند و انتهای هر کدام با پودر پلی ونیل الکل مسدود شد. نمونه ها به دستگاه سردکننده (Test Chamber EG53AH, KATO, Japan) منتقل شد، با سرعت ۰/۲۵ ^{o}C/min تا ۴ ^{o}C سرد شدند و ۲ ساعت دیگر در همین دما برای رسیدن به تعادل نگهداری شدند (۱۰).

انجماد و یخ‌گشایی

پایوت‌ها به مدت ۱۳ دقیقه به فاصله ۴ سانتی متر از سطح نیتروژن مایع قرار داده شد و سپس در نیتروژن مایع غوطه ور شدند. نمونه ها به مدت دو هفته در تانک نیتروژن مایع ذخیره شدند. تمام مراحل فوق پنج مرتبه به صورت مجزا تکرار شد.

تعداد ۴ پایوت از هر تکرار (جمعا ۲۰ پایوت) از هر تیمار، به مدت ۲۰ ثانیه در ظرف آب ۳۷ ^{o}C قرار گرفتند و سپس به مدت ۹ ساعت در ۳۷ ^{o}C و ۵ درصد CO_2 نگهداری شدند. میزان تحرک، زنده مانی، سلامت غشا اسپرم و سلامت آکروزوم طی ساعات صفر، ۳ ، ۶ و ۹ پس ازیخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی اسپرم

ارزیابی تحرک نمونه‌ها، با قرار دادن ۵ میکرولیتر از منی روی لام با دما ۳۷ ^{o}C و گذاردن یک لامل بر روی آن انجام شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ اختلاف فاز با بزرگنمایی ۴۰۰ × و مجهز به صفحه گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تحرک اسپرم در ۵ میدان دید با اختلاف ۱۰ درصد، تخمین زده شد و در انتها میانگین حاصل از این تخمین‌ها به‌عنوان درصد تحرک پیش‌رونده ثبت شد (۱۰).

برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم از محلول هایپواسموتیک (سیترات سدیم دی‌هیدرات ۷۳۵ /۰ گرم و فروکتوز ۱/۳۵۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH=۷) استفاده شد (۱۹). ۵ µL منی با ۵۰ µL از محلول هایپواسموتیک مخلوط و درون انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ ^{o}C قرار داده شد. سپس ۲۰۰ عدد اسپرم حداقل در ۵ میدان دید زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ×۴۰۰ بررسی شد. اسپرم‌های دارای دم متورم به عنوان پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌های با دم بدون تورم به عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی ناسالم) در نظر گرفته شدند.

ارزیابی زنده‌مانی اسپرم با استفاده از رنگ هوخست بیس بنزامید H33258[2] (AppliChem, Germany) بر اساس روش de Leeuw و همکاران انجام شد (۱۳). بطور خلاصه حجم مساوی از نمونه و

1- Vetasterol

2- Hoechst bisbenzimide 33258 (H33258)

محلول ۲ درصد گلوتار آلدهید در بافر فسفات (۱۳۷ mMسدیم کلرید، ۲/۷mM پتاسیم کلرید، ۸/۱ mM سدیم هیدروژن فسفات، ۱/۵ mM پتاسیم هیدروژن فسفات، pH=۷) مخلوط و ثابت شد. ۲۰ µL از محلول رنگ هوخست بیس بنزآمید در ۱۵۴ mMسدیم کلرید و ۱۵ mM تری سدیم سیترات pH=۷) به نمونه اضافه شد و بعد از ۵ دقیقه در دمای اتاق ۵ µL از نمونه روی لام قرار داد شده و با گذاشتن لامل بر روی آن با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر UW با بزرگ‌نمایی۴۰۰×، ۲۰۰ عدد اسپرم در شرایط نور بسیار کم بررسی شد. اسپرم‌های با تلالوء آبی رنگ به عنوان پاسخ منفی (مرده) و اسپرم‌های بدون رنگ به عنوان پاسخ مثبت (زنده) در نظر گرفته شدند.

ارزیابی سلامت غشای آکروزوم با استفاده از رنگ آلکسافلور PNA-۴۸۸[1] (Molecular Probes, USA) و بر اساس روش واریسلی و همکاران انجام شد (۳۶). از هر نمونه روی لام گسترش تهیه شد. گسترش‌ها پس از خشک شدن با استفاده از متانول مطلق ثابت و در دمای اتاق خشک شدند. سپس رنگ آلکسافلور ۴۸۸ (۱۰µg/mL) روی نمونه‌ها ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دما ۳۷ ^{o}C، در محل تاریک و مرطوب نگهداری شدند. پس از این مرحله گسترش‌ها با استفاده از بافر فسفات (PBS) شسته شد. در شرایط نور بسیار کم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر WB با بزرگنمایی۴۰۰×، تعداد ۱۰۰ عدد اسپرم بررسی شد. آکروزوم‌های با رنگ یکدست، شفاف و با حاشیه مشخص به عنوان پاسخ مثبت (سالم) و آکروزوم‌های با رنگ پراکنده و با حاشیه نامشخص به عنوان پاسخ منفی (آسیب دیده) در نظر گرفته شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها به‌صورت آزمون فاکتوریل ۳×۳ در قالب طرح کاملا تصادفی با ۹ تیمار (۳ سطح ال-گلوتامین و ۳ سطح گلیسرول) و ۵ تکرار به صورت اندازه‌گیری‌های تکرار شده در زمان (۰، ۳، ۶ و ۹) مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده از انجام این پژوهش از نرم افزار SAS (۳۲) و از رویه Mixed استفاده شد. مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن و در سطح $P<۰/۰۵$ انجام شد.

نتایج

نتایج نشان داد اثر متقابل ال-گلوتامین و گلیسرول بعد از انجماد بر تحرک پیش‌رونده و سلامت آکروزوم اسپرم پوشش‌دار شده معنی‌دار بود. تحرک اسپرم در تیمارهای $G_{80}g_5$، G_0g_7 و $G_{80}g_7$ بیشتر از سایر تیمارها بود (تصویر ۱- الف، $P<۰/۰۵$). تحرک اسپرم در تیمار $G_{80}g_7$ بیشتر از $G_{80}g_5$ بود ($P<۰/۰۵$) و G_0g_7 با $G_{80}g_5$ و $G_{80}g_7$ تفاوتی نداشت. تحرک اسپرم در تیمار G_0g_7 از G_0g_5 و G_0g_3 بیشتر بود. سلامت آکروزوم در تیمار $G_{160}g_3$ کمترین مقدار بود (تصویر ۱- ب، $P<۰/۰۵$) و سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان ندادند.

اثر متقابل ال-گلوتامین و گلیسرول بر سلامت غشا پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم معنی دار نبود. اثر مستقل ال-گلوتامین و گلیسرول بر سلامت غشا پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم معنی دار بود (جدول ۱، $P<۰/۰۵$). بیشترین زنده‌مانی و سلامت غشا پلاسمایی اسپرم در مقدار ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین و ۷ درصد گلیسرول مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

کمترین و بیشترین مقدار تحرک پیشرونده، زنده مانی و سلامت غشا پلاسمایی اسپرم به ترتیب در زمان ۹ و صفر ساعت بعد از انکوباسیون مشاهده شد (جدول ۲، $P<۰/۰۵$). سلامت آکروزوم در ساعات ۳، ۶ و ۹ تفاوتی را نشان نداد، ولی کمتر از ساعت صفر بود ($P<۰/۰۵$).

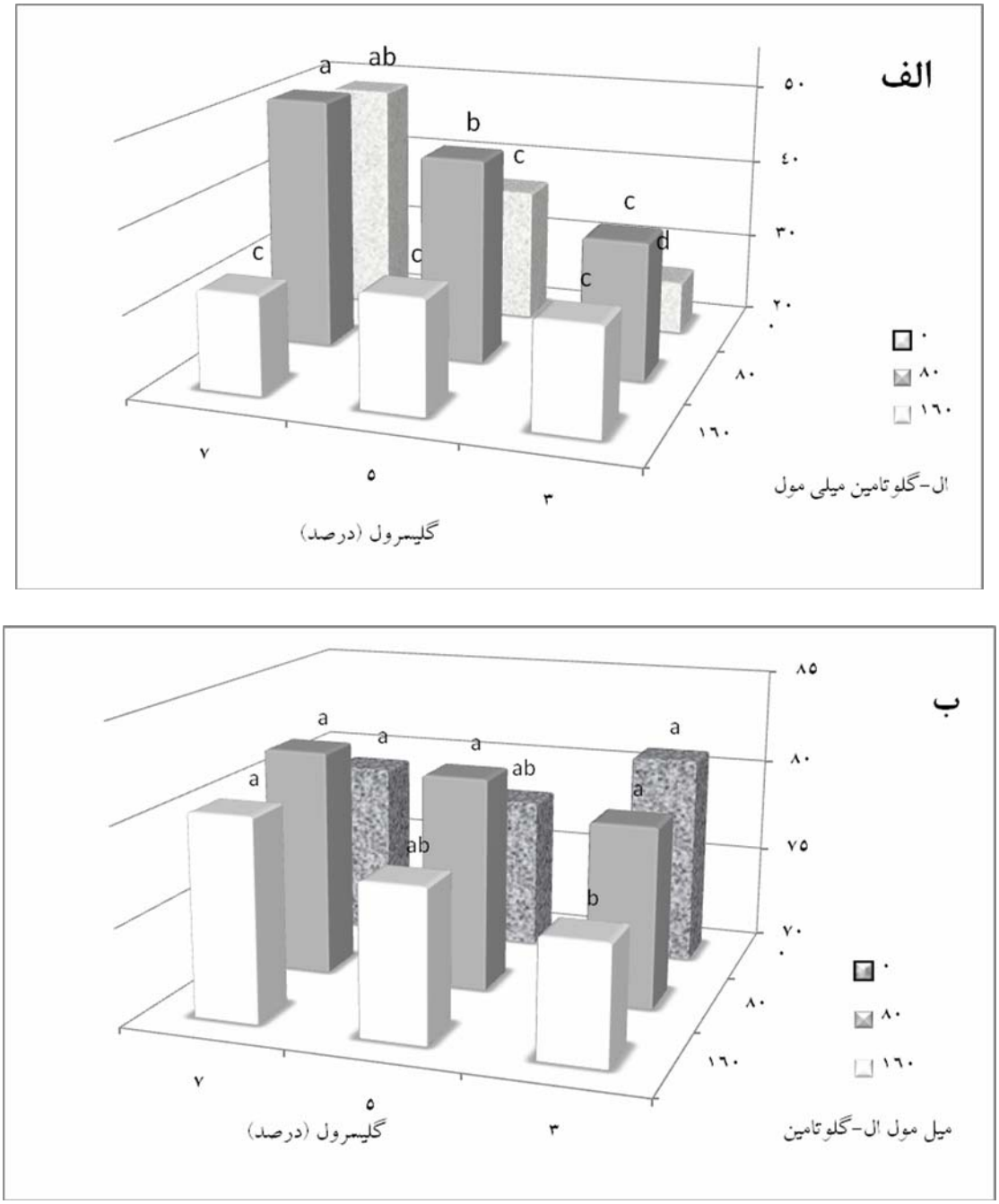
بحث

نتایج آزمایش نشان داد ال-گلوتامین در غلظت ۸۰ میلی‌مول باعث افزایش زنده‌مانی و سلامت غشا پلاسمایی اسپرم پوشش‌دار شده شد. گزارش شده است جهت انجماد منی گاو مقدار ۱۰ میلی‌مول ال-گلوتامین (۵)، منی سگ مقدار ۲۰ میلی‌مول ال-گلوتامین (۹)، منی گوزن مقدار ۲۵ میلی‌مول ال-گلوتامین (۲)، منی نریان ۴۰ میلی‌مول ال-گلوتامین (۳۴)، منی انسان ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین (۲۹) و منی الاغ ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین (۲۳) مناسب است. اسید آمینه ال-گلوتامین به‌واسطه داشتن خاصیت آنتی اکسیدان (۲)، بر عملکرد آنزیم کاتالاز اثر می‌گذارد و سبب حفاظت از آکسونم و میتوکندری اسپرم قوچ در روند انجماد می‌شود (۱۱). مشخص شده است که ال-گلوتامین با ایجاد لایه حفاظتی در اطراف اسپرم، مانع از هم گسیخته شدن غشا سلول در روند سردسازی و انجماد می شود (۵). بنابراین احتمالا بهبود عملکرد اسپرم پوشش‌دار شده قوچ در آزمایش حاضر نتیجه اثر آنتی اکسیدانی ال-گلوتامین و یا اثر محافظتی آن بر غشا اسپرم باشد.

نتایج نشان داد غلظت ۱۶۰ میلی‌مول ال-گلوتامین سبب کاهش تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشا پلاسمایی اسپرم پوشش‌دار شده طی روند انجماد و یخ‌گشایی شد. گزارش شده‌است که استفاده از ۱۲۰ میلی‌مول ال-گلوتامین باعث بروز اثر مخرب در اسپرم گاو (۱۴) و ۱۶۰ میلی‌مول ال-گلوتامین سبب کاهش تحرک اسپرم الاغ (۳۳) می‌شود. به‌علاوه غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میلی‌مول ال-گلوتامین با

1- Alexa Fluor-488 conjugated lectin PNA from Arachis hypogaea (peanut)

اعمال تنش اسمزی، اثر مخربی بر اسپرم نریان (۲۱) و انسان (۳۳) دارد. هم‌چنین آثار سمی آنتی‌اکسیدان‌ها در غلظت‌های بالا گزارش شده‌است (۸). با استفاده از ایزوتوپ رادیو اکتیو هیدروژن نشان داده شد که گلوتامین نمی‌تواند از غشای اسپرم عبور کند (۴). بنابراین به نظر می‌رسد افزایش غلظت ال-گلوتامین بالاتر از ۸۰ میلی‌مول در رقیق‌کننده‌های منی قوچ احتمالا با ایجاد آثار مضر اسمزی و سمی سبب کاهش ماندگاری اسپرم قوچ می‌شود.



شکل ۱- اثر متقابل گلیسرول و ال-گلوتامین بر تحرک پیش‌رونده (الف) و سلامت آکروزوم اسپرم (ب، LSMeans±SE). حروف غیر مشابه (a-c) نشان دهند تفاوت معنی دار است (P<۰/۰۵).

جدول ۱- اثر مستقل ال-گلوتامین و گلیسرول بعد از انجماد بر سلامت غشا پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم (LSMeans±SE)

متغیرها		سلامت غشا پلاسمایی(٪)	زنده‌مانی(٪)
ال-گلوتامین (میلی‌مول)	۰	۳۱/۵۵±۱/۲۴^{b}	۳۹/۸۳±۱/۸۱^{b}
	۸۰	۳۶/۷۱±۱/۱۶^{a}	۴۵/۲۸±۱/۵۷^{a}
	۱۶۰	۲۹/۶۱±۰/۹۵^{c}	۳۱/۱۶±۱/۴۳^{c}
گلیسرول (درصد)	۳	۳۲/۷۶±۱/۳۵^{a}	۳۶/۸±۱/۲۴^{b}
	۵	۳۰/۶۲±۰/۹۲^{b}	۳۷/۷±۱/۱^{b}
	۷	۳۴/۴۹±۱/۲^{a}	۴۱/۷۱±۱/۵۸^{a}

a-c میانگین های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P<۰/۰۵$)

جدول ۲- اثر زمان انکوباسیون روی تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت آکروزوم اسپرم طی انجماد (LSMeans±SE)

زمان(h)	تحرک(٪)	سلامت غشا پلاسمایی(٪)	زنده‌مانی(٪)	سلامت آکروزوم(٪)
۰	۴۹/۷۷±۱/۸۲^{a}	۴۱/۱۱±۱/۲۳^{a}	۴۹/۳۵±۲/۲۸^{a}	۸۳/۱۳±۰/۵۴^{a}
۳	۴۱/۱۳±۱/۶^{b}	۳۴/۹۲±۱/۰۹^{b}	۴۱±۲/۰۹^{b}	۷۹/۸۶±۰/۵^{b}
۶	۳۶/۵۷±۱/۷۷^{c}	۲۹/۵±۰/۸۷^{c}	۳۷/۹۵±۱/۹۷^{c}	۷۸/۱۵±۰/۷۳^{b}
۹	۲۵/۰۱±۱/۶۰^{d}	۲۴/۹۵±۰/۸۹^{d}	۳۴/۲۴±۲/۱۰^{d}	۷۶/۴۴±۰/۷۷^{b}

a-d میانگین های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P<۰/۰۵$)

در آزمایش حاضر غلظت ۷ درصد گلیسرول موجب بهبود زنده-مانی و سلامت غشا پلاسمایی اسپرم پوشش‌دار شده پس از یخ‌گشایی شد. گلیسرول با جایگزین شدن مولکول‌های آب داخل سلول، تشکیل کریستال‌های مخرب یخ را در درون سلول به تعویق می‌اندازد (۲۸). از طرفی گزارش شده‌است که گلیسرول می‌تواند آنزیم ATP_{ase} را مهار کند و باعث اختلال یونی و بروز آثار سمی بر سلول شود (۲۴). از سوی دیگر مشخص شده است در هنگام استفاده از رقیق کننده منی بر پایه لیسیتن سویا افزودن ۷ درصد گلیسرول در مقایسه با ۵ درصد گلیسرول جهت انجماد منی قوچ ارجح است (۱۸). به‌علاوه استفاده از ۵ درصد گلیسرول در مقایسه با ۴ یا ۳ درصد گلیسرول در رقیق‌کننده تریس جهت انجماد منی بز مناسب‌تر است (۶). مشخص شده‌است استفاده از ۶ درصد گلیسرول در انجماد منی بز سبب بهبود تحرک اسپرم پس از یخ گشایی می‌شود (۲۲). همچنین غلظت ۱۰-۸ درصد گلیسرول در مقایسه با غلظت ۶-۴ درصد گلیسرول اثر حفاظتی بیشتر بر منی خوک در روند انجماد دارد (۱۲). استفاده از ۸ درصد گلیسرول سبب بهبود تحرک و سلامتی آکروزوم اسپرم سگ بعد از انجماد می‌شود (۲۷). به اثبات رسیده است جهت انجماد منی بوفالو ۷-۶ درصد گلیسرول (۱۷) و منی انسان ۶ درصد گلیسرول (۳) مناسب است. گلیسرول با نفوذ به درون غشا سلول اسپرم، باعث بهبود زنده-مانی و باروری اسپرم بعد از انجماد و یخ گشایی می‌شود (۱). بنابراین غلظت ۷ درصد گلیسرول نه تنها اثر سمی بر اسپرم پوشش‌دار شده ندارد بلکه سبب بهبود ماندگاری اسپرم منجمد می‌شود.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد با افزایش زمان انکوباسیون در دمای ۳۷ ^{o}C تمام فراسنجه‌های مورد بررسی دچار کاهش می‌شوند. مشخص شده است که با افزایش زمان انکوباسیون، نفوذپذیری غشاپلاسمایی اسپرم افزایش یافته و متابولیسم سلول و تولید ATP در میتوکندری سلول‌ها کاهش می‌یابد که در نهایت موجب افزایش سرعت فرآیند پیری و مرگ برنامه‌ریزی[1] شده سلول می‌شود (۲۸). همچنین کاهش ATP سبب اختلال در عملکرد غشا خواهد شد (۳۱). ثابت شده است که انکوباسیون اسپرم به مدت طولانی بطور قابل ملاحظه‌ای تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشا آکروزوم اسپرم و باروری را کاهش می‌دهد (۲۶).

نتایج نشان داد اثر متقابل ال-گلوتامین و گلیسرول بر تحرک پیش‌رونده و سلامت آکروزوم اسپرم پوشش‌دار شده معنی‌دار بود. همچنین، ۳ درصد گلیسرول نتوانست سبب حفاظت اسپرم پوشش‌دار شده در روند انجماد و یخ‌گشایی شود ولی افزودن ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین باعث بهبود ماندگاری اسپرم شد. از طرفی بهترین ترکیب برای انجماد اسپرم پوشش‌دار شده ۷ درصد گلیسرول و ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین بود. در روند انجماد، گلیسرول با آب‌گیری سلول‌ها مانع از آسیب‌های ناشی از کریستال‌های یخ در داخل سلول می‌شود (۲۵). به‌علاوه ال-گلوتامین با ایجاد پیوندهای الکترواستاتیکی با فسفولیپیدهای غشا قادر است یک لایه حفاظتی در خارج سلول ایجاد نماید (۲۲). گزارش شده است ترکیب ال-گلوتامین و گلیسرول در انجماد منی خوک (۱۴) و همچنین ترکیب رافینوز یا ساکاروز با ال-

1-Apoptpsis

گلوتامین در انجماد منی گاو (۳۵) دارای آثار مطلوبی است. اثر هم-افزایی بین ال-گلوتامین و گلیسرول در حفاظت اسپرم خوک طی روند انجماد مشخص شده است (۱۴). از آن‌جایی که گلیسرول نیز یک قند الکلی است لذا می‌تواند از طریق اثر هم‌افزایی با گلوتامین موجب کاهش اثرات مضر انجماد شود (۳۵). بنابراین استفاده از ۷ درصد گلیسرول و ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین سبب بهبود ماندگاری اسپرم منجمد قوچ می‌شود.

نتیجه گیری

افزودن ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین سبب بهبود ماندگاری اسپرم پوشش‌دار شده طی روند انجماد و یخ‌گشایی می‌شود. به‌علاوه جهت انجماد اسپرم پوشش‌دار شده قوچ ۷ درصد گلیسرول و ۸۰ میلی‌مول ال-گلوتامین توصیه می‌شود.

منابع

۱- فروزانفر، م.، م. فضیلتی، س. م. حسینی، ف. مولوی، م. حاجیان، س. صالحی، ا. ربیعی و م. ح. نصر اصفهانی. ۱۳۸۶. بررسی غلظت‌های مختلف گلیسرول و زرده تخم‌مرغ بر تحرک اسپرم قوچ نژاد بختیاری پس از انجماد- ذوب مایع منی. مجله علمی- پژوهشی علوم تشریح ایران، ۱۸: ۲۵- ۱۷.

2- Ali Al Ahmad, M., G. Chatagnon, L. Amirat-Briand, M. Moussa, D. Tainturier, M. Anton, and F. Fieni. 2008. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. Reprod. Domest. Anim. 43: 429-436.

3- Alvarez, J. G. and B. T. Storey. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. J. Androl. 13: 232–241.

4- Amann, R. P. and B. W. Pickett. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J. Equine Vet. Sci. 7: 145-73

5- Amirat-Briand, L., D. Bencharif, O. Vera-Munoz, H. Bel Hadj Ali, S. Destrumelle, S. Desherces, E. Schmidt, M. Anton, and D. Tainturier. 2009. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: preliminary results. Theriogenology. 71: 1209-1214

6- Amoah, E. A. and S. Gelaye. 1997. Biotechnological advances in goat reproduction. J. Anim. Sci. 75: 578-585.

7- Anchordoguy, T., J. F. Carpenter, S. H. Loomis and J. H. Crowe. 1988. Mechanisms of interaction of amino acids with phospholipids bilayers during freezing. Biochim. Biophys. Acta. 946: 299-306

8- Aurich, C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 89: 65-75.

9- Bencharif, D., L. Amirat, O. Pascal, M. Anton, E. Schmitt, S. Desherces, G. Delhomme, M. L. Langlois, P. Barriere, M. Larrat and D. Tainturier. 2010. The advantages of combining LDL (low density lipoproteins) with glutamine for the cryopreservation of canine semen. Reprod. Domest. Anim. 45: 189-200

10- Bucak, M. N., A. Atessahin and A. Yüce. 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stressparameters on ram semen after the freeze-thawing. Small Rumin. Res. 75: 128-134.

11- Bucak, M. N., P. B. Tuncer, S. Sarıözkan and P. A. Ulutaş. 2009. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. Small Ruminant Res. 81: 13-17.

12- Corcuera, B., P. Marigorta, A. Sagüés, F. Saiz-Cidoncha and J. Pérez-Gutiérrez. 2007. Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa. Theriogenology. 67: 1150-1157

13- De Leeuw, A. M., J. H. den Daas and H. Woelders. 1991. The fix vital stain method simultaneous determination of viability and acrosomal and status of bovine spermatozoa. J. Androl. 12: 112-118.

14- De Mercado, E., M. Hernandez, E. Sanz, A. Rodriguez, E. Gomez, J. M. Vazquez, E. A. Martinez and J. Roca. 2009. Evaluation of L-Glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 115: 149-157.

15- De Pauw, I. M., A. Van Soom, D. Maes, S. Verberckmoes and A. De Kruif. 2003. Effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of in vitro stored bovine spermatozoa. Theriogenology. 59: 1109-1122

16- Domínguez, M. P., A. Falcinelli, F. Hozbor, E. Sánchez, A. Cesari and R. H. Alberio. 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. Theriogenology. 69: 564-573.

17- Fabbrocini, A., C. Del Sorbo, G. Fasano and G. Sansone. 2000. Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of Mediterranean buffalo (B. bubalis) spermatozoa. Theriogenology. 54: 193-207

18- Forouzanfar, M., M. Sharafi, S. M. Hosseini, S. O. Stadhosseini, M. Hajin, L. Hosseini, P. Abedi, N. Nili, H. Rahimani, and M. H. Nasre-Esfahani. 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. Theriogenology. 73: 480-487

19- Jeyendran, R. S., H. H. Van Der Ven and L. J. Zaneveld. 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. Arch. Andrology. 29: 105-116.
20- Khlifaoui, M., I. Battut, J. F. Bruyas, G. Chatagnon, A. Trimeche, and D. Tainturier. 2005. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. Theriogenology. 63: 138-149.
21- Kruuv, J. and D. J. Glofcheski. 1990. Survival of mammalian cells following multiple freeze-thaw cycles. II. Independence of cryoprotection using glutamine with dimethyl sulfoxide, hydroxyethyl starch, propylene glycol or glycerol. Cryo-lett. 11: 215-226.
22- Kundu, C., K. Das and G. Majumder. 2001. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. Cryobiology. 42: 21-27.
23- Li, Y., W. Si, X. Zhang, A. Dinnyes, and W. Ji. 2003. Effect of amino acids on cryopreservation of cynomologus monkey (Macaca fascicularis) sperm. Am. J. Primatol. 59: 159–65.
24- Meryman, H. T. 1966. Review of biological freezing. Cryobiology (Ed, Meryman, H.T.) Academic Press, London, pp. 1-114
25- Morrier, A., F. Castonguay and J. Bailey. 2002. Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. Can. J. Anim. Sci. 82: 347-356.
26- Mortimer, D. 1994. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. Reprod. Fert. Develop. 6: 25-31.
27- Pena, A. I., F. Barrior, L. A. Quintela and P. G. Herradon. 1998. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. Therigenology. 50: 163-173.
28- Purdy, P. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Res. 63: 215-225
29- Renard, P., G. Grizard, J. F. Griveau, B. Sion, D. Boucher and D. Le Lannou. 1996. Improvement of motility and fertilization potential of post-thaw human sperm using amino-acids. Cryobiology. 33: 311–9.
30- Roostaei-Ali Mehr, M. and F. Sharafi 2013. Influence ofsperm coating and seminal plasma on frozen-thawed spermatozoa. I.J.V.R. In press
31- Salamon, S. and W. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 62: 77-111.
32- Sas institute inc. 2002. Sas users guide: statistics, version 9.2 edition, sas inc, cary, nc, usa
33- Trimeche, A., P. Renard, D. Le Lannou, P. Barriere and D. Tainturier. 1996. Improvement of motility of post-thaw poitou jackass sperm using glutamine. Theriogenology. 45: 1015–27.
34- Trimeche A., J. M. Yvon, M. Vidament, E. Palmer and M. Magistrini. 1999. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. Theriogenology. 52: 181–91.
35- Tuncer, P. B., S. Sarıözkan, M. N. Bucak, P. A. Ulutaş, P. P. Akalın, S. Büyükleblebici and F. Canturk. 2011. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. Theriogenology. 75: 1459-1465.
36- Varisly, O., C. Uguz, C. Agca and Y. Agca. 2009. Motility and acrosomal integrity comparision between electroejaculated and epididimal ram sperm after exposure to a range of anisosmotic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. Anim. Reprod. Sci. 110: 256-268.