(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124850

اثر تغییر سطوح گلوکز و فروکتوز در ترکیب رقیق‌کننده بر پایه تریس بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم قوچ نگه‌داری شده در دمای بدن

- **مهران اجرایی**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
- **فرهاد صمدیان***: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
- **فرهاد فرخی‌اردبیلی**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- **رضا نقی‌ها**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ١٣٩٨ تاریخ پذیرش: شهریور ١٣٩٨

چکیده

نگه‌داری منی به‌صورت مایع به‌جای نگه‌داری به‌صورت یخ‌زده، با توجه به کاهش هزینه‌های آماده‌سازی و حمل و نقل مورد استقبال بیش‌تری قرار می‌گیرد. هدف پژوهش حاضر چنین بود که ضمن حفظ اسمولاریته بهینه (٣٣٠ میلی‌اسمول) در یک رقیق‌کننده بر پایه تریس-زرده تخم مرغ (EYT)، تأثیر نوع قند (گلوکز و فروکتوز) و تغییر غلظت قند بر نگه‌داری اسپرم قوچ در شرایط انکوباسیون در دمای بدن (٣٧ درجه سانتی‌گراد) مورد بررسی قرار گیرد. رقیق‌کننده‌هایی با نسبت‌های ترکیبی قند به تریس (٣٠ به ٣٠٠ و ٢١٠ به ١٠٠ میلی‌مولاری قند به تریس) با دو قند مختلف (گلوکز و فروکتوز) ساخته شد و با یک رقیق‌کننده استانداری که برای انجماد اسپرم قوچ به‌کار می‌رفت مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بدون توجه به نوع رقیق‌کننده، فراسنجه‌های حرکتی اسپرم به‌طور معنی‌داری بعد از دو ساعت از انکوباسیون کاهش یافت. اثر متقابل تیمار در زمان معنی‌دار نبود و درصد جنبایی کل و پیش‌رونده نیز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت. با این‌حال، برخی از فراسنجه‌های حرکتی نمونه‌های منی انکوبه شده ازجمله حرکت خطی اسپرم‌ها (LIN) و شاخص‌های سرعت حرکت اسپرمی (VAP و VSL) با افزودن غلظت قند در رقیق‌کننده‌ها بهبود یافت. نتیجه‌گیری می‌شود که افزایش نسبت قند به تریس در رقیق‌کننده‌های EYT ممکن است موجب بهبود شاخص‌های حرکتی اسپرم‌ها در دمای بدن شود. مقاومت اسپرم‌ها در دمای بدن می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای باروری گامت‌های نر در داخل دستگاه تناسلی ماده درنظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: منی مایع قوچ، رقیق‌کننده، نسبت قند به تریس، انکوباسیون، مونوساکاریدها

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Farhad.samadian@gmail.com

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124850

مقدمه

رقیق‌کننده‌ها به‌عنوان حفاظت‌کننده از اسپرم در طی سردسازی، جلوگیری‌کننده از تغییرات pH و تأمین‌کننده مواد مغذی برای سوخت و ساز اسپرم عمل می‌کنند (Leboeuf و همکاران، ۲۰۰۰). با این‌حال، با وجود مطالعات بسیار بر روی رقیق‌کننده‌های مختلف، تاکنون بهترین محیط برای نگه‌داری اسپرم گزارش نشده است و بسته به نوع گونه و روش نگه‌داری (مایع یا یخ‌زده) نوع رقیق‌کننده متفاوت خواهد بود. گوسفند حیوانی است که اسپرم آن به‌دلیل بالا بودن محتوای اسیدهای چرب غیراشباع، حساسیت بالایی به پروکسیداسیون لیپیدی و تنش‌های حرارتی دارد (Baumber و همکاران، ۲۰۰۰). برای تلقیح مصنوعی گوسفند می‌توان هم از اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده و هم از منی نگه‌داری شده به‌صورت مایع استفاده نمود، ولی با توجه به اثرات زیان‌بار فرایند انجماد بر باروری اسپرم (Isachenko، ۲۰۰۳) و هم‌چنین به‌دلیل ضرورت استفاده از ترکیب سمی گلیسرول در ترکیب رقیق‌کننده‌ها در هنگام نگه‌داری انجمادی و اثرات زیان‌بار آن بر باروری اسپرم (Meyers، ۲۰۱۲)، تلقیح دام‌های نشخوارکننده کوچک با اسپرم مایع ترجیح داده می‌شود (Leboeuf و همکاران، ۲۰۰۰). هم‌چنین در صورت طراحی برنامه‌های اصلاح نژادی برای دام‌های کشور، با توجه به این که هم‌زمان‌سازی فحلی بین میش‌ها در چنین طرح‌هایی اجتناب‌ناپذیر خواهد بود استفاده از اسپرم مایع در اولویت قرار می‌گیرد، زیرا به‌دلایلی هم‌چون کم بودن تعداد اسپرم زنده در منی منجمد، کم بودن دوره زنده‌مانی اسپرم‌های منجمد در دستگاه تناسلی ماده، آسیب‌های غشایی تحمیل شده به سلول اسپرم در طی انجماد-یخ‌گشایی، توانایی اندک اسپرم‌های منجمد در چسباندن خود به اپیتلیوم مخازن اسپرمی در دستگاه تناسلی ماده و نرخ انتقال پایین اسپرم در دستگاه تناسلی دام ماده به‌دلیل تغییرات هورمونی، باروری با اسپرم یخ‌زده پایین خواهد بود (Pursel و همکاران، ۱۹۷۸؛ Hawk، ۱۹۸۳). در هنگام ذخیره‌سازی به‌صورت مایع، متابولیسم از نوع هوازی است و در نتیجه، نیاز به اکسیژن، تهویه کافی و منابع قابل متابولیسم در محیط اسپرمی وجود دارد. افزایش میزان مواد قندی در محیط‌های IVF احتمالاً می‌تواند در افزایش موفقیت لقاح نقش داشته باشد، به‌طوری که گزارش شده است فقدان قندهای قابل سوخت و ساز در محیط کشت، میزان لقاح برون‌تنی را کاهش می‌دهد (Quinn، ۱۹۹۵). هم‌چنین مشخص شده است که مونوساکاریدها در مقایسه با دی‌ساکاریدها در محیط رقیق‌کننده، منجر به افزایش جنبایی پیشرونده اسپرم قوچ (Molinia و همکاران، ۱۹۹۴a) بز (Naing و همکاران، ۲۰۱۰) و سگ (Yildiz و همکاران، ۲۰۰۰) می‌شوند. در هنگام گرم‌خانه‌گذاریِ اسپرم، همراه با کاهش میزان گلوکز سلولی الگوهای حرکتی اسپرم دچار تغییر می‌شوند (Scott و همکاران، ۱۹۶۲). بنابراین با توجه به اثر مشخص قندها در تأمین انرژی و تحریک جنبایی اسپرم‌ها (Mujica و همکاران، ۱۹۹۱؛ Panglowhapan و همکاران، ۲۰۰۴) و با توجه به تغییر ویسکوزیته محیط در اثر افزودن قندها و اثر مشخص ویسکوزیته بر تحرک اسپرم (Parker و McDaniel، ۲۰۰۶)، تغییر سطوح قند در محیط رقیق‌کننده به‌منظور بررسی تأثیر آن بر صفات حرکتی اسپرم شایان بررسی است. علاوه بر این، پایین آوردن دما از ۳۷ درجه سانتی‌گراد به ۵ درجه سانتی‌گراد در هنگام ذخیره‌سازی اسپرم به‌صورت مایع، منجر به تغییر فاز و تجمع اجزای غشایی اسپرم شده و در نتیجه منجر به کاهش باروری خواهد شد (Quin و همکاران، ۱۹۸۰؛ Holt و North، ۱۹۸۴). بنابراین هدف از این پژوهش چنین بود که ضمن اجتناب از تأثیر منفی کاستن از دمای اسپرم در طی نگه‌داری کوتاه‌مدت، تأثیر مونوساکاریدها (گلوکز و فروکتوز) بر صفات حرکتی اسپرم قوچ بررسی بیش‌تری گردد.

مواد و روش‌ها

یک روز قبل از اسپرم‌گیری، رقیق‌کننده‌های آزمایشی که همگی بر پایه تریس و حاوی ۱۴ درصد زرده تخم‌مرغ بودند در آزمایشگاه گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه ساخته شدند. تیمارها عبارت بودند از: ۱- استاندارد: [تریس (۳/۶۳ گرم)، اسیدسیتریک (۱/۹۹ گرم)، فروکتوز (۰/۵ گرم)، ۱۰۰/۰۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین با آب دو بار تقطیر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و سپس ۸۶ میلی‌لیتر از آن با ۱۴ سی‌سی زرده تخم‌مرغ مخلوط گردید (Evans و Maxwell، ۱۹۷۸). ۲- تیمار G30: نسبت ۳۰ به ۳۰۰ میلی‌مولاری گلوکز به تریس. ۳- تیمار F30: نسبت ۳۰ به ۳۰۰ میلی‌مولاری فروکتوز به تریس ۴- تیمار G210: نسبت ۲۱۰ به ۱۰۰ میلی‌مولاری گلوکز به تریس. ۵- تیمار F210: نسبت ۲۱۰ به ۱۰۰ میلی‌مولاری فروکتوز به تریس. انتخاب نسبت بین قند به تریس در رقیق‌کننده‌های ۲ تا ۵، بر پایه بهترین نسبت‌های این مونوساکاریدها به تریس بود که از نتایج مطالعه قبلی (Molinia و همکاران، ۱۹۹۴b) مستخرج شد. این محققین ایزوتونیک بودن رقیق‌کننده‌ها با نسبت‌های به‌کار رفته از تریس به قند (با اسمولاریته ۳۳۰ میلی‌اسمول) را نشان داده بودند. قبل از افزودن به منی، pH هر کدام از رقیق‌کننده‌ها با اسید سیتریک بر روی ۶/۹ تا ۷/۱ تنظیم گردید. اسپرم‌گیری از تعداد چهار رأس قوچ بالغ اکوتیپ قزل دو بار در هفته و با استفاده از مهبل مصنوعی صورت گرفت. نمونه‌های منی بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و در داخل بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از ارزیابی‌های اولیه، نمونه‌های منی با ویژگی‌های مطلوب (جنبایی حداقل ۹۰ درصد، جنبایی پیشرونده بالای ۷۰ درصد، حجم ۰/۷۵ میلی‌لیتر و غلظت بیش از ۳×۱۰^{۹} اسپرم در میلی‌لیتر) با همدیگر مخلوط شدند. پنج

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124850

میکرولیتر از مخلوط منی به یک میلی‌لیتر از محیط‌های رقیق‌کننده از پیش آماده شده (تیمارهای آزمایشی) افزوده شد و سپس لوله‌ها تا زمان ارزیابی در داخل بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. غلظت اسپرم در هر نمونه تیماری با استفاده از لام هماسیتومتر تعیین شد و در مرحله بعد با افزودن بیش‌تر رقیق‌کننده به $10^6 \times 25$ اسپرم در هر میلی‌لیتر رسانده شد. پس از اتمام رقیق‌سازی، همه نمونه‌ها به سه زیرنمونه تقسیم شدند و تا زمان اتمام آزمایش در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری در داخل بن‌ماری (۳۷ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شدند. در مرحله بعد از همه میکروتیوب‌ها با سمپلر نمونه‌گیری شد و با ارزیابی و کسب اطمینان از جنبایی اسپرم‌ها، وارد آزمایش شدند. بعد از این ارزیابی اولیه، هر نیم‌ساعت یک‌بار (دقیقه ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰) نمونه‌گیری و ارزیابی منی تکرار شد. به‌طورکلی، کل فرایند سه مرتبه و در خلال دو هفته تکرار گردید. همه ارزیابی‌های حرکتی اسپرم توسط میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed LX400) مجهز به صفحه گرم کن و دوربین فیلم‌برداری (M-Shot, MD-50T) متصل به رایانه و با نرم‌افزار کاسا (CASA Sperm 3.2 VideoTest, Russia) صورت گرفت. برای افزایش دقت، از تمامی تکرارها دو لام و از هر لام حداقل چهار فیلد و در کل حداقل ۱۰۰ اسپرم فیلم‌برداری شد و تحلیل بعدی با نرم‌افزار CASA صورت گرفت. داده‌های آزمایشی در قالب طرح کرت‌های خورد شده تحت آنالیز واریانس قرار گرفت، به‌طوری‌که نوع رقیق‌کننده به‌عنوان پلات اصلی و زمان انکوباسیون به‌عنوان کرت کوچک‌تر انتخاب شد. اثر تیمار (نوع رقیق‌کننده)، زمان و اثر متقابل تیمار در زمان در مدل گنجانده شد. همه تحلیل‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ صورت گرفت و P<۰/۰۵ به‌عنوان معنی‌دار آماری درنظر گرفته شد.

نتایج

اثر متقابل تیمار در زمان برای صفات CASA معنی‌دار نبود که با نتایج Molinia و همکاران (۱۹۹۴b) در انطباق بود که گزارش کردند اثر متقابل زمان انکوباسیون و نوع رقیق‌کننده (نسبت‌های مختلف تریس به گلوکز) معنی‌دار نبود. اثر کلی رقیق‌کننده بر درصد جنبایی کل (TM) و درصد جنبایی پیشرونده (PM) اسپرم‌ها معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) (جدول ۱).

جدول ۱: اثر رقیق‌کننده‌های مختلف بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم (میانگین±SEM) ارزیابی شده با سامانه آنالیز کامپیوتری

فراسنجه	فروکتوز به تریس ۱۰۰:۲۱۰ میلی‌مولار (F210)	گلوکز به تریس ۱۰۰:۲۱۰ میلی‌مولار (G210)	فروکتور به تریس ۳۰۰:۳۰ میلی‌مولار (F30)	گلوکز به تریس ۳۰۰:۳۰ میلی‌مولار (G30)	رقیق‌کننده استاندارد
جنبایی کل (TM) (٪)	۸۱/۰۲±۱۳/۶۷	۷۴/۱۷±۱۴/۹۰	۸۵/۱۲±۱۰/۶۵	۹۴/۵۸±۸/۸۰	۹۰/۲۸±۹/۶۶
جنبایی پیشرونده (PM) (٪)	۴۰/۹۳±۱۱/۲۷	۴۹/۲۲±۱۱/۷۱	۳۹/۰۰±۷/۴۳	۴۰/۰۳±۷/۳۲	۴۸/۰۳±۸/۷۸
جنبایی غیرپیشرونده (NPM) (٪)	a۹/۹۳±۲/۷۶	a۸/۹۵±۲/۲۶	ab۱۳/۵۵±۴/۶۲	ab۱۵/۶۵±۴/۴۶	b۲۶/۳۰±۶/۴۳
اسپرم‌هایی با جنبایی درجا (LM) (٪)	ab۲۱/۴۲±۵/۰۵	a۱۶/۰۳±۳/۹۱	c۴۳/۵۵±۷/۲۵	bc۳۸/۸۷±۹/۱۹	a۱۹/۲۸±۴/۷۳
میانگین سرعت اسپرم‌ها در مسیر منحنی‌الخط (VAP) (µm/s)	b۴۶/۳۹±۷/۶۸	b۴۷/۲۹±۸/۷۲	a۲۰/۱۶±۶/۹۸	ab۲۸/۰۴±۹/۰۲	b۴۴/۳۸±۷/۱۱
سرعت مستقیم‌الخط بودن مسیر حرکت از مبدأ به مقصد (VSL) (µm/s)	b۴۰/۳۶±۵/۷۲	b۴۱/۴۳±۶/۰۴	a۱۵/۰۳±۵/۷۲	ab۲۲/۲۵±۶/۶۳	ab۳۲/۶۹±۵/۴۵
معیار مستقیم‌الخط بودن حرکت (STR) (٪)	bc۷۹/۵۰±۸/۸۳	c۸۰/۷۰±۱۰/۰۵	a۶۷/۳۰±۹/۰۵	ab۷۳/۱۰±۷/۲۵	a۷۲/۳۰±۵/۳۰
میزان خطی بودن حرکت (LIN) (٪)	c۴۱/۵۰±۱/۰۱	bc۳۹/۷۰±۱/۹۸	a۲۴/۲۰±۲/۴۳	a۶۰/۳۰±۱/۹۱	ab۳۲/۳۰±۱/۸۳
میزان حرکات تند و زیگزاگی اسپرم حول مسیر میانگین (WOB) (٪)	b۴۸/۰۰±۳/۶۰	b۴۵/۲۰±۳/۹۰	a۳۳/۸۰±۳/۰۵	ab۳۸/۳۰±۳/۱۰	ab۴۲/۵۰±۴/۲۰
فرکانس حرکات جانبی سر اسپرم (BCF) (Hz)	c۱۹/۸۸±۳/۱۰	bc۱۸/۶۲±۲/۹۳	a۱۵/۲۱±۳/۲۲	a۱۵/۴۳±۳/۰۴	b۱۷/۷۷±۲/۹۸

میانگین‌هایی با حروف لاتین بالانویس متفاوت در هر ردیف، اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اثر کلی رقیق‌کننده بر درصد اسپرم‌های با جنبایی غیرپیشرونده (NPM) (P=۰/۰۵) و درصد اسپرم‌های با جنبایی درجا (LM) (P=۰/۰۱)، سرعت مستقیم‌الخط بودن مسیر حرکت از مبدأ به مقصد (VSL) (P=۰/۰۲)، میزان خطی بودن حرکت (LIN) (P=۰/۰۰۱)، میانگین سرعت اسپرم‌ها در مسیر منحنی‌الخط (VAP) (P=۰/۰۴)، فرکانس حرکات جانبی سر اسپرم (BCF) (P=۰/۰۰۱) و معیار مستقیم‌الخط بودن حرکت (STR) (P=۰/۰۰۱) و بر شاخص میزان حرکات تند و زیگزاگی اسپرم حول مسیر میانگین (WOB) (P=۰/۰۲) معنی‌دار بود (جدول ۱). درصد NPM در رقیق‌کننده‌های G210 و F210 در مقایسه با رقیق‌کننده استاندارد، به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود (P<۰/۰۵). بیش‌ترین درصد حرکت خطی (LIN) نیز مربوط به تیمارهای G210 و F210 بود که در مقایسه با تیمارهای G30 و F30 به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. تعداد اسپرم‌های با حرکت درجا (LM) در رقیق‌کننده‌های G30 و F30 به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124850

رقیق‌کننده استاندارد و G210 بود، ولی درصد LM بین تیمارهای G210 و F210 با استاندارد اختلاف‌معنی‌داری نداشت. میانگین سرعت اسپرم‌ها در مسیر منحنی‌الخط (VAP) در تیمارهای G210 و F210 در مقایسه با تیمار F30 به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. پایین‌ترین سرعت مستقیم‌الخط بودن مسیر حرکت از مبدأ به مقصد (VSL) نیز مربوط به تیمار F30 بود، به‌طوری‌که در مقایسه با این فراسنجه در تیمارهای G210 و F210 به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود. بنابراین تیمار G210 با توجه به کم بودن درصد اسپرم با حرکت درجا، پایین بودن درصد اسپرم‌های با حرکت غیرپیشرنده و بهتر بودن از نظر حرکت خطی (LIN و STR) برای ذخیره‌سازی اسپرم در دمای گرم قابل توصیه‌تر است. نتایج حاضر نشان داد که تا دو ساعت نگه‌داری در دمای اتاق، هیچ‌کدام از فراسنجه‌های حرکتی اسپرمی دچار کاهش معنی‌داری نشدند، ولی بعد از آن برخی از صفات حرکتی اسپرم به یک‌باره دچار کاهش شدیدی شدند (جدول ۲). با توجه به جدول ۲ به‌نظر می‌رسد که‌میانگین سرعت اسپرم‌ها در مسیرمنحنی(VAP)و دامنه جابه‌جایی جانبی سر اسپرم‌ها (ALH) زودتر از جنبایی و جنبایی پیشرونده اسپرم‌ها در طی انکوباسیون روند کاهشی خود را آغاز می‌نمایند.

جدول ۲: اثر اصلی انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (میانگین±SEM) بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم ارزیابی شده با CASA

فراسنجه	دقیقه صفر انکوباسیون	دقیقه ۳۰ انکوباسیون	دقیقه ۶۰ انکوباسیون	دقیقه ۹۰ انکوباسیون	دقیقه ۱۲۰ انکوباسیون	دقیقه ۱۵۰ انکوباسیون
جنبایی کل	۹۷/۵۶±۶/۰۲^{a}	۹۴/۴۶±۵/۱۹^{a}	۹۰/۳۰±۷/۶۶^{a}	۸۹/۵۰±۹/۰۶^{a}	۸۸/۹۴±۸/۳۲^{a}	۴۴/۶۲±۶/۶۹^{b}
جنبایی پیشرونده (٪)	۵۵/۰۲±۷/۱۵^{a}	۴۸/۱۶±۸/۰۵^{a}	۴۷/۹۶±۸/۳۰^{a}	۴۴/۶۲±۷/۵۲^{a}	۴۴/۱۴±۹/۲۸^{a}	۱۳/۱۶±۶/۱۲^{b}
سرعت در مسیر منحنی (VCL) (µm/s)	۹۳/۹۴±۱۸/۰^{a}	۹۳/۶۲±۱۴/۰^{a}	۹۰/۱۷±۱۹/۰^{a}	۸۸/۰۸±۱۳/۰^{a}	۷۴/۱۱±۱۹/۰^{a}	۳۴/۱۹±۱۳/۰^{b}
میانگین سرعت اسپرم‌ها در مسیر منحنی‌الخط (VAP) (µm/s)	۴۶/۲۸±۹/۱۱^{a}	۴۶/۰۱±۸/۶۵^{a}	۴۳/۳۴±۱۰/۳۳^{a}	۴۱/۲۴±۱۱/۲۵^{a}	۳۴/۴۶±۱۴/۰۵^{ab}	۱۲/۱۷±۹/۰۶^{b}
دامنه جابه‌جایی جانبی سر اسپرم‌ها (ALH) (µm)	۱/۸۲±۰/۰۴^{a}	۱/۸۴±۰/۰۵^{a}	۱/۷۴±۰/۰۷^{a}	۱/۶۵±۰/۰۶^{a}	۱/۳۲±۰/۰۴^{ab}	۰/۷۲±۰/۰۷^{b}

میانگین‌هایی با حروف لاتین بالانویس متفاوت در هر ردیف، اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که هر چند فراسنجه‌های حرکتی اصلی (جنبایی و جنبایی پیشرنده که در روش ارزیابی چشمی تخمین زده می‌شوند) تحت تأثیر نوع رقیق‌کننده قرار نگرفت، ولی برخی از صفات حرکتی ارزیابی شونده توسط CASA، به‌طور معنی‌داری در بین گروه‌های تیماری (رقیق‌کننده آزمایشی) متفاوت بود، به‌طوری‌که در کل، با افزایش مولاریته مونوساکاریدها در رقیق‌کننده‌ها بهبودی در این صفات حرکتی مشاهده گردید. نشان داده شده است که گلوکز در رقیق‌کننده بر پایه تریس اسپرم قوچ، نسبت به فروکتوز، لاکتوز یا رافینوز قند مناسب‌تری است (Salamon و Visser، ۱۹۷۲). گزارش شده است‌که افزایش غلظت قند در رقیق‌کننده بر پایه تریس، می‌تواند بازیافت دوباره توانایی حرکتی توسط اسپرم‌ها در پس از یخ‌گشایی را بهبود بخشد (Salamon و Visser، ۱۹۷۲). با این‌حال در مطالعه Salamon و Visser (۱۹۷۲)قندها به‌رقیق‌کننده‌های‌هایپونیک افزوده می‌شدند (تا اسمولاریته به سطح ۳۳۰ میلی‌اسمول برسد) و بنابراین چنین ادعا شده است که بهبود حاصله در مطالعه ایشان در نتیجه اثر اسمولاریته بوده است و به اثرات دیگر قندها مربوط نمی‌شود (Molinia و همکاران، ۱۹۹۴b). سطح ۳۳۰ میلی‌اسمول سطحی از اسمولاریته بود که در پژوهش حاضر به‌کار رفت. با این‌حال گزارش شده است که بهترین سطح اسمولاریته برای نگه‌داری چهار ساعته اسپرم به‌صورت مایع (دمای ۵ درجه سانتی‌گراد) سطح ۳۰۰ تا ۳۲۵ میلی‌اسمولی‌است‌و برای‌حفظ بهترجنبایی‌درپس‌ازانجماد-یخ‌گشایی، سطح ۳۷۵ تا ۴۰۰ میلی‌اسمولی می‌باشد (Abdelhakeam و همکاران، ۱۹۹۱). در پژوهش آخوندی و همکاران (۱۳۹۷)، تأثیر سطوح مختلف قند (صفر، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار) در زمان‌های مختلف نگه‌داری (صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت) در اسپرم مایع قوچ بررسی شد و مشخص گردید که بهترین سطح قند برای حفظ درصد جنبایی، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم، سطح صفر میلی‌مولار قند بود. علت تأثیر منفی قند در پژوهش آخوندی و همکاران (۱۳۹۷)را می‌توان چنین تفسیر نمود که افزودن قند منجر به بالا رفتن اسمولاریته محیط رقیق‌کننده شده است،درحالی‌که گزارش‌شده است که حداکثر بقا یا زنده‌مانی اسپرم قوچ در قبل از انجماد با رقیق‌کننده‌های ایزوتونیک حاصل می‌شود (Abdelhakeam و همکاران، ۱۹۹۱).

در مطالعه‌ای گزارش گردید که تأثیر افزودن قندهای مختلف در سطح ۱۰ درصد (v/v) بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم مایع قوچ (دمای ۵ درجه سانتی‌گراد) در یک رقیق‌کننده استاندارد (TEST با ۳۰٪زرده‌تخم‌مرغ،pHبرابر ۷) در مدت چهار ساعت پس از رقیق‌سازی معنی‌دار نبود (Abdelhakeam و همکاران، ۱۹۹۱). در یک مطالعه قبلی گزارش شده است که در بلافاصله بعد از رقیق‌سازی به‌منظور ذخیره سرد منی قوچ (۵درجه‌سانتی‌گراد)، جنبایی پیشرونده اسپرم‌ها در رقیق‌کننده تریس حاوی قند ترهالوز در مقایسه با سایر

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124850

رقیق‌کننده‌ها (شیر پس‌چرخ و TesT) به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (Lopez Saez و همکاران، ۲۰۰۰). قندها جزو ترکیباتی می‌باشند که قادر به انتشار از غشای سلولی نیستند و با تثبیت غشای سلولی و ایجاد دهیدراسیون سلولی قبل از سردسازی و کاهش تشکیل بلورهای یخ درون‌سلولی به‌عنوان محافظ انجماد عمل می‌کند (Fuller، ۲۰۰۴). گزارش شده است که جنبایی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خوک با رقیق‌کننده‌های مختلف بر پایه تریس-زرده تخم‌مرغ حاوی ۱۸۵ میلی‌مولار گلوکز (رقیق‌کننده تهیه شده بر مبنای روش Harayama و همکاران، ۱۹۹۲)، ۵۵/۵ میلی‌مولار گلوکز (رقیق‌کننده تهیه شده بر مبنای روش Cordova و همکاران، ۱۹۹۷) و ۵۵/۵ میلی‌مولار فروکتوز (رقیق‌کننده تهیه شده بر مبنای روش Woelders و همکاران، ۱۹۹۷) به‌ترتیب ۶۰/۷، ۴۸/۲ و ۳۵ درصد بود و این مقادیر همگی اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P\leq ۰/۰۵$). علاوه بر این، جنبایی اسپرمی در رقیق‌کننده حاوی ۱۸۵ میلی‌مولار گلوکز برخلاف دو رقیق‌کننده دیگر، پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد (که شاخصی برای زنده‌مانی اسپرم در داخل دستگاه تناسلی ماده و باروری اسپرم است) کاهش معنی‌داری نشان نداد (De los Reyes و همکاران، ۲۰۰۲). علت این امر شوک اسموزی تحریک شده با دهیدراسیون ناشی از قند درسلول‌های اسپرم و تأثیر متعاقب آن بر متابولیسم اسپرم عنوان شده است (Lopez Saez و همکاران، ۲۰۰۰). با این‌حال، مونوساکاریدها جزو قندهای نفوذپذیر به سلول بوده که مثل دی‌ساکاریدها (هم‌چون ترهالوز) قادر به تحریک دهیدراسیون سلولی نمی‌باشند (Holt، ۱۹۹۷). بنابراین اثر مثبت احتمالی مونوساکاریدها و به‌ویژه گلوکز به‌کار رفته در پژوهش حاضر را می‌توان به تأمین بیش‌تر سوبسترای چرخه گلیکولیز توسط گلوکز نسبت داد (Scott و همکاران، ۱۹۶۲). مونوساکاریدها سوبسترای انرژی‌برای سلول‌های اسپرمی در طول انکوباسیون را فراهم می‌نمایند و از طریق گلیکولیز و فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی به‌عنوان منبع انرژی توسط اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرند تا از جنبایی اسپرم پشتیبانی کنند (Panglowhapan و همکاران، ۲۰۰۴). منبع اصلی تولید انرژی برای اسپرم پستانداران، گلیکولیز و فسفوریلاسیون اکسیداتیو است که تعادل بین این دو مسیر در بین اسپرم گونه‌های مختلف متفاوت است (Andrew و همکاران، ۲۰۰۱)، ولی به‌نظر می‌رسد که گلیکولیز تأمین‌کننده اصلی برای جنبایی اسپرم‌ها باشد (Quinn، ۱۹۹۵). گلوکز و فروکتوز از محتمل‌ترین مواد برای تأمین نیاز حرکتی اسپرم به‌شمار می‌آیند، با این‌حال، تفاوت‌های گونه‌ای از نظر توانایی در سوخت و ساز این قندها وجود دارد (Mukai و Okuno، ۲۰۰۴). اسپرم قوچ و گاو در یک نرخ خطی تحت شرایط غیرهوازی فروکتوز و در شرایط هوازی گلوکز را مورد سوخت و ساز قرار می‌دهند (Scott و همکاران، ۱۹۶۲). گزارش شده است که در صورت فراهمی استات اگزوژنوس برای اسپرم قوچ و گلوکز اگزوژنوس برای اسپرم سگ، سهم منابع انرژی اندوژنوس کاهش می‌یابد و حتی ممکن است اکسیداسیون اندوژنوس متوقف شود (Scott و همکاران، ۱۹۶۲). در خوکچه هندی اسپرم گرفته شده از مجاری تناسلی از جنبایی پایینی برخوردار است ولی پس از اضافه‌نمودن گلوکز، اسپرم‌ها به‌طور ناگهانی متحرک می‌شوند و از لحاظ فراسنجه‌های CASA افزایش نشان می‌دهند (Mujica و همکاران، ۱۹۹۱). بالا بردن غلظت گلوکز در محیط IVF به‌ویژه در دو ساعت اول بعد از افزودن به رقیق‌کننده مایع، منجر به بالاتر رفتن درصد اسپرم‌های با سرعت حرکت بالا و زنده‌مانی گردید ولی بر شاخص VSL (میانگین سرعت اسپرم در یک خط مستقیم) تأثیر معنی‌داری نداشت (اسدی و همکاران، ۱۳۹۰).

نتایج حاضر نشان داد که تا دقیقه ۱۲۰ انکوباسیون در دمای اتاق، هیچ‌کدام از فراسنجه‌های حرکتی اسپرمی دچار کاهش معنی‌داری نشدند، ولی بعد از آن (دقیقه ۱۵۰) صفات حرکتی اسپرم به یک‌باره دچار کاهش شدیدی شدند. گزارش شده است که در صورت نگه‌داری اسپرم قوچ در یخچال (۵ درجه سانتی‌گراد)، فراسنجه‌های حرکتی اسپرم، بعد از ۲۴ ساعت کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهند (آخوندی و همکاران، ۱۳۹۷). اثر کلی زمان انکوباسیون بر فراسنجه‌های PM، TM، VAP، سرعت واقعی اسپرم‌ها در مسیر واقعی طی شده (VCL) و حداکثر دامنه حرکات جانبی سر اسپرم حول مسیر میانگین (ALH) معنی‌دار بود ($P\leq ۰/۰۵$)، جنبایی کل هم‌چنین در $P\leq ۰/۰۱$ معنی‌دار بود). درسازگاری با نتایج حاضر، نشان داده شده است که اثر زمان انکوباسیون بر درصد جنبایی پیشرونده و سرعت پیشرونده اسپرم‌ها معنی‌دار بود (Molinia و همکاران، ۱۹۹۴b).

قندها و به‌ویژه دی‌ساکاریدها هم‌چنین به‌عنوان محافظت‌کننده انجماد عمل می‌نمایند و با حفظ فشار اسمزی رقیق‌کننده و برهم‌کنش با غشاهای فسفولیپیدی موجب تثبیت غشاهای اسپرمی می‌شوند (Watson، ۱۹۷۹؛ Purdy، ۲۰۰۶؛ Hinch و همکاران، ۲۰۰۶) دمای ذخیره‌سازی (Lapwood و Martin، ۱۹۶۶)، وزن مولکولی قند (Molinia و همکاران، ۱۹۹۴b)، نوع رقیق‌کننده (Foote و همکاران، ۱۹۹۳)، نوع بافر به‌کار رفته در رقیق‌کننده (Abdelhakem و Graham، ۱۹۹۱) و اسمولاریته ایجاد شده در محیط (Foote و همکاران، ۱۹۹۳؛ Jafaroghli و همکاران، ۲۰۱۱) بر قابلیت نگه‌داری انجمادی قندها اثرگذار می‌باشند. علاوه بر این، قندها ممکن است با همدیگر اثرات هم‌کنش‌افزایی داشته و در ترکیب با همدیگر موجب اثرات بهتری در رقیق‌کننده منی شوند (Naing و همکاران، ۲۰۱۰). افزودن قند سوکروز در محدوده اسمولاریته طبیعی (۳۰۵ تا ۳۷۰ میلی‌اسمول) تأثیری بر درصد اسپرم‌های جنبای گاو در پس از یخ‌گشایی نداشت (Liu و همکاران، ۱۹۹۸). افزودن محلول‌های ۳۰۰ میلی‌اسمول بر لیتر ترهالوز و سوکروز

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124850

به‌صورت درصد حجمی (۱۲/۵، ۱۶/۷ و ۲۵ درصد V/V)به رقیق‌کننده تریس-زرده تخم مرغ (EYT)، نتوانست نیاز به گلیسرول (به‌عنوان ضدانجماد) را از ۰/۷ مولار کاهش دهد، با این‌حال، جایگزینی محلول قندی سوکروز در سطح ۲۵٪ با رقیق‌کننده EYT و در سطح ۰/۷۱ مولاری گلیسرول، منجر به بهبود معنی‌دار درصد اسپرم‌های جنبا (در پس از انجماد-یخ‌گشایی) در مقایسه با سطح صفر سوکروز گردید (Liu و همکاران، ۱۹۹۸). در مطالعه‌ای دیگر گزارش شده است که یک محیط قندی ایزوتونیک که در آن اجزای تریس-سیترات با قندهای سوکروز و ترهالوز جایگزین شده بودند، نسبت به رقیق‌کننده استاندارد (تریس-سیترات زرده تخم‌مرغ) برای حفظ جنبایی گاوی نتایج بهتری ارایه داده است (Woelders و همکاران، ۱۹۹۷).

در هنگام نگه‌داری منی به‌صورت مایع، به‌دلیل پروکسیداسیون لیپیدی و تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن، جنبایی و باروری اسپرم به‌طور تدریجی کاهش می‌یابد (Alvarez و Storey، ۲۰۰۵). یکی از عوامل تحریک‌کننده پروکسیداسیون لیپیدی حضور زرده تخم‌مرغ در ترکیب رقیق‌کننده عنوان شده است. به‌دلیل تأثیر منفی زرده موجود در رقیق‌کننده بر پایه تریس(به‌دلیل این که زرده تأمین‌کننده سوبسترای چربی برای پروکسیداسیون و تولید رادیکال‌های آزاد هیدروژنی است)، کاهش غلظت زرده به ۱/۵ درصد در رقیق‌کننده بر پایه تریس برای نگه‌داری منی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد توصیه شده است (Watson و Martin، ۱۹۷۶). هم‌چنین گزارش شده است که افزایش زرده تخم‌مرغ از ۵ به ۲۰ درصد در ترکیب رقیق‌کننده بر پایه تریس، موجب افزایش اثرات سمی ناشی از اسپرم‌های مرده در منی نگه‌داری شده در دمای اتاق می‌شود (Shannon، ۱۹۷۲). شایان ذکر است که اسپرم‌های مرده مواد متعددی مثل رادیکال‌های آزاد اکسیژنی (ROS) را در محیط رقیق‌کننده آزاد می‌کنند که به‌طور بالقوه برای اسپرم سمی و کشنده می‌باشند (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعه حاضر در صورت عدم استفاده از زرده تخم‌مرغ و یا در سطوح اندک (۱/۵٪)، اسپرم‌ها بلافاصله تلف می‌شدند. بنابراین مطالعات بیش‌تری برای تعیین سطح بهینه زرده برای نگه‌داری اسپرم در طی انکوباسیون گرم نیاز است.

در پایان نتیجه‌گیری می‌شود بالا بردن غلظت قند و به‌ویژه گلوکز در محیط رقیق‌کننده بر پایه تریس، ضمن توجه به حفظ بهینه اسمولاریته و اسیدیته محیط، منجر به بهبود برخی از فراسنجه‌های حرکتی اسپرم قوچ می‌شود. با توجه به عدم معنی‌داری اثر متقابل تیمار در زمان، نمی‌توان ادعا نمود که افزایش قند در محیط رقیق کننده، طول مدت ماندگاری اسپرم‌ها در طی انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) را بهبود بخشیده است. با این‌حال، با هر کدام از رقیق‌کننده‌های آزمایشی می‌توان بدون هر گونه وارد کردن شوک سرمایی، اسپرم‌ها را در دمای شبیه‌سازی شده با دمای رحم به‌مدت دو ساعت نگه‌داری نمود.

منابع

۱. **آخوندی، آ.؛ مصطفی‌لو، ی.؛ قره‌باش آ.م. و راه‌چمنی ر.، ۱۳۹۷.** اثرات سطوح مختلف تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگه‌داری در رقیق‌کننده‌ها بر خصوصیات منی قوچ دالاق در شرایط مایع. فیزیولوژی و تکوین جانوری. دوره ۱۱، صفحات ۱ تا ۱۵.

۲. **اسدی، ا.؛ باباپور، و. و تاجیک، پ.، ۱۳۹۰.** بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف گلوکز بر روی حرکت اسپرم دم اپیدیدیم گاو. پژوهش‌نامه دامپزشکی. دوره ۷، صفحات ۳۹ تا ۹۷.

۳. **Abdelhakeam, A.A.; Graham, E.F.; Vazquez, I.A. and Chaloner, K.M., 1991.** Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: development of an extender for freezing: effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. Cryobiology. Vol. 28, No: 1, pp: 43-49.

۴. **Agarwal, A.; Makker, K. and Sharma, R., 2008.** Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. American journal of reproductive immunology. Vol. 59, No. 1, pp: 2-11.

۵. **Alvarez J.G. and Storey B.T., 2005.** Differential incorporation of fattyacids into and peroxidative loss of fattyacids from phospholipidsof human spermatozoa. Molecular Reproduction and Development. Vol. 42, pp: 334-346.

۶. **Andrew, C.; Williams, W.; Christopher, L. and Ford, A., *2001.*** *The role of glucose in supporting motility &* Capacitation in human spermatozoa. Journal of Andrology. Vol. 22, No. 4, pp: 680- 695.

۷. **Baumber, J.; Ball B.A.; Gravance, C.G., Medina V. and Davies-Morel, M.C., 2000.** The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. Journal of andrology. Vol. 21, No. 6, pp: 895-902.

۸. **Córdova, A.; Ducolomb, Y.; Jiménez, I.; Casas, E.; Bonilla, E. and Betancourt, M., 1997.** In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed boar semen. Theriogenology. Vol. 47, No. 7, pp: 1309-1317.

۹. **De los Reyes, M.; Saenz L.; Lapierre, L., Crosby, J. and Barros, C., 2002.** Evaluation of glucose as a cryoprotectant for boar semen. Veterinary Record. Vol. 151, No. 16, pp: 477-480.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124850

۱۰. **Douard, V.; Hermier, D.; Magistrini, M.; Labbé C. and Blesbois, E., 2004.** Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology. Vol. 61, No. 1, pp: 1-13.

۱۱. **Evans, G. and Maxwell, W.M.C., 1987.** Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney. 194 p.

۱۲. **Foote, R.H.; Chen, Y.; Brockett, C.C. and Kaproth, M.T., 1993.** Fertility of bull spermatozoa frozen in whole *milk* extender with trehalose, taurine, or blood serum. Journal of dairy science. Vol. 76, No. 7, pp: 1908-1913.

۱۳. **Fuller, B.J., 2004.** Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. CryoLetters. Vol. 25, pp: 375-388.

۱۴. **Harayama, H.; Kanda, S. and Kato, S., 1992.** Influence of season on characteristics of epididymal and ejaculated semen in Meishan boars. Theriogenology. Vol. 38, No. 3, pp: 491-500.

۱۵. **Hawk, H.W., 1983.** Sperm survival and transport in the female reproductive tract. Journal of Dairy Science. Vol. 66, No. 12, pp: 2645-2660.

۱۶. **Hincha, D.K.; Popova A.V. and Cacela, C., 2006.** Effects of sugars on the stability and structure of lipid membranes during drying. Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes. Vol. 3, pp: 189-217.

۱۷. **Holt, W.V. and North, R.D., 1984.** Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: Freeze-fracture study. Journal of Experimental Zoology. Vol. 230, pp: 473- 483.

۱۸. **Jafaroghli, M.; Khalili, B.; Farshad, A. and Zamiri, M.J., 2011.** The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. Small Ruminant Research. Vol. 96, No. 1, pp: 58-63.

۱۹. **Lapwood, K.R. and Martin I.C.A., 1966.** The Use of Monosaccharides, Disaccharides, and Trisaccharides in Synthetic Diluents for the Storage of Ram Spermatozoa at 37°C and 5°C. Australian Journal of Biological Sciences. Vol. 19, No. 4, pp: 655-672.

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

۲۱. **Liu, Z.; Foote, R.H. and Brockett, C.C., 1998.** Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. Cryobiology. Vol. 37, No. 3, pp: 219-230.

۲۲. **Lopez Saez, A.; Ortiz N.; Gallego, L. and Garde, J.J., 2000.** Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. Archives of andrology. Vol. 44, No. 2, pp: 155-164.

۲۳. **Molinia, F.C.; Evans, G. and Maxwell, W.M.C., 1994a.** In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. Reproduction Nutrition Development. Vol. 34, No. 5, pp: 491-500.

۲۴. **Molinia, F.C.; Evans, G.; Casares, P.Q. and Maxwell, W.M.C., 1994b.** Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. Animal Reproduction Science. Vol. 36, No. 1-2, pp: 113-122.

۲۵. **Mujica, A.; Moreno-Rodriguez, R.; Naciff, J.; Neri, L. and Tash, J.S., 1991.** Glucose regulation of guinea-pig sperm motility. Reproduction, Vol. 92, No. 1, pp: 75-87.

۲۶. **Mukai, C. and Okuno, M., 2004.** Glycolysis play a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. Biology of Reproduction. Vol. 71, pp: 540-547.

۲۷. **Naing, S.W.; Wahid, H.; Azam K.M.; Rosnina, Y.; Zuki, A.B.; Kazhal, S. and San, M.M., 2010.** Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopre servation. Animal Reproduction Science. Vol. 122, No. 1-2, pp: 23-28.

۲۸. **Parker, H.M. and McDaniel, C.D., 2006.** The immediate impact of semen diluent and rate of dilution on the sperm quality index, ATP utilization, gas exchange, and ionic balance of broiler breeder sperm. Poultry science. Vol. 85, No. 1, pp: 106-116.

۲۹. **Ponglowhapan, S.; Essén-Gustavsson, B. and Forsberg, C.L., 2004.** Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. Theriogenology. Vol. 62, No. 8, pp: 1498-1517.

۳۰. **Purdy, P.H., 2006.** A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research. Vol. 63, No. 3, pp: 215-225.

۳۱. **Pursel, V.G.; Schulman, L.L. and Johnson, L.A., 1978.** Distribution and morphology of fresh and frozen-thawed sperm in the reproductive tract of gilts after artificial insemination. Biology of Reproduction. Vol. 19, pp: 69-73.

۳۲. **Quinn, P., 1995.** Enhanced results in mouse & human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose & phosphate. Journal of Assisted Reproduction and Genetic. Vol. 12, pp: 97-105.

۳۳. **Quinn, P.J.; Chow, P.Y.W. and White, I.G., 1980.** Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124850

cold shock at a plasma membrane site. Journal of Reproduction and Fertility. Vol. 60, pp: 403-407

۳۴. **Salamon, S. and Visser, D., 1972.** Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. Australian Journal of Biological Sciences. Vol. 25, No. 3, pp: 605-618.

۳۵. **Scott, T.W.; White, I.G. and Annison, E.F., 1962.** Glucose & acetate metabolism by ram, bull, dog & fowl spermatozoa. Biochemical Journal. Vol. 83, No. 2, pp: 398-4040.

۳۶. **Shannon, P., 1972.** The effect of egg yolk level and dose rate on concentration rate of semen-diluted in Caprogen. In: VII International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Munich. Vol. 2, pp: 1440-1442.

۳۷. **Watson, P.F. and Martin, I.C.A., 1976.** Artificial insemination of sheep: the fertility of semen extended in diluents containing egg yolk and inseminated soon after dilution or stored at 5°C for 24 or 48 hours. Theriogenology. Vol. 6, pp: 553-558.

۳۸. **Woelders, H.; Matthijs, A. and Engel, B., 1997.** Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. Cryobiology. Vol. 35, No. 2, pp: 93-105.

۳۹. **Yildiz, C.; Kaya A.; Aksoy, M. and Tekeli, T., 2000.** Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. Theriogenology. Vol. 54, No. 4, pp: 579-585.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124850

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 4, Winter 2020

The effect of changes in glucose and fructose levels in Tris-based extender on ram sperm kinematic parameters stored at body temperature

- **Mehran Ejraei:** Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran
- **Farhad Samadian*:** Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran
- **Farhad Farrokhi Ardebili:** Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
- **Reza Naghiha:** Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

Received: May 2019 Accepted: August 2019

Keyword: Ram liquid semen, Extender, Tris to sugar ratio, Incubation, Monosaccharides

Abstract

Storage of semen in the liquid form rather than cryopreservation is becoming popular as preparing and transportation is less expensive in this method. While maintaining the optimal osmolarity in all Tris-Egg yolk based extenders (TEY), the purpose of the present study was to investigate the effect of sugar type (glucose and fructose) and sugar concentration modifications on ram semen kinetics during incubation at body temperature. The semen diluents with different Sugar: Tris ratios (30 mM: 300 mM and 210 mM: 100 mM) were made with two different monosaccharide (glucose and fructose) and were compared with a standard extender used for freezing ram semen. The results showed that regardless of the diluent medium, the mobility parameters of sperm significantly decreased after incubation for two hours at 37°C. There was no significant interaction between storage time and type of extender. Also, the percentage of total motility and progressive motility were not significantly influenced by treatments. However, some of the motility parameters of incubated semen samples, including linearity, curvilinear velocity (VCL) and straight-line velocity (VSL) were improved by enhancing concentration of sugars in diluents. It is concluded that an increase in sugar: Tris ratio in TEY extenders, may improve the kinematic parameters of ram semen at body temperature. Thermoresistance of spermatozoids at body temperature can be considered as an indicator of male gametes fertility inside the female reproductive tract.

* Corresponding Author's email: Farhad.samadian@gmail.com