نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱٤، بهـــار ۱۳۹٦
ص‌ص: ۳۵~٤۲

اثراسیدهای چرب آلفا– لینولنیک و لینولئیک همراه با تره‌هالوز و سوکروز یا بدون آن‌ها بر کیفیت اسپرم بز مرخز طی فرآیندهای انجماد و یخ گشایی

- **عباس فرشاد** (نویسنده مسئول)
  دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان
- **امجد فرزین پور**
  استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان
- **شاهو محمودی**
  دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان

تاریخ دریافت : آبان ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش : خرداد ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۱۸۶۴۴۲۶
Email: AFarshad@uok.ac.ir

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر اسیدهای چرب آلفا-لینولنیک و لینولئیک و قندهای تره‌هالوز و سوکروز بر روی کیفیت اسپرم بز مرخز پس از انجماد و یخ گشایی بود. جمع آوری اسپرم از تعداد چهار راس بز نر مرخز و با استفاده از مهبل مصنوعی انجام گرفت. نمونه‌های جمع آوری شده پس از ارزیابی اولیه و مخلوط شدن، به ۱۱گروه مساوی تقسیم و به نسبت ۱:۱۰ با رقیق کننده پایه تریس حاوی اسیدهای چرب رقیق شدند. ارزیابی اسپرم‌های یخ گشایی شده نشان داد که تیمار حاوی آلفا- لینولنیک به‌صورت معنی‌دار کیفیت اسپرم‌ها را بهبود بخشیده است، در صورتی- که تیمار حاوی اسید لینولئیک فقط بر صفت سلامت غشاء و اکروزم تاثیرگذار بوده است. قندهای تره هالوز و ساکارز باعث کاهش معنی دار ویژگی‌های اسپرم شدند. بعلاوه، ترکیب اسید آلفا- لینولنیک و تره هالوز سلامت آکروزوم و سلامت غشاء را به طور معنی‌داری افزایش داده و باعث کاهش میزان جنبایی و جنبایی پیشرونده اسپرم شدند. بعلاوه، تیمارهای حاوی تمامی آنتی اکسیدان‌ها و رقیق کننده‌های حاوی اسید لینولئیک و قندها به طور معنی داری باعث کاهش ویژگی‌های اسپرم شدند. نتایج این پژوهش نشان دادند که افزودن ۲۰ میلی گرم در صد میلی‌لیتر اسید آلفا- لینولنیک به رقیق کننده برای تمام ویژگی‌های پس از انجماد اسپرم بز مرخز سودمند بوده و در ترکیب با تره هالوز نتایج بهتری داشت.

واژه‌های کلیدی: اسید چرب، قند، انجماد، بزمرخز، غشاء اسپرم

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 114 pp: 35-42

Effects of α- Linolenic and linoleic fatty acids, with or without trehalose and sucrose on quality of Markhoz goat frozen-thawed spermatozoa

By: A. Farshad[*1], A. Farzinpour[2], S. Mahmoudi[3]
1: Associate professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Iran
2: Assistant professor, Department of Animal Science Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Iran
3: Graduate MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Iran.

Received: November 2015 **Accepted: May 2016**

The aim of this study was to evaluate the effects of α- linolenic and linoleic fatty acids, trehalose and sucrose on quality of Markhoz goat frozen-thawed sperm cells. Semen was collected from 4 mature goats using an artificial vagina, evaluated, pooled and divided into 11 aliquots and extended 1:10 with basic tris diluent containing different fatty acids. The motility, progressive motility, viability, acrosome and membrane integrity of frozen spermatozoa have been evaluated after thawing. The results indicated that α- linolenic was significantly the best diluent, while the linoleic acid decreased significantly the quality of spermatozoa, except membrane integrity. Moreover, the use of trehalose and sucrose in diluents decreased significantly the sperm cells characteristics. In addition, the result presented that α- linolenic acid in combination with trehalose improved significantly the rate of acrosome and membrane integrity, but decreased the motility and progressive motility of frozen-thawed spermatozoa. Moreover, the treatments containing all antioxidants and diluents containing linoleic acid and sugars decreased significantly the rate of assessed parameters. In conclusion, the results in this study indicated that using of 20 mg α-linolenic acid in diluent alone and in combination with trehalose can be suitable for cryopreservation of Markhoz goat sperm cells.

Key words: Fatty acid, sugar, cryopreservation, Markhoz goat, sperm membrane

مقدمه

بیشتر پیشرفت‌های امروزی صنعت دامپروری مانند پیشرفت ژنتیکی گله-ها، جلوگیری از نابودی نژادهای بومی و گونه‌های در حال انقراض مدیون انجماد اسپرم است (Li, 2005). با این حال فرایند انجماد، شوک سرمایی و آسیب‌های اکسیداتیو بر غشاء اسپرم ایجاد می‌کند که موجب کاهش ماندگاری وتوان باروری اسپرم شده و همچنین موجب مرگ سلول و تاثیر منفی بر کیفیت اسپرم منجمد شده می‌شود (Lopesو همکاران، 1998). بنابراین، مایع رقیق کننده منی، علاوه بر این‌که افزایش دهنده کمیت می‌باشد، باید کیفیت اسپرم را در طول فرایند سرد سازی و انجماد حفظ کند. غشاء پلاسمایی اسپرم پستانداران غنی از اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد که در برابر متابولیت‌های اکسیژن فعال تولید شده ناشی از پراکسیداسیون لیپید ها آسیب پذیر هستند و در نتیجه ساختار سلولی، جنبایی، زنده مانی و اعمال متابولیکی اسپرم آسیب پذیرند (Aitken and Fisher, 1994). همچنین نقش این اسیدهای چرب در کمک به سیالیت غشاء، و میزان ظرفیت پذیری سلول اسپرم گزارش شده است (Bilodeau و همکاران، 2001) .همچنین، اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه دارای نقش مهمی در تنظیم و قابلیت تحرک اسپرم در تمامی گونه های پستانداران دارند (Bilodeau و همکاران، 2001; Parks and Graham, 1992). بعلاوه، ترکیب لیپیدی سلول اسپرم در پستانداران نشان دهنده نقش اصلی و عمده اسیدهای چرب غیر اشباع در قابلیت انجماد پذیری اسپرم می‌باشد، به عبارت دیگر، تفاوت در ترکیب لیپیدی و اسیدهای چرب غشای پلاسمایی سلول های اسپرم در گونه‌های مختلف باعث تفاوت در قابلیت انجماد سلول اسپرم خواهد شد (Parks and Graham, 1992). در این مورد گزارشات متعددی از تحقیقات نشان می‌دهند که برای بارور بودن اسپرم، داشتن جنبایی و آکروزوم سالم از شروط حیاتی به شمار می روند. لذا ویژگی‌های جنبایی اسپرم، قابلیت انعطاف و حفظ سیالیت حفظ غشای اسپرم نتیجه وجود سطوح بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع می‌باشد (Long and, 2003; Khalili

(Krammer و همکاران، 2010). در اسپرم بیشتر گونه‌های پستانداران بخش بیشتر اسیدهای چرب غشای اسپرم، اسیدهای چرب بلند زنجیر غیراشباع هستند که بیشتر شامل سری های امگا- ۳ می‌باشند که مهمترین آن اسید چرب دوکوزاهگزاانوئیک میباشد. این اسید چرب با توجه به میزان آن به عنوان اسید چرب غالب فسفولیپیدهای غشای اسپرم شناخته شده است، به طوری که بالغ بر ۶۰ درصد از کل اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه را تشکیل میدهد (Long and Kramer, 2003). همچنین بررسی تغییرات محتوای لیپیدی غشاء اسپرم بز در طی انجماد نشان میدهد که تغییرات میزان لیپیدها و اجزاء لیپیدی غشاء پلاسمایی در نتیجه انجماد، معنی‌دار است. بعلاوه افزایش آبگریزی غشاء سلول یک مکانیزم اصلی در اسپرم بوده که مقاومت به تخریب انجمادی را تحت تأثیر قرار می می دهد (Chakarabarty و همکاران، 2007). همچنین گزارشات نشان می دهدکه اسیدهای چرب غیراشباع و کلسترول در رقیق کننده‌ها، انجمادپذیری و قدرت باروری اسپرم قوچ را در شرایط برون تنی بهبود می دهد (Ansari و همکاران، 2012).

از سویی دیگر، بررسی منابع نشان می‌دهد استفاده از قندهای مرکب باعث ایجاد فشار اسمزی و در نتیجه خروج آب از سلول می‌شوند.گفته می‌شود، آبکشی اولیه سلول پیش از انجماد، از تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی جلوگیری نموده و یا میزان تشکیل این کریستال ها را کاهش می‌دهد که در نتیجه احتمال کاهش میزان صدمات وارده وجود دارد (Aisen و همکاران، 2000; Eiman و همکاران، 2003). نظر به این‌که گزارشات اندکی از تاثیرگذاری اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ بر روی کیفیت اسپرم های منجمد شده بز وجود دارد، لذا هدف از اجرای این پژوهش بررسی نقش اسیدهای چرب نامبرده به صورت تنها یا در ترکیب با قندهای تره هالوز و سوکروز بر روی حفظ کیفیت اسپرم بز منجمد و یخ‌گشایی شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مراحل اجرایی این پژوهش در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان واقع در جنوب شرقی شهر سنندج انجام گرفت. به منظور تامین احتیاجات دام ها، روزانه ۵۳۰ گرم یونجه خشک، ۳۰۰ گرم کنسانتره و ۱۹۰ گرم کاه جو در دو وعده صبح و شب به عنوان جیره غذایی براساس احتیاجات توصیه شده در AFRC سال ۱۹۹۸به صورت دستی در اختیار دام ها قرار گرفت. در طی آزمایش، دام ها به صورت آزاد به آب دسترسی داشتند. تعداد ۴ رأس بز نر مرخز، از بزهای موجود در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، برای جمع آوری نمونه-های منی انتخاب شدند. دام‌های انتخاب شده جهت اسپرم گیری با مهبل مصنوعی به مدت ۳ هفته عادت دهی شدند. جمع آوری نمونه‌های منی هر سه روز یک‌بار و به مدت ۳۵ روزانجام گرفت که در برگیرنده ۱۰ تکرار می‌باشد. برای جلوگیری از ایجاد شوک سرمایی، نمونه های جمع آوری شده تا زمان انتقال به آزمایشگاه، درون فلاسک عایق دارای آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در حداقل فاصله زمانی به آزمایشگاه انتقال یافتند و تا قبل از انجماد در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ارزیابی‌های اولیه، نمونه‌هایی که دارای جنبایی بالای ٪۷۰ بودند، انتخاب و به منظور یکسان سازی کیفیت با هم دیگر مخلوط شده و به ۱۱ گروه مساوی تقسیم شدند. رقیق کننده پایه مورد استفاده (حاوی تریس، فروکتوز، اسید سیتریک، پنی سیلین و استرپتومایسین) در این آزمایش براساس مقدار ۱۰۰ میلی لیتر (Evans and Maxwell, 1987) تهیه شد که طبق جدول یک مواد آزمایشی شامل اسید آلفا- لینولنیک ، اسید لینولئیک ، تره هالوز و سوکروز به آن اضافه شدند.پس از رقیق سازی به نسبت ۱:۱۰، نمونه‌ها به داخل پایوت-های۰/۲۵ میلی لیتری ریخته، طرف باز پایوت‌ها با پودر پلی وینیل اسید مسدود و به مدت ۲ ساعت در ۵ درجه سانتی گراد سردسازی شدند. سپس نمونه‌های سرد شده جهت انجماد به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ تا ۵ سانتی متر از سطح نیتروژن مایع و در بخار آن قرار گرفتند. در نهایت پایوت های منجمد شده به داخل تانک نیتروژن (۱۹۶- درجه سانتی-گراد) انتقال داده و به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. یخ‌گشایی نمونه-ها به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آب گرم و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت .

ارزیابی صفات اسپرم پس از انجماد و یخ گشایی

تعیین درصد جنبایی و جنبایی پیش رونده

برای تعیین میزان جنبایی و جنبایی پیش رونده اسپرم‌های جمع آوری شده، نمونه منی به نسبت ۱:۱۰ با سرم فیزیولوژی رقیق شده، سپس یک قطره از منی بر روی لامی که از پیش بر روی هات پلیت با ۳۷ درجه سانتی‌گراد بوده است، قرار داده و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ مشاهده شدند. جهت شمارش و ارزیابی،۱۰ میدان میکروسکوبی و در هر میدان ۱۰ اسپرم مورد بررسی و شمارش قرار گرفتند. هم‌زمان با بررسی جنبایی اسپرم، حرکت پیش رونده اسپرم‌ها نیز مشاهده و شمارش شدند (Evans and Maxwell, 1987).

تعیین درصد زنده مانی

برای تعیین میزان اسپرم های مرده و زنده، از رنگ آمیزی ائوزین- نیگروزین تجاری استفاده شد. برای تهیه محلول ائوزین - نیگروزین، ۱/۶۷ گرم ائوزین، ۱۰ گرم نیگروزین و ۲/۹ گرم سیترات سدیم با آب مقطر تا حجم ۱۰۰ میلی لیتر مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه روی هات پلت قرار داده شد. سپس یک قطره از رنگ را با دو قطره از اسپرم بر روی یک لام مخلوط کرده و با استفاده از یک لام دیگر و با زاویه ۴۵ درجه گسترش تهیه گردید و بعد از خشک شدن لام آماده شده، اسپرم‌های رنگ پذیرفته به کمک میکروسکوب نوری حداقل در ۱۰ میدان و تعداد ۱۰سلول با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر شمارش گردیدند. اسپرم‌هایی که در بخش سر و گردن بنفش رنگ شده بودند به عنوان اسپرم‌های مرده ارزیابی شدند(Evans and Maxwell, 1987).

تعیین درصد سلامت آکروزوم

تعیین درصد سلامت آکروزوم با استفاده از محلول فرمالین سیترات صورت پذیرفت . جهت تهیه این محلول ابتدا ۲/۹ گرم تری سدیم سیترات دهیدرات در حجم ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده تا محلول سدیم سیترات ۲/۹٪ تشکیل شود. سپس ۴ درصد از این محلول با ۹۶ درصد محلول فرمالدئید ۳۷٪ مخلوط شد. جهت ارزیابی کلاهک اسپرم، دو قطره از محلول تهیه شده با یک قطره از نمونه اسپرم بر روی یک لام مخلوط و یک لامل روی آن قرار گرفت. بعد از گذشت ۳۰ ثانیه نمونه آماده شده در زیر میکروسکوب نوری با استفاده از عدسی روغنی و بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر مورد بررسی و مشاهده قرار گرفتند. تعداد اسپرم-های شمارش شده با آکروزوم سالم به صورت در صد بیان شدند(Alvarez and Storey, 1983).

تعیین درصد سلامت غشاء

تعیین میزان سلامت غشاء با استفاده از آزمون متورم شدن اسپرم در محلول هایپواسموتیک* انجام پذیرفت. بدین منظور، ۹ گرم فروکتوز و ۴/۹ گرم سیترات سدیم با یک لیتر آب دوبار تقطیر به مدت یک ساعت روی هات پلت مخلوط شدند. ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فوق مخلوط و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم با ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

سپس یک قطره از محلول آماده شده را بر روی لام قرارداده و در زیر میکروسکوپ ۱۰ میدان و در هر میدان ۱۰ اسپرم با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر شمارش شدند و سپس تعداد شمارش شده بر اساس درصد بیان شدند (Revell and Mrdobe, 1994).

*Hypo-osmotic solution

تجزیه آماری

برای بررسی اثرات تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های اسپرم بز مرخز از مدل آماری زیر و اطلاعات جمع‌آوری شده در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۱۰ تکرار صورت پذیرفت.تمامی داده ها در نرم افزار Excel ثبت و سپس در نرم افزار SAS (1996) فراخوانی شده و نرمال بودن داده‌ها به کمک روش Univariate مورد بررسی قرار گرفتند. از روش GLM برای آنالیز داده‌ها و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن و در سطح ۵٪ استفاده شد.

$$y_{ij} = \mu + T_j + e_{ij}$$

y_{ij} = پارامتر اندازه گیری شده

μ = میانگین جامعه

T_j = اثر تیمار i

e_{ij}=اثر اشتباه آزمایشی

نتایج

تعداد ۴۰ نمونه منی جمع آوری شده قبل از مرحله آماده سازی تیمارهای آزمایشی از نظر ویژگی‌های جنبایی، جنبایی پیش‌رونده، زنده مانی، سلامت آکروزوم و سلامت غشاء مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصله در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

اثرات تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های منی پس از یخ‌گشایی

نتایج جدول۳ نشان می‌دهند افزودن آلفا- لینولنیک اسید به رقیق کننده، صفات جنبایی۰/۰۸±۶۵/۵ درصد و جنبایی پیش رونده ۸/۶۱±۴۷/۷ درصد اسپرم را در مقایسه با گروه شاهد بترتیب ۱/۹۱±۵۷/۴ و ۲/۴۹±/۴ ۳۸ درصد وگروه‌های آزمایشی شامل تیمار اسید لینولئیک، تیمار تره هالوز و تیمار سوکروز به طور معنی‌دار (P< ۰/۰۵) بهبود بخشیده است. نتایج جدول ۳ همچنین نشان می‌دهند، صفات جنبایی و جنبایی پیش رونده حاصل از تیمار حاوی آلفا-لینولنیک اسید در مقایسه با تیمارهای ترکیبی آلفا- لینولنیک اسید به همرا ه لینولئیک اسید، تیمار آلفا- لینولنیک اسید به همراه تره هالوز، آلفا- لینولنیک اسید به همراه سوکروز، لینولئیک اسید به همراه تره هالوز، لینولئیک اسید به همراه سوکروز و تیمار حاوی آلفا- لینولنیک اسید به همراه لینولئیک اسید، تره هالوز و سوکروز به طور معنی‌دار (P< ۰/۰۵) بهبود بخشیده است.

همچنین نتایج حاصل نشان می‌دهند تیمارهای اسید آلفا- لینولنیک و ترکیب آلفا- لینولنیک با قند تره‌هالوز توانستند با ۴/۱۳±۷۶/۲۰ و

۷۴/۹۰±۷/۳۶ درصد، به ترتیب ۷/۶ و ۵/۴ درصد نسبت به تیمار شاهد زنده‌مانی اسپرم را بهبود بخشند (P< ۰/۰۵). تیمار اسید آلفا- لینولنیک، تیمار ترکیبی آلفا- لینولنیک با اسید لینولئیک و تیمار ترکیبی آلفا- لینولنیک با تره‌هالوز، بهترین اثر را از نظر آماری روی سلامت آکروزوم اسپرم نسبت به شاهد داشتند (P< ۰/۰۵) همچنین نتایج نشان دادند که تیمارهای اسید آلفا- لینولنیک، اسید لینولئیک، ترکیب آلفا- لینولنیک با لینولئیک و ترکیب آلفا- لینولنیک با تره‌هالوز بهترین اثر را روی بهبودی سلامت غشاء اسپرم نسبت به تیمار شاهد داشتند (P< ۰/۰۵). این تیمارها به ترتیب با ۱۱/۸، ۴/۳، ۴/۳ و ۶ درصد بیشتر از تیمار شاهد سلامت غشاء اسپرم را پس از یخ‌گشایی بهبود دادند(P< ۰/۰۵).

جدول ۱: مشخصات نسبت مواد محافظت کننده در تیمارهای آزمایشی

	تیمارهای آزمایشی
شاهد	رقیق کننده پایه (تریس-فروکتوز-سیتریک اسید – پنی سیلین و استروپتومایسین-گلیسرین و زرده تخم مرغ)
ALA	رقیق کننده پایه + ۲۰ میلی گرم اسید آلفا- لینولنیک(C18H30O2)
LA	رقیق کننده پایه + ۱۰ میلی گرم اسید لینولئیک(C18H32O2)
T	رقیق کننده پایه + ۲۰ میلی مولار تره هالوز(C12H22O11)
S	رقیق کننده پایه + ۲۰ میلی مولار ساکارز(C12H22O11)
ALA+LA	رقیق کننده پایه + ۲۰ میلی گرم اسید آلفا- لینولنیک + ۱۰ میلی گرم اسید لینولئیک
ALA+T	رقیق کننده پایه + ۲۰ میلی گرم اسید آلفا- لینولنیک + ۲۰ میلی مولار تره هالوز
ALA+S	رقیق کننده پایه + ۲۰ میلی گرم اسید آلفا- لینولنیک + ۲۰ میلی مولار ساکارز
LA+T	رقیق کننده پایه + ۱۰ میلی گرم اسید لینولئیک + ۲۰ میلی مولار تره هالوز
LA+S	رقیق کننده پایه + ۱۰ میلی گرم اسید لینولئیک + ۲۰ میلی مولار ساکارز
ALA+LA+T+S	رقیق کننده پایه + ۲۰ میلی گرم اسید آلفا- لینولنیک + ۱۰ میلی گرم اسید لینولئیک + ۲۰ میلی مولار تره هالوز + ۲۰ میلی مولا۰ساکارز

ALA: آلفا- لینولنیک اسید، LA: لینولئیک اسید، T: تره هالوز ،S: ساکارز

جدول ۲: ویژگی های میکروسکوپی اسپرم تازه بز مزخز

ویژگی‌های منی	تعداد	میانگین	SEM	حداقل	حداکثر
جنبایی (٪)	۴۰	۸۷/۱۷	۰/۴۴	۸۰	۹۱
جنبایی پیش‌رونده (٪)	۴۰	۸۱/۲۵	۰/۵۱	۷۲	۸۹
اسپرم زنده (٪)	۴۰	۹۲/۸۵	۰/۳۹	۸۸	۹۷
سلامت آکروزوم (٪)	۴۰	۸۰/۶۷	۰/۶۳	۶۸	۸۵
سلامت غشاء (٪)	۴۰	۷۲/۶۷	۰/۴۷	۶۲	۷۷

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

جدول ۳: اثر تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های اسپرم بز مرخز پس از یخ‌گشایی (میانگین ± اشتباه معیار)

	جنایی(٪)	جنایی پیش رونده(٪)	زنده مانی(٪)	سلامت آکروزوم(٪)	سلامت غشاء(٪)
شاهد	۵۷/۴±۱/۹۱^{b}	۳۸/۴±۲/۴۹^{b}	۶۹/۴±۵/۰۳^{b}	۷۲/۴±۱/۸۶^{bc}	۳۷/۵±۸/۱۴^{cd}
ALA	۶۵/۵±۰/۰۸^{a}	۴۷/۷±۸/۶۱^{a}	۷۶/۴±۲/۱۳^{a}	۷۸/۴±۰/۷۶^{ab}	۴۹/۴±۶/۶۷^{a}
LA	۴۴/۸±۸/۴۲^{cd}	۲۵/۵±۶/۹۱^{de}	۵۸/۶±۰/۶۸^{cd}	۷۱/۶±۷/۲۹^{c}	۴۲/۳±۱/۹۳^{bc}
T	۳۸/۴±۰/۳۷^{de}	۲۳/۱±۴/۹۰^{e}	۴۸/۴±۸/۷۶^{ef}	۶۴/۶±۸/۵۳^{d}	۲۶/۳±۶/۲۷^{f}
S	۴۹/۶±۷/۰۲^{c}	۳۳/۴±۵/۴۵^{bc}	۶۲/۵±۲/۸۳^{c}	۷۲/۴±۴/۱۷^{bc}	۳۳/۲±۴/۵۹^{de}
ALA+LA	۴۳/۸±۳/۸۲^{cd}	۳۴/۹±۱/۰۹^{bc}	۵۵/۷±۴/۰۹^{d}	۷۷/۴±۵/۰۹^{abc}	۴۲/۵±۱/۴۵^{bc}
ALA+T	۴۹/۸±۷/۳۴^{c}	۳۱/۵±۴/۱۳^{cd}	۷۴/۷±۹/۳۶^{ab}	۷۹/۸±۰/۷۸^{a}	۴۳/۷±۸/۱۶^{b}
ALA+S	۴۵/۶±۱/۱۴^{cd}	۳۵/۷±۵/۰۳^{bc}	۵۴/۵±۸/۰۹^{de}	۶۰/۷±۸/۴۴^{d}	۳۶/۴±۱/۴۱^{d}
LA+T	۴۲/۹±۱/۷۸^{cde}	۲۶/۶±۶/۸۷^{de}	۵۴/۶±۲/۳۷^{de}	۶۵/۶±۲/۳۰^{d}	۳۴/۵±۷/۴۶^{de}
LA+S	۴۵/۱۰±۷/۳۷^{c}	۳۱/۷±۰/۹۰^{cd}	۵۶/۹±۱/۳۶^{d}	۴۵/۸±۳/۳۵^{e}	۳۵/۷±۴/۳۲^{d}
ALA+LA+T+S	۳۵/۹±۷/۵۲^{e}	۲۲/۸±۷/۰۳^{e}	۴۵/۸±۷/۹۰^{f}	۴۳/۴±۳/۱۶^{e}	۲۹/۶±۹/۸۲^{ef}

حروف متفاوت...,a,b در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($p\leq$۰/۰۵)، ALA: آلفا- لینولنیک اسید، LA: لینولئیک اسید، T: تره هالوز ،S: ساکارز

بحث

نتایج این پژوهش نشان دادند که تیمار اسید آلفا- لینولنیک بر پارامترهای جنایی، جنایی پیش رونده، زنده مانی، سلامت آکروزوم و سلامت غشاء در مقایسه با تیمار شاهد و دیگر تیمارها به طور معنی‌دار اثر مثبت داشته که علت آن را می‌توان اضافه شدن اسیدهای چرب امگا-۳ به رقیق کننده و در نتیجه افزایش محتوای اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه در غشاء اسپرم دانست که می‌تواند باعث افزایش قابلیت انعطاف پذیری غشاء شده واحتمالا میزان صدمات ناشی از انجماد را کاهش دهد. برای توجیه افزایش ویژگی‌های اسپرم در اثر استفاده از اسید آلفا- لینولنیک می‌توان چنین گفت که با افزایش اسیدهای چرب غیراشباع در غشای پلاسمایی پوشش دهنده سر و دم اسپرم و بهبود سیالیت و قابلیت فشردگی غشاء، توانایی سازگاری غشای پلاسمایی با حرکات فلاژلوم اسپرم، اثرگذاری در تامین انرژی و برخی مواد و مشتقاتی که در تسهیل و افزایش تحرک اسپرم دخالت دارد، افزایش می یابد. نصیری و همکاران (۱۳۸۷) نشان دادند که استفاده از منبع اسیدهای چرب امگا-۳ در محیط نگه دارنده، ویژگی‌های برون تنی منی گاو را پس از انجماد- ذوب بهبود می بخشد. محققین دیگر با اضافه کردن اسیدهای چرب امگا-۳ همراه با آلفا-توکوفرول به رقیق کننده اسپرم بز اظهار کردند که افزودن این مواد به رقیق کننده به طور معنی داری منجر به بهبود جنایی، جنایی پیش رونده و زنده مانی اسپرم شده و درصد اسپرم های ناهنجار را نیز طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (Ansari و همکاران، 2012). به علاوه بهبود سیالیت و انعطاف غشاء، منجر به افزایش توانایی و مقاومت اسپرم در مقابل اثرات مخرب فرایندهای انجماد و یخ‌گشایی و نیز کریستال‌های یخ ساخته شده می‌شوند (Maldijan و همکاران، 2005). نتایج این پژوهش نشان می‌دهند که ترکیب اسید آلفا-لینولنیک با قندهای تره هالوز و سوکروز فراسنجه‌های اسپرم (زنده مانی، سلامت آکروزوم و سلامت غشاء) را نسبت به گروه شاهد و دیگر تیمارها بهبود بخشیده است. بررسی منابع نشان می دهدکه این تاثیرگذاری احتمالا ناشی از نقش حفاظتی قند مرکب تره هالوز در آب‌کشی اسپرم ناشی از ایجاد فشار اسمزی و نیز اثر متقابل آن با فسفولیپیدهای غشاء می‌باشد (Aisen و همکاران، 2002) و نیز هیدروژن گروه هیدروکسیل این قندها با گروه فسفولیپیدهای سر قطبی غشای اسپرم متصل شده و باعث تثبیت و حفظ سلامتی غشاء اسپرم طی انجماد می‌شود (Aisen و همکاران، 2000; Eiman و همکاران، 2003).. همچنین نتایج این پژوهش نشان دادند که تره هالوز نسبت به سوکروز سلامت غشای اسپرم را به طور معنی‌داری بهبود بخشیده است که احتمالا نقش بیشتر آنتی اکسیدانی قند تره هالوز نسبت به قند سوکروز منجر به حفاظت از غشاء سلول اسپرم شده است (Aisen و همکاران، 2002). مشخصه اصلی اسپرم پستانداران حضور

اسیدهای چرب امگا-۳ به ویژه اسید دوکوزاهگزانوئیک درغشای آن-هاست. مطالعات روی خوک نر و انسان نشان داده که نسبت بالای اسید دوکوزاهگزانوئیک به اسید دوکوزاپنتانوئیک منجر به بهبود کیفی اسپرم و همچنین باروری می‌شود، در حالی که استفاده از نسبت بالای سطوح اسید دوکوزاپنتانوئیک باعث کاهش باروری می شود (Grady و همکاران، 2009). همچنین نتایج آزمایش تاثیرمکمل امگا-۶ بر روی کیفیت اسپرم بلدرچین ژاپنی نشان داد که حجم منی، غلظت اسپرم، کل اسپرم زنده، اسپرم نرمال زنده و کیفیت اسپرم به طور معنی‌دار کاهش داشت (Al-Daraji و همکاران، 2010). در مقایسه بررسی اثر مکمل اسید لینولئیک روی ویژگی‌های اسپرم گوسفند نشان از عدم تاثیر گذاری مثبت بر ویژگی‌های اسپرم بود (Graaf و همکاران، 2007). با توجه به نتایج جدول۳ مشاهده می‌شود غلظت مورد استفاده قند تره هالوز اثر معنی‌داری روی ویژگی‌های اسپرم بز نشان داده و منجر به کاهش جنبایی، جنبایی پیش رونده، زنده مانی، سلامت آکروزوم و غشاء اسپرم بز شده است. این تاثیرگذاری احتمالا ناشی از کم بودن سطح استفاده شده این قند می‌باشد که فشار اسمزی ضروری ایجاد نشده و احتمالا آب‌کشی سلول به‌طور کامل صورت نگرفته و کریستال‌های یخ تشکیل شده بر صفات اسپرم اثرات منفی می‌گذارد (Evans and Maxwell، 1987؛ Foote و همکاران، 1993). در این رابطه نتایج استفاده از سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار تره هالوز در رقیق کننده که بیشتر از سطوح استفاده شده در این پژوهش می‌باشد، نیز نشان می‌دهند هیچ اثر مطلوبی بر ویژگی‌های کیفی اسپرم‌های یخ‌گشایی شده خرگوش قهوه‌ای اروپایی نداشته‌اند که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد (Kozdrowski, 2009). هرچند دیگر گزارشات نشان می دهند که استفاده از تره هالوز روی اسپرم خوک اثرات مثبتی داشته است (Oscar و همکاران، 2009). همچنین یک گزارش دیگر نشان داد که با بررسی سه سطح مختلف تره هالوز (۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی اسمولار) و سوکروز (۰/۰۴، ۰/۰۶ و ۰/۰۸ مولار) بر انجماد منی در بزهای مرخز گزارش کردند که بهترین فراسنجه جنبایی با رقیق کننده ۱۰۰ میلی اسمولار و پایین ترین آن‌ها با ۰/۰۴ مولار سوکروز دیده شد. به علاوه، نتایج این محققین نشان دادند که تره هالوز و سوکروز درصد ناهنجاری‌های اسپرم پس از یخ گشایی را کاهش می‌دهند (Khalili و همکاران، 2010). در این رابطه نتایج استفاده از غلظت‌های صفر تا ۴۰۰ میلی اسمز تره هالوز در رقیق کننده تریس را برای انجماد منی قوچ در فصل تولیدمثل نشان داد که استفاده از ۵۰ و ۱۰۰ میلی اسمز تره هالوز جنبایی اسپرم بهبود بخشیده است (Aisen و همکاران، 2002). این تاثیرگذاری مطلوب در کاهش ناهنجاری ثانویه پس از یخ گشایی با ۱۰۰ میلی اسمز سوکروز نیز دیده شده است (Khalili و همکاران، 2010). نتایج این محققین همچنین نشان دادند غلظت‌های بالای تره هالوز و ساکارز به طور نسبی از اثرگذاری بهتری برخوردارند که این نکته احتمالا ناشی از توان آب‌کشی بالا از سلول بوده است. در کل نتایج این پژوهش مشخص کرد که استفاده از سطح ۲۰ میلی گرم اسید آلفا-لینولنیک بر روی تمام ویژگی‌های کیفی اسپرم بز پس از یخ‌گشایی اثر مطلوب داشته است و در ترکیب با غلظت ۱۰ میلی گرم اسید لینولئیک سلامت آکروزوم و سلامت غشاء اسپرم را بهبود بخشید. ترکیب اسید آلفا- لینولنیک با سطح ۲۰ میلی مولار قند تره هالوز نیز منجر به بهبود زنده مانی، سلامت آکروزوم و سلامت غشاء پس از یخ-گشایی شد.

منابع

نصیری، ا. ح. ۱۳۸۷. اثر افزودن منبع اسیدهای چرب n-3 و ویتامین E به رقیق کننده بر قابلیت انجماد اسپرم گاو هلشتاین. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

AFRC (Agricultural and Food Research Council). (1998) The nutrition of goat. An advisory manual prepared by the AFRC technical committee on responses to nutrients. *CAB International*, Wallingford, UK.

Aisen, E.G., Alvarez, L., Venturino, A. and Garde, J.J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, 53: 1053-1061.

Aisen, E.G., Medina, V.H. and Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57: 1801-1808.

Aitken, J. and Fisher, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, 16: 259–267.

Al-Daraji, H.j., Al-Mashadani, H.A., Al-Hayani, W.K., Al-Hassani, A.S. and Mirza, H.A. (2010). Effect of n-3 and n-6 fatty acid supplemented diets on semen quality in Japanese quail (Coturnixcoturnix japonica). *International Journal of Poultry Science*, 9: 656-663.

Alvarez, J.G. and storey, B.T. (1983). Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of Reproduction*, 29: 548-555.

Ansari, M., Towhidi, A., Moradi Shahrbabak, M. and Bahreini, M. (2012). Docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol improve sperm cryosurvival in goat. *Journal of Animal Science*, 45: 7-13.

Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Gagnon, C. and Sirard, M.A. (2001). Thiols prevent H-O mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56: 275-286.

Chakrabarty, J., Banerjee, D., Pal, D., De, J., Ghosh, A. and Majumder, G.C. (2007). Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology*, 57: 27-35.

Eiman, M., Aboagla, E., and Terada, T. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*, 69: 1245-1250.

Evans, G. and Maxwell, W.M.S. (1987). Salamon's artificial insemination of sheep and goats. *University Press, Sydney, NSW, Australia*, 210: 148-149.

Foote, R.H., Chen, Y. and Brockett, C.C. (1993). Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine or blood serum. *Journal of Dairy Science*, 76: 1908-1913.

Graaf, S.P., Peake, K., Maxwell, W.M.C., O'Brien, J.K. and Evans, G. (2007). Influence of supplementing diet with Oleic and Linoleic acid on the freezing ability and sex-sorting parameters of ram semen. *Livestock Science*, 110: 166–17.

Grady, S.T., Scott, B.D., Brinsko, S.P. and Forrest, D.W. (2009). Dietary supplementation of 2 sources of omega-3 fatty acids and subsequent effects on fresh, cooled, and frozen seminal characteristics of stallions. *Reproductive Physiology*, Vol 29, No 5.

Khalili, B., Jafaroghli, M., Farshad, A. and Paresh-khiavi, M. (2010). The effects of different concentrations of glycine and systeine on the freezability of Moghani ram spermatozoa. Asian-Aust. *Journal of Animal Science*, 23: 318-325.

Kozdrowski, P. (2009). The effect of trehalose on post-thaw viability and fertility of European brown hare (Lepus europaeus Pallas, 1778) spermatozoa. *Animal Reprodproduction Siencec*, 116: 326–334.

Li, G. (2005). Cryopreservation of reproductive cells tissue. Doctoral thesis. *University of science and technology of China*. Abstract.

Long, J.A. and Kramer, M. (2003). Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. *Poultry Science*, 82: 1802-1807.

Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J.G. and Casper, R.F. (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 13: 896-900.

Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T. and Cerolini, S. (2005). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*, 63: 411–421.

Oscar, G.P., Mosqueda, M.d.L.J. and Carvajal, S.U. (2009). Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology*, 58: 287–292.

Parks, J.E. and Graham, J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38: 209-223.

Revell, G. and Mrode, R.A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36: 77-86.

SAS. 1996. SAS/STAT Software: changes and enhancements through release 6. 12. SAS Institute Inc., Cary, NC, US.