نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۳۹۹؛ ۱۴(۱): ۳۳-۳۹.

تأثیر مدت زمان نگه‌داری اپیدیدیم‌های قوچ‌های کشتار شده در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بر تحرک اسپرم‌های جدا شده از آن‌ها پیش و پس از انجماد

ابراهیم احمدی[1*]، حسن نظری[1]، نجمه داودیان[1]

۱- استادیار، پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران

دریافت: ۱۸ اسفندماه ۹۶ **پذیرش:** ۲۲ خردادماه ۹۷

چکیده

اسپرم‌های استحصال شده از ناحیه دم اپیدیدیم دام‌های مرده یا کشتار شده و نیز انجماد آن‌ها، در حفاظت از گونه‌ها و نژادهای دامی در معرض خطر انقراض و حفظ ظرفیت ژنتیکی دام‌های نر پرارزشی که به صورت ناخواسته از گله حذف می‌شوند، دارای کاربردهای بالقوه فراوانی است. در این موارد معمولا بیضه‌های دام از لاشه جدا و به مرکزی که قابلیت جداسازی اسپرم و انجماد آن‌را دارد، ارسال می‌شود. با توجه به تأثیر گذشت زمان بر کیفیت اسپرم استحصال شده از اپیدیدیم در نژادهای مختلف گوسفند و نیز گونه‌های دیگر، هدف از مطالعه‌ی حاضر ارزیابی اثر نگه‌داری اپیدیدیم‌های جدا شده از بیضه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشتار دام بر تحرک و انجمادپذیری اسپرم اپیدیدیمی قوچ‌های نژاد لری بختیاری و مقایسه آن با زمان ۲ ساعت پس از کشتار بود. میزان تحرک کلی و حرکت پیش‌رونده در زمان ۲ ساعت به صورت معنی‌دار از زمان ۴۸ ساعت بیشتر بود ($P<0/05$). در سایر شاخص‌های کینماتیک به جز ضریب مستقیم بودن، به صورت معنی‌دار گروه ۲ ساعت بیشترین و گروه ۴۸ ساعت کمترین میزان را داشتند ($P<0/05$). پس از ذوب، حرکت پیش‌رونده و شاخص‌های سرعت گروه ۲ ساعت به صورت معنی‌داری از گروه ۴۸ ساعت بیشتر بود ($P<0/05$). با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کیفیت و انجماد پذیری اسپرم‌های اپیدیدمی گوسفند استحصال شده از اپیدیدیم‌های نگه‌داری شده در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد در زمان ۴۸ ساعت به صورت قابل توجهی کاهش یافته بود.

واژه‌های کلیدی: اسپرم اپیدیدیمی، اپیدیدیم جدا شده، انجماد، انجمادپذیری اسپرم، دمای نگه‌داری.

مقدمه

اسپرم اپیدیدیمی بعد از مرگ دام تا مدت قابل توجهی قابلیت باروری تخمک را دارد از این رو می‌توان از آن در حفاظت از نژادهای اهلی نادر و گونه‌های در معرض انقراض استفاده کرد (۱۷)، همچنین از اسپرم اپیدیدیمی دام‌های نر پرارزشی که دچار مرگ ناگهانی می‌شوند، نیز می‌توان برای حفظ ظرفیت ژنتیکی آن‌ها استفاده کرد. به منظور حفظ قابلیت باروری، اسپرم اپیدیدیمی جمع‌آوری شده باید در اسرع وقت استحصال و استفاده شود (۱۰). از این اسپرم رقیق شده می‌توان به صورت تازه یا پس از یک ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای تلقیح مصنوعی یا تولید آزمایشگاهی جنین استفاده کرد. نگه‌داری طولانی‌مدت این نمونه‌های اسپرم همانند اسپرم انزالی تنها در صورت منجمد کردن آن‌ها امکان‌پذیر است. اسپرم اپیدیدیمی دام‌های کشتار شده به دلیل در دسترس بودن و سهولت تهیه می‌تواند در پژوهش‌های گوناگون مرتبط با فیزیولوژی و یا کرایوبیولوژی اسپرم به کار گرفته شود، ازاین رو بهبود روند انجماد اسپرم اپیدیدیمی می‌تواند به حفظ گونه‌های در معرض خطر انقراض و گونه‌های با ارزش و ممتاز از لحاظ اقتصادی کمک زیادی کند (۳و ۱۷). انجماد اسپرم اپیدیدیمی همچنین امکان استفاده از اسپرم دام‌های با میل جنسی پایین و یا دام‌های با مسیر تناسلی آسیب‌دیده را نیز فراهم می‌کند (۱۰).

* پست الکترونیکی نویسنده مسؤول: eahmadi@sku.ac.ir

مطالعات فراوانی در زمینه اخذ اسپرم از ناحیه خلفی اپیدیدیم در گونه‌های مختلف و تأثیر شرایط نگه‌داری و نیز مدت زمان نگه‌داری پس از مرگ بر کیفیت اسپرم وجود دارد (۲, ۴, ۵, ۷, ۸ و۱۴). شرایط دمای نگه‌داری بیضه‌ها و مدت زمان نگه‌داری آن‌ها می‌تواند تأثیر عمده بر حیات و کیفیت اسپرم‌ها داشته باشد (۷). مسأله دما و زمان از این نظر حائز اهمیت است که مرگ دام‌ها به صورت ناخواسته و احتمالاً در فواصل دور از مراکز دارای قابلیت استخراج و انجماد اسپرم، رخ می‌دهد و حمل بیضه‌ها به این مراکز زمان‌بر خواهد بود. در مورد دمای نگه‌داری، نتایج نشانگر تأثیر مخرب دماهای بالاتر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد بر کیفیت اسپرم اپیدیدمی قوچ است (۷و ۹). سلول اسپرم پس از مرگ دام تا مدت زمان محدودی امکان زنده ماندن دارد و سپس به سرعت دچار دژنراسیون خواهد شد که در گونه‌های مختلف و نیز در قوچ نتایج متفاوتی در خصوص تأثیر مدت زمان نگه‌داری بیضه‌ها بر کیفیت اسپرم‌های استحصال شده، گزارش شده است (۶, ۷, ۱۵و ۱۹). مثلاً در قوچ تا ۲۴ ساعت پس از مرگ باروری نسبتاً مطلوب و تا ۴۸ ساعت زنده‌مانی مناسب (۷) و در گوزن تا ۴۸ ساعت کیفیت مطلوب اسپرم (۱۲) گزارش شده است.

با توجه به نقش اسپرم اپیدیدیمی در حفظ گونه‌های در معرض خطر، حراست از نژادهای کمیاب دام‌های اهلی و حفظ ظرفیت دام‌های نر پر ارزش و نیز حفظ تنوع ژنتیکی دام‌های اهلی، هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی تأثیر مدت زمان نگه‌داری این اندام‌ها در شرایط یخچال بر کیفیت و انجمادپذیری اسپرم‌های استحصال شده از آن‌ها بود.

مواد و روش کار

بیضه‌های ۱۰ قوچ (از هر قوچ یک بیضه) بالغ کشتار شده در کشتارگاه صنعتی جونقان در دمای محیط در مدت زمان حداکثر یک ساعت پس از کشتار به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پس از کنار زدن غشای تونیکا واژینالیس، ناحیه دم اپیدیدیم و مجرای دفران از بیضه جدا شد، سپس با قیچی ظریف و پنس تا حد امکان و بدون آسیب به مجاری در هم پیچیده‌ی اپیدیدیم، دیواره‌های جداکننده‌ی کلاف‌ها (epididymal septa) برش زده شد و دم اپیدیدیم گسترده گردید. جداسازی اسپرم‌ها در سه زمان ۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشتار و با ایجاد یک شکاف روی لوله‌ها با تیغ اسکالپل انجام شد. مایع اپیدیدیمی خارج شده از شکاف به محلول پایه انجماد (۳۰۰ میلی‌مول تریس، ۹۴/۷ میلی‌مول اسید سیتریک و ۲۷/۸ میلی مول گلوکز، PH حدود ۶/۸-۶/۹ و اسمولالیته حدود ۳۴۵-۳۵۰ میلی‌اسمول) حاوی ۲۰ درصد زرده‌ی تخم مرغ منتقل شد و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگه‌داری گردید. در هر تکرار نمونه‌های مربوط به سه زمان مورد نظر از یک اپیدیدیم واحد اخذ شد. بدین‌ترتیب که در همه ۱۰ بیضه شکاف زمان ۲ ساعت در قسمت نزدیک به قسمت بدنه اپیدیدیم (ابتدای دم اپیدیدیم گسترده شده)، شکاف زمان ۲۴ ساعت در قسمت وسط دم اپیدیدیم گسترده شده و شکاف زمان ۴۸ ساعت در قسمت نزدیک به مجرای دفران روی دم اپیدیدیم گسترده شده، ایجاد شد. مجرای دفران و قسمت برش زده شده با پنس خونبند مسدود و اپیدیدیم در یک تامپون خیس شده با سرم فیزیولوژی پیچیده شد و پس از قرار دادن در کیسه نایلونی در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. پس از ۳۰ دقیقه تحرک اسپرم‌ها به کمک سیستم آنالیز رایانه‌ای اسپرم (CASA) ارزیابی شد. در زمان ۲ ساعت پس از کشتار اگر تحرک کلی اسپرم بیش از ۷۰ درصد و حرکت پیش‌رونده بیش از ۵۵ درصد بود، از نمونه استفاده شد، در غیر این صورت نمونه دور انداخته شده و جداسازی اسپرم از اپیدیدم دیگری انجام شد.

پس از ارزیابی تحرک، نمونه‌های اسپرم منجمد شد. برای انجماد اسپرم‌ها، از رقیق‌کننده‌ی دارای ۶ درصد گلیسرول در محیط پایه‌ی انجماد حاوی ۲۰ درصد زرده‌ی تخم مرغ استفاده شد. سوسپانسیون اسپرم با غلظت 5×10^{7} سلول اسپرم در هر میلی‌لیتر به رقیق‌کننده آماده شده، اضافه گردید، سپس سوسپانسیون به دست آمده در نی‌های انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شده و انتهای نی‌ها با پودر PVA (Polyvinyl alcohol) مسدود شد و پس از قرار دادن آن‌ها در کیسه نایلونی در ظرف حاوی آب ۲۵

درجه سانتی‌گراد بـه صـورت افقـی در یخچـال قـرار داده شدند. پس از سپری شدن ۳ سـاعت، نـی‌هـا بـه فاصـله ۳ سانتی‌متر از سطح ازت مایع به مـدت ۱۰ دقیقـه در بخـار ازت قرار داده شده و سپس مستقیماً در ازت مایع فرو برده شدند. ذوب نی‌های اسپرم منجمـد شـده حـداقل ۱ هفتـه پس از انجماد و در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گـراد انجـام - شد. برای ذوب، نی‌ها بلافاصله پس از خـروج از ازت مـایع در ظرف حاوی آب ۶۵ درجه به مـدت ۶ ثانیـه فـرو بـرده شده و پـس از خشـک کـردن و بریـدن دو انتهـای آن‌هـا، محتویات آن‌ها در یـک میکروتیـوب تخلیـه شـد. در ایـن آزمایش در هر تکرار و برای هر زمان ۲ نی آماده و منجمد شد؛ هر کدام از این نـی‌هـای منجمـد شـده بـه صـورت جداگانه ذوب شده و ارزیابی شدند. میانگین نتـایج حاصـل از این دو ارزیابی به عنوان نتیجه‌ی هر تکرار در نظر گرفته شد.

بررسی تحرک اسپرم‌ها پیش از انجماد و پـس از ذوب با سیستم آنالیز رایان‌های اسپرم (CASA، ساخت شرکت هوشـمند فـن‌آور، ایـران) انجـام شـد. بـدین منظـور ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم روی لام گرم شده آنـالیز تحرک اسـپرم (Spermmeter، سـاخت شـرکت Sperm Processor Pvt. Ltd، هندوسـتان) ریختـه و لامـل مخصوص روی آن قرار داده شد. ایـن لام آنـالیز اسـپرم بـا داشتن پایه‌های مخصوص، فاصله ۱۰ میکرومتری بـین لام و لامل ایجاد می‌کند. برای هر نمونه، ۶ محدوده دیـد و بـا سـرعت ۲۰ فـریم در ثانیـه بـا عدسـی بـزرگ‌نمـایی ۴× میکروسکوپ بررسی شد. شاخص‌هـای حرکتـی بـه دسـت آمده با سیستم CASA به شرح ذیـل بـود: حرکـت کلـی (TM، ٪)، حرکت پیش‌رونـده (PM، ٪)، سـرعت خطـی- منحنـی (VCL، µm/s)، سـرعت خطـی (VSL، µm/s)، سرعت مسیر متوسط (VAP، µm/s)، متوسـط جابجـایی زاویه‌ای (MAD، درجه)، متوسط شدت جابجـایی جـانبی سر (ALH، µm)، فرکانس جابجـایی سـر (BCF، هرتـز)، ضریب خطی بودن (LIN، ٪)، ضریب جنبش (WOB، ٪) و ضریب مستقیم بودن (STR، ٪).

آنالیز آماری داده‌ها بـا نـرم‌افـزار آمـاری IBM-SPSS نسـخه ۲۲ انجـام شـد. داده‌هـای نسـبی ابتـدا بـا تبـدیل آرکسینوسی نرمال و سپس تحلیل شدند. داده‌هـا بـا مـدل آمـاری One-way ANOVA و بـه دنبـال آن تسـت تکمیلـی Duncan تحلیـل آمـاری و بـه صـورت mean±SEM گزارش شدند. تأثیر تحرک اولیه نمونـه‌هـا در زمان پیش از انجماد بر نتـایج انجمـاد بـا مـدل آمـاری آنـالیز کوواریـانس (ANCOVA) ارزیـابی شـد. اخـتلاف آماری در حد P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج تحرک کلی و تحرک پیش‌رونده اسپرم‌های جـدا شده از اپیدیدیم پـس از زمـان‌هـای مختلـف نگـه‌داری در جدول ۱ و نتایج شاخص‌های کینماتیک در جدول ۲ آورده شده است. همـان‌گونـه کـه مشـاهده مـی‌شـود نگـه‌داری اپیدیدیم به مدت ۴۸ ساعت سبب کاهش معنی‌دار تحرک و همه شاخص‌های کینماتیک به جز STR نسبت به زمان ۲ ساعت می‌شود (P<۰/۰۵)، همچنین در زمان ۲۴ ساعت برخی شاخص‌های کینماتیک نسبت بـه زمـان ۲ سـاعت و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵).

جدول ۱- تحرک کلی و حرکت پیش‌رونده اسپرم‌های جدا شده از اپیدیدیم‌های نگه‌داری شده در یخچال در زمان‌های مختلف پیش از انجماد.

ساعت پس از کشتار	TM	PM
۲	۸۲/۶±۲/۶۹[a]	۶۴/۳±۴/۱۰[a]
۲۴	۷۲/۹±۳/۵۷[ab]	۵۷/۰±۴/۰۶[a]
۴۸	۶۱/۰±۴/۹۵[b]	۴۱/۶±۳/۹۳[b]

[ab]در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست (P<۰/۰۵).
TM: حرکت کلی (٪)؛ PM: حرکت پیش‌رونده (٪)

جدول ۲- شاخص‌های کینماتیک اسپرم‌های جدا شده از اپیدیدیم‌های نگه‌داری شده در یخچال در زمان‌های مختلف پیش از انجماد.

ساعت پس از کشتار	VCL	VSL	VAP	MAD	ALH	BCF	LIN	WOB	STR
۲	۱۲۱/۶±۴/۶۱[a]	۵۰/۰±۳/۱۴[a]	۷۱/۵±۴/۹۳[a]	۴۴/۹±۴/۷۳[a]	۵/۹±۰/۱۸[a]	۴/۸±۰/۷۵[a]	۳۵/۶±۱/۵۷[a]	۵۵/۱±۱/۶۹[a]	۶۰/۸±۲/۴۳
۲۴	۱۰۱/۶±۶/۳۳[b]	۳۸/۷±۳/۱۳[b]	۵۴/۹±۳/۴۶[b]	۴۲/۲±۴/۱۸[a]	۵/۲±۰/۱۶[b]	۴/۶±۰/۵۸[a]	۳۲/۰±۱/۴۸[a]	۵۰/۶±۱/۲۱[a]	۵۹/۰±۱/۸۲
۴۸	۶۲/۵±۵/۸۵[c]	۱۸/۰±۲/۵۷[c]	۲۷/۹±۳/۴۵[c]	۲۸/۱±۳/۶۸[b]	۴/۱±۰/۲۳[c]	۲/۷±۰/۳۴[b]	۲۴/۶±۲/۷۰[b]	۴۲/۵±۲/۷۱[b]	۵۳/۸±۲/۷۸

[abc]در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست (P<۰/۰۵).
VCL: سرعت خطی-منحنی (µm/s)؛ VSL: سرعت خطی (µm/s)؛ VAP: سرعت مسیر متوسط (µm/s)؛ MAD: متوسط جابجایی زاویه‌ای (درجه)؛ ALH: متوسط شدت جابجایی جانبی سر (µm)؛ BCF: فرکانس جابجایی سر (هرتز)؛ LIN: ضریب خطی بودن (٪)؛ WOB: ضریب جنبش (٪) و STR: ضریب مستقیم بودن (٪).

نتایج تحرک کلی و تحرک پیش‌رونده اسپرم‌های منجمد- ذوب شده‌ی جداشده از اپیدیدیم پس از زمان-های مختلف نگه‌داری در جدول ۳ و نتایج شاخص‌های کینماتیک در جدول ۴ درج شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود حرکت پیش‌رونده، VCL، VSL و VAP در بین زمان‌های ۲ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵)، در بقیه شاخص‌ها اختلاف معنی‌دار بین گروه-ها مشاهده نشد. با در نظر گرفتن کیفیت اولیه نمونه‌ها به عنوان یک عامل مخدوش‌گر مشخص شد که نتایج انجماد اسپرم‌ها در هر سه زمان اختلاف آماری ندارد و اختلافات مشاهده شده در اثر اختلاف نمونه‌های اولیه بوده است.

جدول ۳- تحرک کلی و حرکت پیش‌رونده اسپرم‌های جدا شده از اپیدیدیم‌های نگه‌داری شده در یخچال در زمان‌های مختلف پس از انجماد و ذوب

ساعت پس از کشتار	TM	PM
۲	۵۴/۰±۳/۶۰	۴۰/۷±۴/۱۴[a]
۲۴	۴۷/۳±۴/۹۰	۳۳/۳±۴/۴۷[ab]
۴۸	۴۲/۹±۴/۲۳	۲۵/۴±۴/۱۰[b]

TM: حرکت کلی (٪)؛ PM: حرکت پیش‌رونده (٪)

جدول ۴- شاخص‌های کینماتیک اسپرم‌های جدا شده از اپیدیدیم‌های نگه‌داری شده در یخچال در زمان‌های مختلف پس از انجماد و ذوب

ساعت پس از کشتار	VCL	VSL	VAP	MAD	ALH	BCF	LIN	WOB	STR
۲	۶۱/۷±۵/۹۶[a]	۲۹/۰±۴/۷۳[a]	۳۸/۲±۵/۱۴[a]	۱۹/۱±۳/۰۸	۳/۸±۰/۱۷	۲/۵±۰/۳۸	۳۲/۴±۲/۹۷	۵۱/۴±۲/۷۸	۵۵/۴±۳/۲۰
۲۴	۵۴/۴±۳/۵۳[ab]	۲۰/۳±۳/۸۹[ab]	۲۸/۳±۳/۲۵[ab]	۱۷/۸±۲/۲۵	۳/۶±۰/۱۴	۲/۰±۰/۲۷	۲۵/۵±۲/۶۷	۴۳/۸±۲/۵۳	۵۲/۱±۲/۱۵
۴۸	۴۲/۵±۳/۶۳[b]	۱۳/۶±۲/۵۷[b]	۱۹/۵±۲/۸۰[b]	۱۴/۹±۱/۶۷	۳/۵±۰/۱۵	۱/۶±۰/۳۰	۲۶/۵±۲/۴۱	۴۵/۴±۲/۸۷	۵۲/۹±۱/۵۵

[ab]در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست (P<۰/۰۵)
VCL: سرعت خطی-منحنی (µm/s)؛ VSL: سرعت خطی (µm/s)؛ VAP: سرعت مسیر متوسط (µm/s)؛ MAD: متوسط جابجایی زاویه‌ای (درجه)؛ ALH: متوسط شدت جابجایی جانبی سر (µm)؛ BCF: فرکانس جابجایی سر (هرتز)؛ LIN: ضریب خطی بودن (٪)؛ WOB: ضریب جنبش (٪) و STR: ضریب مستقیم بودن (٪).

بحث

اسپرم‌های استحصال شده از ناحیه دم اپیدیدیم دام-های مرده و کشتار شده و نیز انجماد آن‌ها در حفاظت از گونه‌ها و نژادهای دامی در معرض خطر انقراض و نیز در حفظ ظرفیت ژنتیکی دام‌های نر پرارزشی که به صورت ناخواسته از گله حذف می‌شوند دارای کاربردهای بالقوه فراوانی است (۷). در این موارد معمولاً بیضه‌ی دام از لاشه جدا شده و به مرکزی ارسال می‌شود که قابلیت جداسازی اسپرم و انجماد آن را دارد که این مسئله با گذشت زمان همراه است. با توجه به تأثیر گذر زمان بر کیفیت اسپرم استحصال شده از اپیدیدیم در گونه‌های دیگر و نیز بر نژادهای دیگر گوسفند، هدف از مطالعه‌ی حاضر ارزیابی اثر نگه‌داری اپیدیدیم‌های جدا شده از بیضه در یخچال (دمای ۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشتار دام بر تحرک و انجمادپذیری اسپرم اپیدیدیمی قوچ‌های نژاد لری بختیاری بود. نتایج نشان داد که با نگه-داری اپیدیدیم در یخچال میزان تحرک و شاخص‌های کینماتیک اسپرم‌ها استحصال شده کاهش یافت و با افزایش زمان نگه‌داری این کاهش در مقایسه با زمان ۲ ساعت پس از کشتار مشهودتر بود (جداول ۱ و۲)، همچنین انجمادپذیری اسپرم‌ها در زمان ۴۸ ساعت نسبت به زمان ۲ ساعت کمتر بود.

به‌طور مطلوب اسپرم اپیدیدیمی باید بلافاصله پس از مرگ دام از اپیدیدیم جدا و برای تلفیح مصنوعی یا انجماد استفاده شود (۱۷)؛ زیرا افزایش فاصله استخراج و مرگ دام سبب کاهش قابل توجه کیفیت و باروری آن‌ها می‌شود (۱۱). با این‌حال عملاً در بسیاری از موارد دام‌های مرده بلافاصله پس از مرگ کشف نمی‌شوند، نیاز به حمل بیضه-ها به مراکزی وجود دارد که توانایی استخراج و انجماد اسپرم‌ها در آن‌ها وجود دارد و یا امکان استفاده و انجماد فوری اسپرم‌ها وجود ندارد. از این رو نیاز به نگه‌داری بیضه‌ها یا اپیدیدیم‌های جدا شده تا مدت‌زمان‌های طولانی پس از کشتار وجود دارد (۱۳). به صورت کلی گفته شده است که این اسپرم‌ها در صورت نگه‌داری بیضه و یا اپیدیدیم جدا شده در شرایط یخچال و یا در صورتی که بلافاصله از بیضه جدا شوند بسته به گونه‌ی دام تا چند روز قابلیت تحرک، انجمادپذیری و حتی باروری خود را می-توانند حفظ کنند (۱ و ۱۷)، در این میان یکی از عوامل اصلی مؤثر بر کیفیت اسپرم‌های استحصال شده از اپیدیدیم، دمای نگه‌داری بیضه‌هاست به صورتی که با نگه-داری بیضه‌ها در دمای اتاق، مدت زمانی که اسپرم متحرک از اپیدیدیم قابل جداسازی است بسیار کمتر از مدت زمانی است که نگه‌داری در دمای یخچال انجام شود (۱۲)، از این رو در مطالعه حاضر اپیدیدیم‌های جدا شده تا زمان ۴۸ ساعت در یخچال نگه‌داری شدند. کاهش کیفیت اسپرم اپیدیدیمی طی ذخیره پس از مرگ، نه تنها ناشی از پیر شدن اسپرم است، بلکه می‌تواند به دلیل اضمحلال ذاتی بافت‌ها پس از مرگ نیز باشد (۱۲). این تغییرات چند ساعت پس از مرگ در لوله‌های اپیدیدیم با تغییرات دژنراتیو سلول‌ها و پیکنوز محتوای آن‌ها به داخل لومن آغاز شده و به تخریب اپیتلیوم منتهی می‌شود (۶ و ۱۶). افزایش اسمولالیته و تغییرات pH مایع اپیدیدیمی متعاقب تغییرات بافتی اپیتلیوم رخ می‌دهد که یکی از دلایل کاهش کیفیت اسپرم‌های ذخیره شده، است (۱۲). سرعت تغییرات پس از مرگ در سلول‌های اپیدیدیم در دماهای پایین تا حد قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد، از این رو نگه‌داری اپیدیدیم‌ها در یخچال سبب حفظ طولانی‌تر کیفیت اسپرم‌های درون آن‌ها نسبت به دمای اتاق می‌شود.

در مطالعه حاضر به موازات کاهش کیفیت اسپرم‌های تازه استحصال شده از اپیدیدیم‌ها در اثر تأثیر زمان ذخیره‌سازی، انجمادپذیری آن‌ها به‌ویژه در زمان ۴۸ ساعت کاهش یافته بود (جداول ۳ و ۴). تحرک کلی اسپرم‌های منجمد-ذوب شده در سه زمان این آزمایش اختلاف معنی‌دار نداشت؛ لیکن حرکت پیش‌رونده و شاخص‌های سرعت در زمان ۴۸ ساعت نسبت به زمان ۲ ساعت، دچار کاهش معنی‌دار شده بودند؛ این کاهش احتمالاً با اختلالات محیط اپیدیدیم ناشی از تغییرات پس از مرگ که در این ساختار به وقوع می‌پیوندد، مرتبط بوده است (۱۲). کاهش کیفیت اسپرم‌ها پس از نگه‌داری طولانی‌مدت اپیدیدیم قوچ‌های نژاد لری بختیاری در مطالعه حاضر به‌ویژه کاهش انجمادپذیری آن‌ها همانند

نتـایج حاصـل شـده در نـژاد Churra (۷) بـود و نمایانگر این است که حداکثر تا ۲۴ سـاعت پـس از مـرگ دام باید انجماد اسپرم‌های اپیدیـدیمی انجـام شـود؛ البتـه نشان داده شده است که بخشی از این کاهش با تغییراتـی که در محلول‌های انجماد ایجاد می‌شود قابل جبران اسـت. افزایش اسمولالیته محلـول پایـه انجمـاد از ۳۲۰ بـه ۳۷۰ میلی‌اسمول تا حدی موجب بهبود نتایج انجماد اسپرم‌های استحصال شده از اپیدیدیم‌های نگه‌داری شده به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت شـد (۱۷)، همچنـین نگـه‌داری اسـپرم‌هـای استخراج شده از اپیدیدیم در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بـه جـای نگـه‌داری اپیدیـدیم، بـه حفـظ بهتـر کیفیـت و انجمادپذیری اسپرم‌ها منجر شده بود (۱۷ و ۱۸).

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجـه‌گیـری کرد که کیفیـت و انجمـادپـذیری اسـپرم‌هـای اپیدیـدمی گوسفند استحصال شده از اپیدیدیم‌های نگه‌داری شـده در یخچـال در زمـان ۲۴ سـاعت پـس از کشـتار دام تفـاوت چندانی با زمان ۲ ساعت ندارد؛ ولـی در زمـان ۴۸ سـاعت کاهش می‌یابد، از این‌رو اتخاذ روش‌های دیگر برای بهبـود انجمادپذیری و کیفیت آن‌ها نظیر تغییر در رقیق‌کننده‌هـا محلول‌های انجماد در مواقعی که امکان استفاده یا انجمـاد آن‌ها تا ۲۴ ساعت پس از مرگ دام وجود نـدارد، ضـروری به نظر می‌رسد.

منابع

1- Abella, D.F.; Da Costa, M.; Guerin, Y. and Dacheux, J.L.; Fertility of undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4 degrees C. Animal; 2015; 9(2): 313-9.
2- Anel, L.; Gomes-Alves, S.; Alvarez, M.; Borragan, S.; Anel, E.; Nicolas, M.; Martinez-Pastor, F. and De Paz, P.; Effect of basic factors of extender composition on post-thawing quality of brown bear electroejaculated spermatozoa. Theriogenology; 2010; 74(4): 643-651.
3- Benhenia, K.; Lamara, A.; Fatmi, S. and Iguer-Ouada, M.; Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. Small Rumin. Res.; 2016; 141(Supplement C): 29-35.
4- Fournier-Delpech, S.; Colas, G.; Courot, M.; Ortavant, R.; Brice, G.; Cornu, C.; Guérin, Y. and Lebreton, Y. Epididymal sperm maturation in the ram: motility, fertilizing ability and embryonic survival after uterine artificial insemination in the ewe. in Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique. 1979. EDP Sciences.
5- Hewitt, D.; Leahy, R.; Sheldon, I. and England, G.; Cryopreservation of epididymal dog sperm. Anim. Reprod. Sci.; 2001; 67(1-2): 101-111.
6- Hishinuma, M.; Suzuki, K. and Sekine, J.; Recovery and cryopreservation of sika deer (Cervus nippon) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. Theriogenology; 2003; 59(3): 813-820.
7- Kaabi, M.; Paz, P.; Alvarez, M.; Anel, E.; Boixo, J.C.; Rouissi, H.; Herraez, P. and Anel, L.; Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. Theriogenology; 2003; 60(7): 1249-59.
8- Kikuchi, K.; Nagai, T.; Kashiwazaki, N.; Ikeda, H.; Noguchi, J.; Shimada, A.; Soloy, E. and Kaneko, H.; Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 C. Theriogenology; 1998; 50(4): 615-623.
9- Lone, F.; Islam, R.; Khan, M. and Sofi, K.; Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. Anim. Reprod. Sci.; 2011; 123(1-2): 54-59.

10- Lone, F.A.; Islam, R.; Khan, M.Z. and Sofi, K.A.; Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. Anim. Reprod. Sci.; 2011; 123(1-2): 54-9.
11- Martinez-Pastor, F.; Martinez, F.; Garcia-Macias, V.; Esteso, M.C.; Anel, E.; Fernandez-Santos, M.R.; Soler, A.J.; de Paz, P.; Garde, J. and Anel, L.; A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. Theriogenology; 2006; 66(5): 1165-72.
12- Martínez-Pastor, F.; Guerra, C.; Kaabi, M.; Diaz, A.; Anel, E.; Herraez, P.; De Paz, P. and Anel, L.; Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. Theriogenology; 2005; 63(1): 24-40.
13- Sankai, T.; Tsuchiya, H. and Ogonuki, N.; Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. Theriogenology; 2001; 55(8): 1759-1768.
14- Santiago-Moreno, J.; Toledano-Díaz, A.; Pulido-Pastor, A.; Gómez-Brunet, A. and López-Sebastián, A.; Birth of live Spanish ibex (Capra pyrenaica hispanica) derived from artificial insemination with epididymal spermatozoa retrieved after death. Theriogenology; 2006; 66(2): 283-291.
15- Soler, A.J. and Garde, J.J.; Relationship between the characteristics of epididymal red deer spermatozoa and penetrability into zona-free hamster ova. J. Androl.; 2003; 24(3): 393-400.
16- Songsasen, N.; Tong, J. and Leibo, S.; Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. J. Exp. Zool.; 1998; 280(2): 189-196.
17- Tamayo-Canul, J.; Alvarez, M.; Mata-Campuzano, M.; Alvarez-Rodriguez, M.; de Paz, P.; Anel, L. and Martinez-Pastor, F.; Effect of storage method and extender osmolality in the quality of cryopreserved epididymal ram spermatozoa. Anim. Reprod. Sci.; 2011; 129(3-4): 188-99.
18-Tamayo-Canul, J.; Alvarez, M.; López-Urueña, E.; Nicolas, M.; Martinez-Pastor, F.; Anel, E.; Anel, L. and De Paz, P.; Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. Anim. Reprod. Sci.; 2011; 126(1-2): 76-82.
19-Yu, I. and Leibo, S.; Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 C. Theriogenology; 2002; 57(3): 1179-1190.

Vol.14/No.1
Spring-Summer 2020

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2020; 14(1): 33-39.

The effect of storage time of the slaughtered rams epididymes at 5˚C on the motility of isolated spermatozoa pre and post-freezing

Ahmadi, E.[1*]; Nazari, H.[1]; Davoodian, N.[1]

1. Assistant Professor, Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.

Received: 8 March 2019 ***Accepted:*** 11 June 2019

Summary

Spermatozoa recovered from the cauda epididymis of dead or slaughtered animals have many potential applications in the conservation of endangered species and breeds and also in the preserving the genetic potential of valuable males that un-intentionaly culed from herds. In these cases, the animal's testes are usually isolated from the carcase and sent to the centers capable of recovering and freezing epididymal spermatozoa. Considering the effect of post-mortem time length on the quality of recovered spermatozoa in different sheep breds and other species, this study was aimed to evaluate the influence of storing isolated epididymes of Lori-Bakhtiary rams for 24 and 48 h post-slaughter at 5 ˚C on the motility and freezablity of spermatozoa recovered at these timepoints in comparison with these parameters on 2 h post-slaughter. Before freezing, the rates of total and progresive motility on 2 h post- slaughterwere significantly higher than those of 48 h ($P<0.05$). Other kinemetic parameters, except for STR, were significantly different between groups ($P<0.05$). After thawing, the progressive motility and velocity parameters of 2 h group were significantly higher than that of 48 h group ($P<0.05$). In conclusion, the quality and freezability of ovine epididymal spermatozoa recovered from epididymes stored in refrigarator for 48 h had considerably decreased.

Keywords: Epididymal spermatozoa, isolated epididymis, Cryopreservation**,** spermatozoa freezability, storage temperature.

* Corresponding Author E-mail: eahmadi@sku.ac.ir