

تأثیر افزودن پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌گلیکول به رقیق‌کننده‌ی نگه‌داری اسپرم اپیدیدیمی قوچ بر فراسنجه‌های حرکتی در دمای یخچال

زینب هادی^۱، ابراهیم احمدی^{۲*}، ناصر شمس اسفندآبادی^{۳،۲}، نجمه داودیان^۲، ابوالفضل شیرازی^{۴،۲}

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۴. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه ابن سینا، تهران- ایران.

چکیده

دریافت: ۵ تیرماه ۱۴۰۱ پذیرش: ۱۵ مهرماه ۱۴۰۱

استفاده از اسپرم اپیدیدیمی روشی مناسب برای حفظ ذخایر ژنتیکی حیوانات به خصوص حیوانات در معرض انقراض است. از مزایای این روش تهیه اسپرم از بقایای کشتارگاهی است. پژوهش حاضر به بررسی اثر محافظتی غلظت‌های مختلف پلی‌وینیل‌الکل (PVA) و پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) بر اسپرم اپیدیدیمی گوسفند، در شرایط نگه‌داری در حالت مایع در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد طی ۲۴ ساعت می‌پردازد. اسپرم‌های جدا شده از دم اپیدیدیم بیضه قوچ‌های کشتار شده، در رقیق‌کننده‌های حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پلی‌وینیل‌الکل یا پلی‌اتیلن‌گلیکول قرار گرفتند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای یخچال نگه‌داری شدند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پس از ۲۴ ساعت، اکثر شاخص‌های حرکتی نسبت به گروه شاهد در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PVA به صورت معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0/05$). در بین غلظت‌های مختلف PVA، کمترین تحرک در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده گردید. افزودن PEG به محیط رقیق‌کننده اسپرم در غلظت‌های مختلف بر اکثر شاخص‌های حرکتی اثر معنی‌داری نداشت. هر دو ترکیب در غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای اسپرم‌ها کشنده بودند.

واژه‌های کلیدی: تحرک اسپرم، PVA، PEG، شوک سرمایی

مقدمه

دارد (۱۵). اسپرم اپیدیدیمی مدت زمان کوتاهی خارج از بدن زنده می‌ماند و به سرعت از بین می‌رود، بنابراین پس از نمونه‌برداری باید به سرعت به آزمایشگاه منتقل شود (۹).

با توجه به آن که فرایند انجماد- یخ‌گشایی آسیب‌های جدی به اسپرم وارد می‌کند و به‌دنبال آن کاهش باروری وجود دارد، به نظر می‌رسد که نگه‌داری کوتاه مدت اسپرم در دمای سرد یخچال می‌تواند راه حل جایگزینی برای این مشکل در تلقیح مصنوعی در گوسفند باشد (۱۲). بدین منظور از محلول‌هایی برای رقیق‌کردن و نگه‌داری نمونه‌های اسپرم استفاده می‌شود. هدف از اضافه‌کردن این رقیق‌کننده‌ها، تامین انرژی مورد نیاز

اسپرم اپیدیدیمی منبع بیولوژیک مهمی برای گامت‌های حیوانات دارای ارزش اصلاحی بالا و گونه‌های تحت انقراض است. در حیوانات نری که دارای ارزش اصلاحی بالا و در معرض انقراض هستند و نیز به‌دلیل آسیب‌دیدگی و یا مرگ ناگهانی و یا دلایل دیگر امکان اسپرم‌گیری از طریق انزال از آن‌ها میسر نباشد، استفاده از اسپرم اپیدیدیمی راه حل جایگزین است (۷). اسپرم اپیدیدیمی از ناحیه دم اپیدیدیم گرفته می‌شود و می‌توان از آن در تلقیح مصنوعی یا لقاح آزمایشگاهی استفاده کرد. گزارش‌ها نشان می‌دهد که اسپرم اپیدیدیمی توانایی باروری تخمک و تولید جنین‌های سالم تا مرحله تولد را



با توجه به اهمیت اسپرم اپیدیدیمی در حفظ توانایی ژنتیکی دام‌های پرارزش، مطالعه حاضر به منظور ارتقای روش‌های نگهداری اسپرم در شرایط سرد انجام شد. در این راستا، اثرات افزودن سطوح مختلف پلی‌وینیل‌الکل و پلی‌اتیلن‌گلاکول به رقیق‌کننده تریس-سیتریک اسید-زرده‌ی تخم مرغ بر خصوصیات حرکتی اسپرم اپیدیدیمی قوچ در شرایط سرد بررسی شد.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی استفاده شده در این مطالعه از شرکت Sigma تهیه شد. بیضه‌های قوچ به صورت روزانه از کشتارگاه صنعتی جوققان از قوچ‌های کشتار شده جمع‌آوری و با فلاسک در کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. پس از جدا کردن اپیدیدیم از لایه تونیکا آلبوزینه و حذف بافت‌های زائد، قسمت دم اپیدیدیم با تیغ اسکالپل در قسمت‌های فاقد رگ‌های خونی برش داده شد و با فشار بر دم اپیدیدیم مایع سرشار از اسپرم به میکروتیوب حاوی ۳۰۰ μL رقیق‌کننده پایه (۳۰۰ میلی مول تریس، ۹۴/۷ میلی‌مول اسید سیتریک و ۲۷/۸ میلی‌مول فروکتوز با PH ۶/۹ - ۶/۸ و اسمولالیت ۳۵۰-۳۴۵ میلی‌اسمول) حاوی ۲۰٪ زرده‌ی تخم مرغ منتقل شد. پس از ۱۰ دقیقه میزان جنبایی نمونه‌ها با دستگاه CASA (هوشمند فناوری تهران-ایران) سنجیده شد. در صورت مناسب بودن تحرک کلی (بیش از ۷۰ درصد) به منظور کاهش اثر فردی بر نتیجه انجماد، نمونه اسپرم اپیدیدیمی استخراج شده از سه بیضه مختلف با هم مخلوط و پس از شمارش در فرآیند مطالعه، استفاده شد. این مطالعه در پنج تکرار به انجام رسید.

اسپرم‌ها در رقیق‌کننده پایه حاوی ۲۰ درصد زرده‌ی تخم مرغ که دارای غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پلی‌وینیل‌الکل (وزن مولکولی ۳۰۰۰-۷۰۰۰) یا پلی‌اتیلن‌گلاکول (وزن مولکولی ۶۰۰۰) بود، با غلظت $10^7 \times 12$ سلول اسپرم رقیق شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت، هر یک از نمونه‌ها ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بعد از

سلول‌های اسپرم، حفاظت سلول‌ها از آسیب‌های دمایی، کاهش تنش‌های فیزیکی و شیمیایی ناشی از سردکردن و انجماد سلول‌های اسپرم و در نهایت ایجاد یک محیط مناسب برای زنده ماندن اسپرم‌هاست (۲).

رقیق‌کننده‌های نگهداری اسپرم در گوسفند غالباً مبتنی بر سیستم بافری تریس-اسید سیتریک هستند و گلوکز یا فروکتوز به عنوان تعدیل‌کننده اسمزی به آن‌ها افزوده می‌شود، همچنین، زرده‌ی تخم مرغ به منظور حفاظت از اسپرم در مقابل شوک سرمایی به رقیق‌کننده‌ها افزوده می‌شود (۱۴). با وجود مزایا و سابقه طولانی تلقیح مصنوعی با اسپرم سرد شده در گوسفند، هنوز نتایج این روش نسبت به جفت‌گیری طبیعی قابل قبول نیست. یکی از دلایل این مسأله، کاهش کیفیت و قابلیت حیاتی اسپرم در زمان نگهداری است (۱۲)، بنابراین ارتقای رقیق‌کننده‌های اسپرم می‌تواند به بهبود نتایج نگهداری اسپرم در شرایط سرد منجر شود. نشان داده شده است که افزودن برخی ترکیبات پلیمری به رقیق‌کننده‌های اسپرم می‌تواند اثرات مفیدی بر بقای اسپرم متعاقب انجماد و ذوب و نیز نگهداری در شرایط سرد داشته باشد.

پلی‌وینیل‌الکل (PVA) یک پلیمر مصنوعی است که با حذف استات طی هیدرولیز پلی‌وینیل استات به وجود می‌آید. گزارش‌هایی در خصوص استفاده از این پلیمر به عنوان ضد یخ و اثرات فیزیولوژیک آن ارائه شده است (۱۰). مهم‌ترین خصوصیت پلی‌وینیل‌الکل نسبت به بقیه ضد یخ‌های پروتئینی مصنوعی، خاصیت ممانعت از تبلور مجدد بلورهای یخ است. این ضد یخ بر نقطه ذوب اثری ندارد (۴). این خصوصیت باعث شده از پلی‌وینیل‌الکل به عنوان یک ضد یخ در انجماد اسپرم استفاده شود (۸).

پلی‌اتیلن‌گلاکول (PEG) یک پلیمر اسموتیک است که قدرت هیدراته شدن آن بسیار زیاد است. وقتی به صورت محلول در کنار سلول قرار می‌گیرد، نمی‌تواند وارد سول شود، اما می‌تواند غشای سلولی را دهیدراته کند (۱). پلی‌اتیلن‌گلاکول با جذب آب، باعث افزایش غلظت مواد داخل سلول می‌گردد، در نتیجه سلول را از آسیب‌های دمای سرد حفظ می‌کند و به همین دلیل از آن به عنوان ضد یخ در ذخیره بعضی از سلول‌ها در حالت منجمد استفاده شده است (۱۳).



خط متوسط (BCF، هرتز)، ضریب خطی بودن (LIN، %)، ضریب جنبش (WOB، %) و ضریب مستقیم بودن (STR، %).

تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار IBM SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. ابتدا داده‌های نسبی با استفاده از تبدیل آرک‌سینوسی نرمال گردید و مقایسه میانگین گروه‌های مختلف با روش آماری آنوای یک‌طرفه مقایسه شدند. در صورت مشاهده اختلاف معنی‌دار، از آزمون تکمیلی توکی برای مقایسه گروه‌ها استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (Mean \pm SEM) گزارش شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج تحرک کلی و تحرک پیش‌رونده‌ی اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی در جدول ۱ و نتایج شاخص‌های کینماتیک در جدول ۲ درج شده است.

آن بررسی تحرک نمونه‌ها انجام گرفت. بررسی تحرک اسپرم‌ها با سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (CASA) انجام شد. بدین منظور ۸ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم روی لام گرم شده (Spermmeter ساخت شرکت Sperm Processor PVT Ltd ، هندوستان) قرار داده شده و لامل مخصوص روی آن قرار گرفت. این لام با داشتن پایه‌های مخصوص، فاصله ۱۰ میکرومتری بین لام و لامل ایجاد می‌کند. برای هر نمونه، ۳ محدوده‌ی دید و با سرعت ۳۰ فریم در ثانیه در زیر میکروسکوپ (با بزرگنمایی $\times 4$) بررسی شد. شاخص‌های حرکتی به‌دست آمده با سیستم CASA به شرح ذیل بود:

حرکت کلی (TM، %)، حرکت پیش‌رونده (PM، %)، سرعت خطی - منحنی (VCL، $\mu\text{m/s}$)، سرعت خطی (VSL، $\mu\text{m/s}$)، سرعت مسیر متوسط (VAP، $\mu\text{m/s}$)، متوسط جابجایی زاویه‌ای (MAD، درجه)، متوسط شدت جابجایی جانبی سر (ALH، μm)، فرکانس گذر سر از

جدول ۱- مقادیر شاخص‌های تحرک کلی و حرکت پیش‌رونده‌ی اسپرم‌ها در رقیق‌کننده‌های حاوی غلظت‌های مختلف PVA و PEG طی نگاه‌داری در شرایط سرد به مدت ۲۴ ساعت

گروه‌ها	حرکت کلی (درصد)	حرکت پیش‌رونده (درصد)
تازه	۸۵/۳ \pm ۲/۶۳	۷۰/۳ \pm ۲/۴۰
شاهد	۵۴/۲ \pm ۳/۶۹ ^{ab}	۴۰/۳ \pm ۲/۷۷ ^{ab}
PVA ۰/۵	۷۶/۱ \pm ۲/۱۳ ^c	۵۷/۰ \pm ۲/۲۴ ^c
PVA ۱	۶۴/۸ \pm ۲/۲۶ ^{bc}	۴۷/۱ \pm ۴/۱۱ ^{bc}
PVA ۲	۶۵/۸ \pm ۳/۱۰ ^{bc}	۴۷/۹ \pm ۳/۴۲ ^{bc}
PVA ۵	۶۶/۶ \pm ۱/۲۲ ^{bc}	۴۸/۱ \pm ۱/۴۳ ^{bc}
PVA ۱۰	۵۵/۲ \pm ۲/۱۵ ^{ab}	۳۸/۲ \pm ۲/۵۱ ^{ab}
PEG ۰/۵	۶۴/۸ \pm ۳/۲۳ ^{bc}	۴۷/۵ \pm ۳/۷۱ ^{bc}
PEG ۱	۶۳/۱ \pm ۱/۴۳ ^{bc}	۴۶/۳ \pm ۱/۲۷ ^{bc}
PEG ۲	۶۰/۸ \pm ۳/۵۱ ^{ab}	۴۶/۴ \pm ۲/۸۵ ^{bc}
PEG ۵	۵۹/۷ \pm ۲/۲۲ ^{ab}	۴۵/۰ \pm ۱/۹۹ ^{bc}
PEG ۱۰	۴۷/۸ \pm ۲/۰۳ ^a	۳۰/۳ \pm ۲/۰۰ ^a

^{abc}حروف غیر مشترک در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست ($P < 0/05$).
داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (Mean \pm SEM) نشان داده شده‌است





جدول ۲- شاخص‌های کینماتیک اسپرم‌ها در رقیق‌کننده‌های حاوی غلظت‌های مختلف PVA و PEG طی ۲۴ ساعت نگهداری در شرایط سرد

گروه‌ها	VCL	VSL	VAP	MAD	ALH	BCF	LIN	WOB	STR
تازه	۹۷/۲±۵/۲۰	۴۵/۵±۳/۲۴	۶۰/۱±۳/۸۱	۳۹/۳±۲/۰۴	۵/۳±۰/۱۷	۵/۲±۰/۴۰	۴۲/۰±۱/۶۵	۵۹/۴±۱/۲۷	۶۴/۲±۱/۴۷
شاهد	۵۲/۷±۳/۹۱ ^{abc}	۱۸/۶±۱/۶۳ ^{abc}	۲۷/۷±۲/۲۲ ^{abc}	۲۰/۱±۲/۱۲ ^{abc}	۴/۰±۰/۱۹ ^{ab}	۲/۴±۰/۵۱ ^{ab}	۲۷/۸±۰/۸۰ ^{ab}	۴۷/۲±۰/۶۳ ^a	۵۰/۶±۱/۲۸ ^{ab}
PVA۰/۵	۷۴/۶±۳/۷۵ ^c	۲۷/۳±۱/۸۹ ^d	۴۰/۵±۲/۳۹ ^d	۳۱/۵±۲/۰۴ ^d	۴/۸±۰/۱۲ ^c	۴/۳±۰/۴۴ ^c	۳۳/۱±۰/۵۲ ^b	۵۳/۰±۰/۵۴ ^b	۵۷/۴±۰/۵۹ ^b
PVA۱	۶۴/۸±۲/۱۵ ^{de}	۲۱/۹±۱/۳۹ ^{cd}	۳۳/۷±۱/۸۹ ^{bcd}	۲۶/۸±۰/۷۳ ^{bcd}	۴/۵±۰/۱۱ ^{bc}	۳/۴±۰/۳۸ ^{abc}	۲۹/۰±۲/۰۹ ^{ab}	۵۰/۳±۲/۶۹ ^b	۵۳/۳±۲/۳۳ ^{ab}
PVA۲	۶۷/۲±۲/۹۱ ^{cde}	۲۳/۷±۲/۰۳ ^{cd}	۳۴/۷±۲/۳۰ ^{bcd}	۲۸/۹±۱/۱۶ ^{cd}	۴/۶±۰/۱۳ ^{bc}	۳/۶±۰/۴۱ ^{abc}	۳۰/۴±۱/۴۷ ^b	۴۸/۷±۱/۴۱ ^{ab}	۵۵/۳±۱/۲۶ ^b
PVA۵	۶۹/۱±۲/۰۶ ^{de}	۲۳/۷±۱/۴۵ ^{cd}	۳۵/۱±۱/۳۱ ^{cd}	۳۰/۶±۱/۱۵ ^d	۴/۷±۰/۰۷ ^c	۳/۹±۰/۱۶ ^{bc}	۲۹/۷±۱/۱۶ ^b	۴۸/۶±۰/۷۶ ^{ab}	۵۴/۸±۱/۵۷ ^b
PVA۱۰	۴۹/۵±۱/۵۳ ^{ab}	۱۵/۰±۱/۱۲ ^{ab}	۲۴/۷±۰/۸۲ ^{ab}	۱۸/۷±۱/۳۷ ^{ab}	۴/۰±۰/۱۰ ^{ab}	۲/۵±۰/۰۹ ^{ab}	۲۶/۹±۱/۷۸ ^{ab}	۴۶/۶±۱/۶۵ ^{ab}	۵۱/۵±۲/۰۵ ^{ab}
PEG۰/۵	۶۶/۰±۳/۱۶ ^{cde}	۲۲/۹±۲/۳۵ ^{cd}	۳۴/۴±۲/۵۲ ^{bcd}	۲۸/۳±۱/۶۵ ^{cd}	۴/۵±۰/۱۱ ^{bc}	۳/۵±۰/۴۵ ^{abc}	۲۸/۶±۲/۲۲ ^{ab}	۴۷/۸±۱/۶۵ ^{ab}	۵۲/۱±۲/۶۸ ^{ab}
PEG۱	۶۲/۸±۴/۴۹ ^{bcd}	۲۱/۹±۱/۱۲ ^{bcd}	۳۲/۴±۱/۶۹ ^{bcd}	۲۶/۵±۳/۵۹ ^{bcd}	۴/۴±۰/۱۹ ^{bc}	۳/۷±۰/۳۶ ^{abc}	۲۸/۲±۰/۴۴ ^{ab}	۴۷/۱±۰/۹۵ ^{ab}	۵۲/۳±۰/۶۷ ^{ab}
PEG۲	۶۰/۷±۴/۳۶ ^{bcd}	۲۲/۰±۲/۰۰ ^{bcd}	۳۲/۱±۲/۶۸ ^{bcd}	۲۴/۵±۱/۹۹ ^{abcd}	۴/۳±۰/۱۵ ^{abc}	۳/۱±۰/۴۳ ^{abc}	۳۰/۷±۱/۳۸ ^b	۵۰/۲±۱/۲۷ ^b	۵۵/۷±۲/۲۸ ^b
PEG۵	۵۹/۱±۳/۰۲ ^{abcd}	۲۰/۶±۱/۲۲ ^{bcd}	۳۰/۶±۱/۵۴ ^{bc}	۲۴/۲±۱/۹۱ ^{abcd}	۴/۲±۰/۱۳ ^{abc}	۳/۳±۰/۱۳ ^{abc}	۳۰/۴±۰/۷۸ ^b	۴۹/۹±۱/۰۴ ^b	۵۵/۴±۰/۹۰ ^b
PEG۱۰	۴۴/۵±۱/۵۲ ^a	۱۱/۶±۰/۷۳ ^a	۲۰/۴±۰/۹۱ ^a	۱۶/۶±۰/۹۹ ^a	۳/۸±۰/۰۸ ^a	۲/۱±۰/۰۷ ^a	۲۲/۵±۱/۴۶ ^a	۴۲/۸±۱/۹۶ ^a	۴۶/۰±۱/۶۸ ^a

^{a-e}حروف نامشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست ($P < 0.05$). داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین

پلاسمایی اسپرم، تغییر چیدمان ترکیبات غشا و کاهش تحرک، قدرت لقاح و تغییر در مورفولوژی اسپرم می‌گردد (۵). باتوجه به ضرورت نگهداری اسپرم تا زمان انجام تلقیح مصنوعی یا لقاح آزمایش‌گاهی، فراهم کردن یک رقیق‌کننده مناسب که کیفیت و باروری اسپرم را تا زمان استفاده به خوبی حفظ کند، اهمیت فراوانی دارد. رقیق‌کننده‌ها علاوه بر این که اسپرم را هنگام سرد کردن محافظت می‌کنند، مواد مغذی مورد نیاز برای متابولیسم اسپرم را نیز تأمین می‌کند.

نتیجه پژوهش حاضر به روشنی نشان‌دهنده کاهش اثرات منفی دمای سرد یخچال بر اسپرم به واسطه استفاده از پلی‌وینیل‌الکل در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محیط رقیق‌کننده اسپرم طی مدت ۲۴ ساعت است. در پژوهش‌های پیشین اثر مثبت PVA بر اسپرم‌گونه‌های مختلف و غشای آن تأیید شده‌است. در سال ۱۹۸۱ گزارشی مبنی بر اثر معنی‌دار PVA بر تحرک اسپرم همستر منتشر شد. در این پژوهش اثر افزودن ۰/۱ گرم در میلی‌لیتر این ترکیب به محیط کشت ساده حاوی اسپرم همستر و گرمخانه‌گذاری آن به مدت ۵ ساعت بر زنده‌مانی و تحرک اسپرم بررسی شد. نتیجه این پژوهش نشان‌دهنده اثر مثبت PVA بر خصوصیات زنده‌مانی و حرکتی اسپرم بود (۳)، همچنین در سال ۲۰۱۹، Tekin و

همان‌گونه که مشاهده می‌شود تأثیر غلظت PVA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر اکثر شاخص‌ها نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در بین غلظت‌های مختلف PVA، کمترین تحرک مربوط به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PVA منجر به مرگ اسپرم‌ها شد. غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر هیچ یک از شاخص‌های تحرک اسپرم اثر نداشت. غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به صورت مثبت بر حرکت کلی و ضریب جنبش (WOB) و غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به صورت مثبت بر سرعت مسیر متوسط (VAP)، متوسط جابجایی زاویه‌ای (MAD)، متوسط شدت جابجایی جانبی سر (ALH) تأثیر گذار بود ($P < 0.05$).

افزودن PEG به محیط رقیق‌کننده اسپرم در غلظت‌های مختلف بر اکثر شاخص‌های حرکتی اثر معنی‌داری نداشت. تنها ضریب جنبش (WOB) در غلظت‌های ۲ و ۵ تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد از خود نشان داد. غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کشنده بود.

بحث

سرد کردن اسپرم باعث آسیب جدی به غشای

سطحی مولکول‌های آب را افزایش داده و آن‌ها را به هم نزدیک‌تر می‌کنند. این ترکیبات ترجیح می‌دهند به جای پیوند با پروتئین‌ها از پروتئین دور شده و با آب پیوند دهند و از این طریق باعث پایداری ساختار اولیه پروتئین می‌شوند. پروتئین نیز از پیوند با مولکول‌های آب اجتناب می‌کند؛ زیرا در تماس با آب بخش‌های غیر یونی آن برای فرار از آب، به سمت داخل خمیده می‌شوند؛ این خمیدگی باعث اختلال در واکنش‌های هیدروفوبیک پروتئین می‌گردد. واکنش‌های هیدروفوبیک عامل حیاتی در حفظ ساختار پروتئین هستند و با اختلال در کارکرد آن‌ها، پروتئین دناتوره می‌گردد (۱۶)، بنابراین ممکن است PVA از طریق اتصال با مولکول‌های آب و افزایش کشش سطحی آن موجب حفظ ساختار پروتئین‌های غشای اسپرم شود. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، می‌توان به این نتیجه رسید که پلی‌وینیل‌الکل به عنوان یک محافظ سرمای مناسب و نسبتاً ارزان، برای نگهداری اسپرم اپیدیدیمی قوچ در دمای یخچال قابل استفاده است.

منابع

- 1- Bakaltcheva I, Ganong JP, Holtz BL, Peat RA, Reid T. Effects of high-molecular-weight cryoprotectants on platelets and the coagulation system. *Cryobiology*. 2000;40(4):283-93.
- 2- Barbas J, Mascarenhas R. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 2009;10(1):49-62.
- 3- Bavister BD. Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *J Exp Zool*. 1981;217(1):45-51.
- 4- Budke C, Koop T. Ice recrystallization inhibition and molecular recognition of ice faces by poly (vinyl alcohol). *Chem Phys Chem*. 2006;7(12):2601-6.
- 5- De Leeuw FE, Chen H-C, Colenbrander B, Verkleij AJ. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*. 1990;27(2):171-83.
- 6- Dékány G, Csóka I, Erös I. Interaction between liposomes and neutral polymers: Effect of adsorption on drug release. *J Dispers Sci Technol*. 2001;22(5):461-72.
- 7- Fickel J, Wagener A, Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of

همکاران به بررسی اثر غلظت‌های متفاوت PVA در رقیق‌کننده انجماد اسپرم بز پرداختند. طی این پژوهش غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۲ درصد PVA به رقیق‌کننده‌ی انجماد اسپرم حاوی گلیسرول و زرده‌ی تخم مرغ افزوده شد. پس از انجماد و یخ‌گشایی اسپرم‌ها و بررسی تحرک آن‌ها، اسپرم‌های منجمد شده در رقیق‌کننده‌ی دارای غلظت ۲٪ PVA بیشترین تحرک را از خود نشان داد (۱۷).

تا کنون پژوهشی در خصوص اثر محافظتی PVA بر اسپرم در دمای یخچال گزارش نشده و ساز و کار اثر آن به روشنی مشخص نیست، اما با بررسی پژوهش‌های انجام شده در خصوص اثر PVA بر لیپوزوم‌ها که ساختاری دولایه فسفولیپیدی شبیه غشای سلولی دارند از یک سو و پروتئین‌های ایزوله‌شده (isolated proteins) از سوی دیگر، ممکن است بتوان سازوکار احتمالی این ماده را از نظر اثر بر سطح غشا و اثر بر پروتئین‌های غشا حدس زد. پژوهشی در سال ۲۰۰۲ به بررسی میل ترکیبی PVA و PVP با لیپوزوم‌ها پرداخت؛ نتیجه این پژوهش نشان داد که این دو پلیمر با لیپوزوم پیوند تشکیل می‌دهند و PVA پیوندهای بیشتری نسبت به PVP با سطح لیپوزوم برقرار می‌کند. در این گزارش عنوان شده PVA از طریق گروه‌های فراوان هیدروکسیل خود با سطح لیپوزوم پیوند هیدروژنی برقرار کرده و این اتصال منجر به ایجاد یک لایه ضخیم از PVA در اطراف لیپوزوم شده‌است (۶)، بنابراین این احتمال وجود دارد که PVA با ایجاد پیوند هیدروژنی با سطح غشای اسپرم و ایجاد یک لایه محافظتی موجب حفظ ساختار آن از شوک سرمایی شده‌باشد. از سویی دیگر، Jensen و همکاران گزارش دادند حضور PVA به عنوان محافظ پروتئینی باعث پایداری فاکتورهای رشد پروتئینی در دمای یخچال به مدت یک ماه شد (۱۱).

با توجه به ساختار PVA، می‌توان آن را یک پلیول (polyol) نامید. پلیول‌ها، پلیمرهایی هستند که در ساختار خود دارای تعداد زیادی گروه هیدروکسیل هستند. از گذشته‌های دور اثر محافظتی پلیول‌ها بر پروتئین‌های ایزوله شده (isolated proteins) ثابت شده‌است. در واقع پلیول‌ها از طریق گروه‌های هیدروکسیل خود با مولکول‌های آب پیوند هیدروژنی برقرار کرده، کشش



- endangered species. *Eur J Wildl Res.* 2007;53(2):81-9.
- 8- Gadea J. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Span J Agric Res.* 2003(2):17-28.
- 9- Hishinuma M, Suzuki K, Sekine J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4° C. *Theriogenology.* 2003;59(3-4):813-20.
- 10- Inada T, Lu S-S. Inhibition of recrystallization of ice grains by adsorption of poly (vinyl alcohol) onto ice surfaces. *Cryst Growth Des.* 2003;3(5):747-52.
- 11- Jensen BE, Dávila I, Zelikin AN. Poly (vinyl alcohol) physical hydrogels: matrix-mediated drug delivery using spontaneously eroding substrate. *J Phys Chem B.* 2016;120(26):5916-26.
- 12- Maxwell W, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod Fertil Dev.* 1993;5(6):613-38.
- 13- O'Neil L, Paynter S, Fuller B, Shaw R. Vitrication of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. *Cryobiology.* 1997;34(3):295-301.
- 14- Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;62(1):77-111.
- 15- Songsasen N, Tong J, 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):189-96.
- 16- TABORSKY G. Protein alterations at low temperatures: An overview. 1979.
- 17- Tekin K, Daşkın A. Effect of polyvinyl alcohol on survival and function of angora buck spermatozoa following cryopreservation. *Cryobiology.* 2019.





The effect of supplementing poly vinyl alcohol and poly ethyleneglycol to the cold storage extender of ram epididymal sperm on the sperm motility parameters

Zeynab Hadi¹; Ebrahim Ahmadi^{2*}, Naser Shams-Esfandabadi^{2,3}; Najmeh Davoodian²; Abolfazl Shirazi^{2,4}

1. PhD Student, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
4. Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran- Iran.

Summary

Received: 26 June 2022

Accepted: 7 October 2022

One of the advantages of using epididymal sperm is helping to preserve the genetic resources of elite animals and endangered species after death. This study aimed to investigate the probable protective effect of polyvinyl alcohol (PVA) and polyethylene glycol (PEG) on epididymal ram sperm under liquid storage at 4 ° C for 24 hours. Sperms were collected by making an incision on the epididymis of slaughtered rams and extended in extenders supplemented with 0 (control), 0.5, 1, 2, 5 and 10 mg/ml polyvinyl alcohol or polyethylene glycol then refrigerated for 24 hours. We found that only 0.5 mg/ml of PVA group had higher motility parameters comparing to control group ($P < 0.05$). The lowest motility in PVA groups was observed at the concentration of 10 mg/ml. Extenders supplemented with PEG in different concentrations had no significant effect on the most kinetic indices. Both compounds were lethal to sperm at 15 mg/ml.

Keywords: Sperm motility, PVA, PEG, Cold shock.

* Corresponding Author Email: eahmadi@sku.ac.ir

