

اثرات مدت تنش القایی اکسیداتیو ملایم پیش از انجماد بر کیفیت اسپرم گاو بعد از فرآیند انجماد-ذوب

محسن شرفی M.Sc.^۱، مهدی ژندی Ph.D.*^۱، عبدالحسین شاهرودی Ph.D.^۲، ملک شاکری Ph.D.^۱،
الهه نجاتی امیری M.Sc.^۱، اردشیر نجاتی جورامی Ph.D.^۱

۱- گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲- گروه جنین شناسی، پژوهشکده علوم تولید مثل، پژوهشگاه روبان، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mzhandi@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۹

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثرات زمان تنش القایی اکسیداتیو ملایم با استفاده از نیتریک اکساید پیش از انجماد بر کیفیت اسپرم گاو پس از فرآیند انجماد-ذوب بود.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش، زمان تعادل پیش از انجماد ۱۲۰ دقیقه در نظر گرفته شد. مقدار یک میکرومول نیتریک اکساید در زمان صفر (T0)، ۴۵ دقیقه (T45)، ۹۰ دقیقه (T90) و ۱۲۰ دقیقه (T120) دوره سرد سازی پیش از انجماد به رقیق کننده اضافه شد. فراسنجه‌های جنبایی، یکپارچگی غشا پلاسمایی، زنده‌مانی، سلامت آکروزوم، وضعیت آپوپتوزیس و فعالیت میتوکندری اندازه‌گیری شدند. **نتایج:** ایجاد تنش اکسیداتیو با نیتریک اکساید در گروه‌های T0 و T45 باعث بهبود معنی‌دار جنبایی کل (۸۸/۴ ± ۲/۸ و ۸۴/۷ ± ۲/۸) و پیش‌رونده (۵۰/۴ ± ۲/۵ و ۴۹/۵ ± ۲/۵) در مقایسه با سایر گروه‌ها شد ($p < 0/05$). درصد یکپارچگی غشا و زنده‌مانی در گروه‌های T0 (۷۴/۴ ± ۲/۹) و T45 (۸۵/۶ ± ۲/۳ و ۷۵/۶ ± ۲/۹) اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ($p > 0/05$), در حالی‌که در مقایسه با گروه‌های T90 (۶۳/۶ ± ۲/۹) و T120 (۶۱/۵ و ۵۴) به‌طور معنی‌داری بالاتر بودند ($p < 0/05$). درصد میتوکندری فعال در گروه T0 با میزان (۸۲/۵ ± ۳/۱) به‌طور معنی‌داری با گروه‌های ۴۵، ۹۰ و ۱۲۰ (به‌ترتیب ۶۵/۷ ± ۳/۱، ۴۲ ± ۳/۱، ۴۳ ± ۳/۱) اختلاف نشان دادند ($p < 0/05$). زمان تنش تاثیر معنی‌داری بر یکپارچگی آکروزوم و درصد خطی بودن اسپرم‌ها نداشت ($p > 0/05$).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد که با القای تنش‌های اکسیداتیو ملایم با استفاده از غلظت یک میکرومول نیتریک اکساید در زمان‌های صفر و ۴۵ دقیقه سردسازی، باعث بهبود کیفیت اسپرم گاو پس از فرآیند انجماد-ذوب شد.

واژگان کلیدی: تنش، اسپرم، جنبایی، آپوپتوزیس، میتوکندری

مقدمه

مطالعه دانست. ایجاد تنش اکسیداتیو در محیط انجماد اسپرم در این تحقیق راه کاری نوین در پژوهش‌های اسپرم می‌باشد. تاکنون ایجاد شوک‌های اسمزی و هیدروستاتیک در محیط‌های انجماد اسپرم، محیط بلوغ اووسیت و نیز محیط کشت رویان به میزان محدودی بررسی شده است اما این مطالعه تلاش بر آن دارد که با ایجاد تنش‌های اکسیداتیو در زمان‌های مختلف، اثرات آن‌ها را بر کیفیت اسپرم پس از فرآیند انجماد-ذوب شامل فراسنجه‌های جنبایی، یکپارچگی غشا، زنده‌مانی، آپوپتوزیس، سلامت آکروزم و فعالیت میتوکندری بررسی نماید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری منی: در این آزمایش از شش گاو نر نژاد هلشتاین با میانگین سنی ۲ تا ۲/۵ سال واقع در مرکز تولید اسپرم زر ژن (فیروزکوه، تهران) استفاده شد. گاوها در یک مکان مسقف و در شرایط نوری مناسب و استاندارد نگهداری شدند و جیره‌ی گاوها در حد نگهداری و بر اساس توصیه استانداردهای گاو نر هلشتاین تنظیم شده بود. اسپرم‌گیری از گاوها به صورت هفته‌ای یکبار و با استفاده از واژن مصنوعی انجام شد و پس از اسپرم‌گیری، نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شد و بررسی‌های اولیه روی اسپرم‌ها صورت گرفت. نمونه‌هایی با جنبایی کل بیش از ۷۰ درصد و حداقل غلظت 5.0×10^6 در هر انزال به‌عنوان نمونه طبیعی در نظر گرفته شد و سپس با توجه به احتمال وجود اثرات متقابل بین نمونه‌ها، نمونه‌های اسپرم دریافتی با هم مخلوط شدند (۶). نمونه‌های مخلوط شده به چهار بخش مساوی تقسیم شدند و با محیط انجماد رقیق سازی صورت گرفت.

آماده‌سازی محیط انجماد: مطابق با دستورالعمل رقیق کننده اپتیدیل (Biovit, France)، رقیق سازی آن با آب دو بار تقطیر انجام شد و سپس به مدت پنج دقیقه مخلوط شدند. سپس لوله حاوی مایع رقیق کننده داخل حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از آن تیمارهای آزمایشی با نمونه‌های اسپرم گرفته شده از گاوها مخلوط و به‌خوبی هموزن شدند.

تیمار: تیمارهای آزمایشی در این آزمایش شامل چهار زمان اضافه شدن نیتریک اکساید به‌عنوان یک تنش اکسیداتیو در رقیق کننده اپتیدیل بود. دوره سرد سازی در این آزمایش ۱۲۰ دقیقه در نظر گرفته شد و زمان‌های تنش به‌صورت زیر اعمال

تلقیح مصنوعی تنها راه حصول بیشینه‌ی بازده ژنتیکی و کاهش بیماری‌های تولیدمثلی است و تلقیح مصنوعی موفق متاثر از عوامل متعددی می‌باشد که یکی از اصلی‌ترین و کلیدی‌ترین آن‌ها دسترسی به اسپرم‌های بارور بعد از فرآیند انجماد-ذوب می‌باشد (۱). از طرف دیگر، تنش‌های اسمزی، شیمیایی و مکانیکی طی فرآیندهای انجماد-ذوب مهم‌ترین دلایلی هستند که تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عمل کردی را در اسپرم به‌وجود می‌آورد که در نتیجه آن، اسپرم تحت تاثیر این فرآیند قرار گرفته و مجموعه‌ای از پدیده‌های آبخاری منجر به کاهش باروری اسپرم خواهد شد (۲). رادیکال‌های آزاد را می‌توان اصلی‌ترین عامل تنش شیمیایی یا تنش اکسیداتیو طی فرآیند انجماد-ذوب دانست که به دو نوع ROS و RNS دسته‌بندی می‌شوند که آنیون سوپراکسید (O_2^-) هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، هیدروکسیل، نیتریک اکسید، نیتروز اکسید نمونه‌هایی از فعال‌ترین آن‌ها می‌باشند (۳ و ۴). آنچه که تاکنون نشان داده شده است این است که راهبرد کاربرد آنتی اکسیدانت‌ها در راستای رفع آسیب‌های وارد به سلول‌ها و به‌خصوص کاهش صدمات ناشی از فرآیند انجماد-ذوب در اسپرم کافی نبوده است، زیرا که اسپرم قادر است تنها از مقدار اندکی از آنتی اکسیدانت‌های اضافه شده به رقیق کننده استفاده کند و از همه مهم‌تر اینکه آنتی اکسیدانت‌های استفاده شده طی زمان فرآوری و سردسازی اسپرم خصوصیات حفاظتی خود را از دست می‌دهند. این موضوع سبب شده است که محققین استفاده از روش‌های مکمل آنتی اکسیدانتی را به‌عنوان یکی از راه‌کارهای نوین برای آماده سازی اسپرم در مقابل صدمات ناشی از فرآیند انجماد-ذوب به‌کار ببرند (۵). به‌نظر می‌رسد که تنش‌های هیدروستاتیک، اسمزی و حتی تنش‌های اکسیداتیو از جمله راه‌کارهایی باشند که با بررسی میزان و زمان تنش آن‌ها به اسپرم راه‌کاری برای افزایش راندمان باروری در حیوانات به‌خصوص در افزایش کیفیت اسپرم بعد از فرآیند انجماد-ذوب باشد. در این آزمایش، هدف آن است که بتوان با بررسی زمان‌های مختلف ایجاد تنش‌های اکسیداتیو ملایم در دوره‌های مختلف سردسازی، سیستم دفاعی اسپرم را در مقابل تنش‌های جدی‌تر در فرآیند انجماد-ذوب تحریک کرد. بنابراین، زمان ایجاد تنش تعدیل شده در دوره سردسازی را می‌تواند اصلی‌ترین موضوع مطالعه برای تعیین زمان بهینه‌ی ایجاد تنش در این

با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک که حاوی فروکتوز (۹ گرم/لیتر) و سترات سدیم (۴/۹ گرم/لیتر) بود، مخلوط گردید. سپس، ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل ۳ قطره (۱۰ میکرولیتر) از نمونه انکوبه شده، اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند. بررسی میکروسکوپی با استفاده از یک صفحه داغ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ صورت گرفت. در هر گروه حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های دارای غشای یکپارچه برآورد شد.

سلامت آکروزم: برای ارزیابی سلامت آکروزم، میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر از نمونه اسپرم با میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد تثبیت شد و سپس محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا فرآیند تثبیت به‌طور کامل انجام شود. پس از آن، ۲۰ میکرولیتر از رنگ PSA (Pisum sativum agglutinin) به آن اضافه و یک لام گسترش تهیه شد و پس از غوطه‌ور کردن آن در آب اجازه داده می‌شود تا لام خشک شود و با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (BX51; Olympus) تعداد اسپرم‌های با آکروزم سالم شمرده شد. اسپرم‌هایی با سر سبز به‌عنوان آکروزم سالم و اسپرم با کمر بند سبز به‌عنوان آکروزم تخریب شده در نظر گرفته شد (۸).

آپوپتوزیس: برای ارزیابی میزان آپوپتوزیس و زنده‌مانی اسپرم، از کیست آنکسین-۱ (V-Groningen, the Ne the rland) و بر طبق دستورالعمل کارخانه استفاده شد. به‌طور خلاصه، اسپرم‌ها در بافر کلسیم شسته شدند و پس از تنظیم غلظت آن به یک میلیون اسپرم در میلی‌لیتر، ۱۰ میکرولیتر آنکسین-۱ (FITC-V) به ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط اسپرم افزوده شد و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر PI (propidium Iodide) به مخلوط اسپرم افزوده شد و مجدداً برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد و سپس با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (Becton Dickinson, San Khosoz, CA, USA) مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر طبق نتایج فلوسایتومتری، اسپرم‌های زنده (Annexsin-/PI-)، اسپرم‌های مراحل ابتدایی آپوپتوزیس (Annexsin+/PI-) و اسپرم‌های مرده (Annexsin+/PI+ و Annexsin-/PI+) تعیین شدند (۹). برای هر نمونه تعداد ۱۰۰۰۰ رخداد جمع‌آوری شد.

شد: تیمار ۱ (T0): افزودن غلظت ۱ میکرومول نیتریک اکسید در زمان صفر سردسازی (آغاز سرد سازی). تیمار ۲ (T45): افزودن غلظت ۱ میکرومول نیتریک اکسید در زمان ۴۵ دقیقه سردسازی. تیمار ۳ (T90): افزودن غلظت ۱ میکرومول نیتریک اکسید در زمان ۹۰ دقیقه سردسازی. تیمار ۴ (T120): افزودن غلظت ۱ میکرومول نیتریک اکسید در زمان ۱۲۰ دقیقه سردسازی.

انجماد و ذوب اسپرم: پس از طی شدن زمان تعادل، نمونه‌های اسپرم در داخل پایوت‌های ۰/۲۵ کشیده شدند. سپس نمونه‌های اسپرم بسته بندی شده و به‌وسیله دستگاه انجمادگر قابل برنامه‌ریزی (IMVs Technologies, Digit Cools, L'Aigle Cedex, France) منجمد شدند. شیب انجماد در این دستگاه به گونه‌ای تنظیم شد که ۴ تا ۵- درجه در ۴ دقیقه، ۵- تا ۱۱۰- در ۲۵ دقیقه و ۱۱۰- تا ۱۴۰- درجه سانتی‌گراد در ۳۵ دقیقه بود این امر به دلیل جلوگیری از تنش‌های شدید سرمایی و آسیب نژدین به‌موجب تشکیل کریستال‌های یخ انجام می‌شود. پس از رسیدن دما به ۱۴۰- درجه سانتی‌گراد نمونه‌ها به سرعت برداشته شده و در درون لیوان‌های پر از ازت غوطه‌ور شدند. برای ذوب منی، پس از خارج کردن پایوت‌های از ازت، به‌مدت ۳۰ ثانیه در داخل آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

ارزیابی اسپرم پس از انجماد جنبایی: اولین فراسنجه مورد ارزیابی در این تحقیق بررسی جنبایی اسپرم پس از ذوب شدن بود. به این منظور سه پایوت از هر گروه ذوب و به‌داخل لوله‌های ۵ میلی‌لیتری انتقال داده شدند. سپس ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام گذاشته شده و جنبایی نمونه با استفاده از سیستم آنالیز اسپرم کامپیوتری (CASA) بررسی شد.

یکپارچگی غشا: در این مطالعه برای بررسی سلامت غشای اسپرم‌ها از محلول هیپواسموتیک استفاده شد. در این آزمایش از محیطی با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی‌اسمول استفاده شد. فشار اسمزی طبیعی برای اسپرم‌های گاو ۴۲۵ تا ۵۲۵ میلی‌اسمول در لیتر می‌باشد. بنابراین، اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به‌سرعت واکنش نشان می‌دهد. واکنش اسپرم‌ها به محیط هایپواسمول به‌صورت تورم دم می‌باشد. در این حالت اسپرم‌هایی که غشا پلاسمایی سالمی دارند به محلول واکنش داده ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. در تحقیق حاضر آزمایش تورم هیپواسموتیک مطابق با روش ریوال و همکاران (۷) انجام شد. ده میکرولیتر از اسپرم ذوب شده

نتایج

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است درصد جنبایی، جنبایی پیش رونده، سلامت غشا و سرعت در مسیر منحنی اسپرم در اسپرم‌های گروه‌های T0 (به ترتیب، با مقادیر $۸۸/۴ \pm ۲/۸$ ، $۵۰/۴ \pm ۲/۵$ ، $۷۴/۴ \pm ۲/۹$ و $۶۰/۶ \pm ۳/۵$) و T45 (به ترتیب، با مقادیر $۸۴/۷ \pm ۲/۸$ ، $۴۹/۵ \pm ۲/۵$ ، $۷۵/۶ \pm ۲/۹$ و $۵۸/۴ \pm ۳/۵$) به‌طور معنی‌داری در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش پیدا کرده است ($p < ۰/۰۵$). ایجاد تنش‌های القایی در زمان‌های مختلف آزمایش موجب اختلاف معنی‌داری در درصد خطی بودن اسپرم‌ها پس از انجماد-ذوب نشد ($p > ۰/۰۵$). همچنین، نتایج نشان می‌دهد که گروه‌های T90 و T120 در مقایسه با گروه‌های T0 و T45 باعث کاهش معنی‌داری در فراسنجه‌های جنبایی اسپرم و سلامت غشای اسپرم گردید ($p < ۰/۰۵$). همچنین، بین گروه‌های T0 و T45 اختلاف معنی‌داری از نظر فراسنجه‌های فوق مشاهده نشد ($p > ۰/۰۵$).

میتوکندری: درصد اسپرم‌هایی با میتوکندری فعال به‌وسیله رودامین-۱۲۳ (R123; Invitrogen, Eugene, OR, USA) و ارزیابی PI به‌طور خلاصه، میزان ۱۰ میکرولیتر از محلول رودامین-۱۲۳ (۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به ۵۰۰ میکرولیتر نمونه منی رقیق شده افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در مکان تاریک قرار گرفت. سپس، نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و پلت اسپرم در ۵۰۰ میکرولیتر بافر تریس مجدداً مخلوط شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر PI (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مخلوط اسپرم افزوده شد و در آخر، نمونه‌ها به‌وسیله فلوسایتومتر (Becton Dickinson, San Khosoz, CA, USA) ارزیابی شد (۹). برای هر نمونه تعداد ۱۰۰۰۰ رخداد جمع‌آوری شد.

آنالیز آماری: این آزمایش در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با شش تکرار انجام شد و آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS 9.1 و با رویه‌ی GLM صورت گرفت. میانگین‌های به‌دست آمده با استفاده از روش توکی مقایسه شدند.

جدول ۱: میانگین \pm SEM فراسنجه‌های جنبایی و سلامت غشای اسپرم گاو پس از انجماد در زمان‌های مختلف تنش اکسیداتیو. a، b، c در هر ردیف، اعدادی که حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری ندارند ($P < ۰/۰۵$).

T120	T90	T45	T0	صفت
$۶۹/۸^c \pm ۲/۸$	$۷۴/۵^b \pm ۲/۷$	$۸۴/۷^a \pm ۲/۹$	$۸۸/۴^a \pm ۲/۶$	جنبایی کل (%)
$۳۲/۸^c \pm ۲/۶$	$۴۱/۴^b \pm ۲/۷$	$۴۹/۵^a \pm ۲/۱$	$۵۰/۴^a \pm ۲/۵$	جنبایی پیش‌رونده (%)
$۴۱/۷ \pm ۲/۵$	$۴۲/۶ \pm ۳/۴$	$۴۵/۳ \pm ۳$	$۴۴/۶ \pm ۳/۵$	سرعت در مسیر میانگین ($\mu\text{m/s}$)
$۳۱/۶^b \pm ۳/۳$	$۳۵^b \pm ۳/۷$	$۴۹/۶^a \pm ۳/۱$	$۳۵/۳^b \pm ۳/۵$	سرعت در مسیر مستقیم ($\mu\text{m/s}$)
$۵۳/۵^b \pm ۳/۶$	$۵۴/۲^b \pm ۳/۳$	$۵۸/۴^a \pm ۲/۹$	$۶۰/۶^a \pm ۳/۸$	سرعت در مسیر منحنی ($\mu\text{m/s}$)
$۴۱ \pm ۲/۸$	$۳۹/۵ \pm ۲/۱$	$۳۶/۶ \pm ۲$	$۳۸/۴ \pm ۲/۵$	خطی بودن جنبایی (%)
$۶۱/۵^b \pm ۲/۵$	$۶۳/۶^b \pm ۲/۸$	$۷۵/۶^a \pm ۳/۴$	$۷۴/۴^a \pm ۲/۵$	سلامتی غشاء (%)

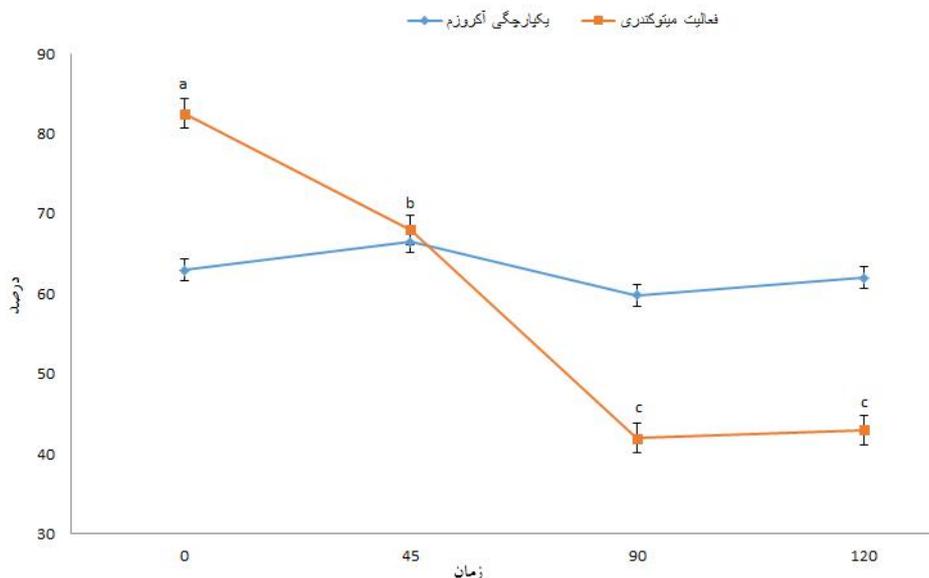
بین گروه‌های T90 و T120 اختلاف معنی‌داری در اسپرم‌های دارای میتوکندری فعال پس از انجماد-ذوب مشاهده نشد ($۴۲ \pm ۳/۷۱$ در مقابل $۴۳ \pm ۳/۷۱$). همچنین، نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف از نظر یکپارچگی آکروزوم اسپرم وجود ندارد.

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که در گروه‌های T0 و T45 بیشترین درصد اسپرم‌های زنده (به ترتیب، با مقادیر $۸۵/۶ \pm ۲/۳$ و $۸۴/۴ \pm ۲/۳$) و کمترین درصد اسپرم‌های دچار آپوپتوزیس

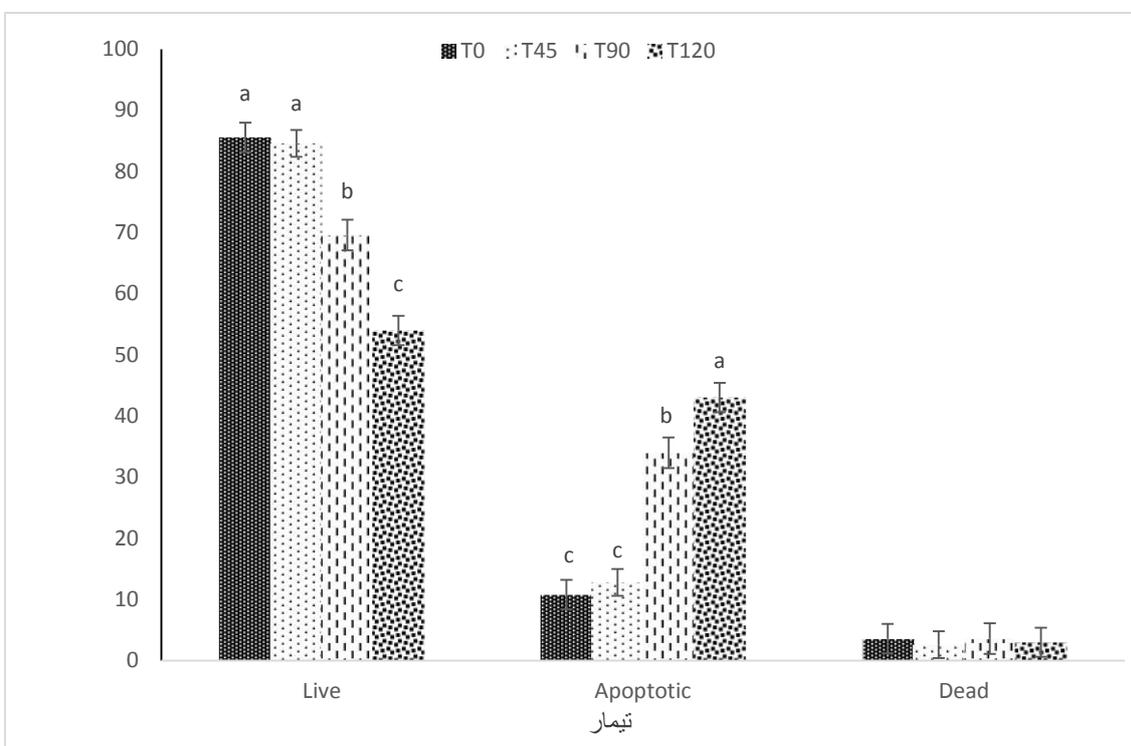
شکل ۱ میانگین درصد یکپارچگی آکروزوم اسپرم و اسپرم‌های دارای میتوکندری‌های فعال را پس از تحمل تنش‌های تعدیل شده نشان می‌دهد. درصد میتوکندری‌های فعال در گروه T0 ($۸۲/۵ \pm ۳/۱$) به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های T45، T90 و T120 (به ترتیب، با مقادیر $۶۵/۷ \pm ۳/۷۱$ ، $۴۲ \pm ۳/۱$ و $۴۳ \pm ۳/۱$) بالاتر بود ($p < ۰/۰۵$). همچنین، درصد اسپرم‌های دارای میتوکندری‌های فعال در گروه T45 ($۶۵/۷ \pm ۳/۱$) به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های T90 و T120 (به ترتیب، با مقادیر $۴۲ \pm ۳/۱$ و $۴۳ \pm ۳/۱$) بالاتر بود ($p < ۰/۰۵$). در مقایسه

(به ترتیب، با مقادیر 10.8 ± 2.4 و 12.8 ± 2.4) وجود دارند، که این مقادیر در مقایسه با گروه‌های T90 و T45 دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p < 0.05$). همچنین، اختلاف معنی‌داری در

درصد اسپرم‌های مرده در گروه‌های مختلف مشاهده نشد ($p > 0.05$) (شکل ۲).



شکل ۱: میانگین \pm SEM یکپارچگی آکروزم اسپرم و فعالیت میتوکندری اسپرم گاو پس از انجماد در زمان‌های مختلف تنش اکسیداتیو. *a b c* نقاطی که حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری ندارند ($P < 0.05$).



شکل ۲: میانگین \pm SEM درصد اسپرم‌های زنده، آپوپتوزیس و مرده پس از انجماد در زمان‌های مختلف تنش اکسیداتیو. *a b c* ستون‌هایی که حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری ندارند ($P < 0.05$).

بحث

فرآیند انجماد ذوب در اسپرم پستانداران به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد و اثرات تخریبی آن‌ها بر غشای پلاسمایی، با کاهش کیفیت اسپرم پس از فرآیند انجماد-ذوب همراه است (۱۰). همواره در سال‌های اخیر محققین تلاش‌های زیادی برای حذف رادیکال‌های آزاد از محیط‌های انجماد-ذوب داشته‌اند. تمام روش‌های جلوگیری از فعالیت رادیکال‌های آزاد همواره روش‌های تدافعی بوده است (۱۱). این روش‌ها به‌طور رایج شامل استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی همچون گلوتاتیون، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و سایر آنزیم‌های سنتتیک می‌باشد که قابلیت نسبتاً خوبی برای مقابله با رادیکال‌های آزاد دارند (۱۲). اما آنچه که مهم است این است که همیشه در محیط‌های انجماد-ذوب به دلیل تنش‌های شدید حرارتی و اکسیداتیو غلظت رادیکال‌های آزاد بیشتر از آنتی‌اکسیدان‌ها بوده است (۱۳). این موضوع محققین را برآن داشته است که روش‌های جایگزینی همچون روش‌های تهاجمی کنترل شده را برای مقابله با تنش‌های اکسیداتیو اسپرم بررسی کنند (۱۴). تاکنون در زمینه تولید مثل، تنش‌های متعددی مانند تنش‌های حرارتی، تنش‌های فشار هیدروستاتیک و تنش‌های اسمزی بر روی اووسیت، رویان و اسپرم انجام شده است. مطالعات نشان می‌دهد که القا کردن تنش‌هایی مانند فشار هیدروستاتیک بر اسپرم باعث افزایش کیفیت آن‌ها و بهبود جنبایی و زنده‌مانی اسپرم پس از فرآیند انجماد-ذوب می‌گردد. در مطالعه دیگری توسط کو و همکاران (۱۵) با ایجاد تنش‌های ملایم هیدروستاتیک بر اسپرم خوک، تفاوت معنی‌داری در نرخ آبستنی پس از تلقیح مصنوعی مشاهده نشد ولی نرخ چند قلو زایی در گروه اسپرم‌های با تنش ملایم‌تر افزایش معنی‌داری پیدا کرد. در این باره، محققین معتقدند که ایجاد تنش‌های ملایم می‌تواند باعث افزایش پروتئین‌هایی در داخل اسپرم شود که نقش مهمی در فرآیند لقاح ایفا می‌کنند. نتایج مطالعات اولیه ما نیز نشان می‌دهد که تنش‌های اکسیداتیو با استفاده از سطوح پایین نیتریک اکساید می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار در کیفیت اسپرم گاو گردد. پس از طرح ریزی اولین آزمایش که دامنه گسترده‌ای از نیتریک اکساید برای ایجاد تنش مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که یک میکرومول نیتریک اکساید نه تنها اثرات تخریبی بر اسپرم ندارد بلکه باعث افزایش و فعال شدن سیستم درونی اسپرم می‌گردد به طوری که کیفیت این گروه از اسپرم‌ها به صورت معنی‌داری در مقایسه با

گروه شاهد بالاتر می‌رود. نتایج نشان می‌دهد که زمان القای تنش اکسیداتیو تأثیرات گوناگونی بر عمل‌کرد سلول خواهد گذاشت (۱۱). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ایجاد تنش‌های اکسیداتیو در ابتدای دوره‌ی سرد سازی تأثیرات بهتری بر جنبایی، یکپارچگی غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و فعالیت میتوکندریایی اسپرم پس از فرآیند انجماد-ذوب دارد. با توجه به اینکه دوره‌ی سردسازی در این انجماد ۱۲۰ دقیقه بود، لذا چهار زمان برای ایجاد تنش اکسیداتیو شامل زمان‌های صفر، ۴۵، ۹۰ و ۱۲۰ انتخاب شد. در فراسنجه‌های جنبایی، درصد جنبایی کل و پیش رونده در اسپرم‌های تنش دیده در زمان‌های صفر و ۴۵ بالاترین درصد مشاهده شد، در حالی که در اسپرم‌های تنش دیده در زمان‌های ۹۰ و ۱۲۰ درصد جنبایی کل و پیش رونده کاهش معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$). همچنین، فراسنجه‌های یکپارچگی غشا و زنده‌مانی و فعالیت میتوکندریایی نشان می‌دهد که در زمان‌های صفر و ۴۵ دقیقه بهبود قابل توجهی در مقایسه با سایر زمان‌ها وجود دارد. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که ایجاد تنش‌های اکسیداتیو با استفاده از نیتریک اکساید در زمان‌های ابتدایی سردسازی فرصت بیشتری برای فعال شدن سازوکارهای درونی اسپرم ایجاد می‌کند. این سازوکارهای احتمالی شامل فعال شدن و فسفریلاسیون پروتئین‌ها و چاپرون‌های درون سلولی مانند پروتئین‌های شوک حرارتی است که می‌توانند در اثر انواع مختلف تنش‌ها افزایش پیدا کنند (۱۶). این پروتئین‌ها قادر هستند در ترمیم‌های درون سلولی شامل ترمیم شکست DNA و فعال‌سازی ساز و کارهای پیام‌رسانی درون سلولی نقش مهمی ایفا کنند. همچنین، محققین معتقدند که فعال شدن پروتئین‌های شوک حرارتی می‌تواند باعث جلوگیری از فعال شدن مسیرهای داخلی و خارجی آپوپتوزیس در اسپرم شوند (۱۷). نتایج مطالعه حاضر نیز موید این مطلب است، زیرا در گروه‌هایی که اسپرم زمان بیشتری برای مقابل با تنش‌های ملایم داشته است درصد اسپرم‌های دچار آپوپتوزیس به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است ($p < 0.05$). همچنین القای تنش اکسیداتیو ملایم در اوایل دوره سردسازی شامل زمان‌های صفر و ۴۵ دقیقه سردسازی توانست به‌خوبی سطح اسپرم‌های با میتوکندری فعال را افزایش دهد. در شرایط طبیعی، تولید رادیکال‌های آزاد به‌طور کنترل شده‌ای در اسپرم انجام می‌شود اما تحت تنش‌های زیاد کنترل تولید آن از اسپرم خارج شده و میزان آن زیاد می‌شود و منجر به تغییراتی در اسپرم می‌گردد (۱۸). تحقیقات نشان می‌دهد که پروتئین‌های

2. Batista M. Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. *Theriogenology*. 2009; 71: 1307-1315.
3. Bucak MN, Atessahin A, Varisli O, Yuce A, et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*. 2007; 67: 1060-1067.
4. Chatdarong K, Chaivechakarn A, Thuwanut P, Ponglowhapan S. Effects of cold storage prior to freezing on superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities, level of total reactive oxygen species and sperm quality in dogs. *Reprod Dom Anim*. 2012; 47: 274-277.
5. Baumber J, Ball Linfor JJ. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am J Vet Res*. 2005; 66: 772- 779.
6. Ijaz A, Hussain A, Aleem M, Yousaf MS, et al. Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 2009; 71(6): 1326– 1329.
7. Revell S, Mrode R. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci*. 1994; 36: 77-86.
8. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J Reprod Fertil*. 1992; 95: 755-763.
9. Najafi A, Zhandi M, Towhidi A, Sharafi M, et al. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*. 2013; 66: 275–282.
10. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Syst Biol Reprod Med*. 2003; 49: 83-94.
11. Pribenszky C, Vajta G, Molnar M, Du Y, et al. Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. *Biol Reprod*. 2010; 83: 690-697.
12. Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(20): 7749-7759.
13. Pena F, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of

ویژه‌ای در میتوکندری وجود دارند که تحت شرایط خاص تنش افزایش پیدا می‌کند. این پروتئین باعث افزایش تنفس میتوکندری و مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد می‌شود. همچنین، این پروتئین‌ها در زمان تنش نیز در مقابل تنش‌های احتمالی از DNA محافظت می‌کنند (۱۹). از طرف دیگر با توجه به اینکه هرچه تعداد میتوکندری‌های فعال اسپرم افزایش پیدا کند انرژی لازم برای جنبایی اسپرم بیشتر فراهم می‌شود، در تحقیق حاضر نیز یکی از دلایل افزایش میزان جنبایی اسپرم و به‌خصوص جنبایی پیش رونده اسپرم می‌تواند به حفظ شدن بهتر ساختار میتوکندری و تعداد میتوکندری‌های فعال اسپرم در گروه‌های تنش ملایم باشد (۲۰). با توجه به تحقیق انجام شده، به‌نظر می‌رسد که استفاده از نیتریک اکساید در سطح یک میکرومول در ابتدای دوره سردسازی بتواند تنش اکسیداتیو القایی مناسبی را برای اسپرم فراهم کند. این تنش در صورتی که به‌طور صحیحی به اسپرم القا شود می‌تواند کیفیت اسپرم گاوهای نر هلشتاین را به‌طور معنی‌داری بهبود دهد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه به‌نظر می‌رسد که بتوان با القای تنش اکسیداتیو ملایم با استفاده از غلظت یک میکرومول نیتریک اکساید در ابتدای دوره سردسازی شامل زمان‌های صفر و ۴۵ دقیقه سردسازی، باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم موثر در باروری پس از فرآیند انجماد-ذوب شد. انجام تحقیقات بیشتر به‌منظور آشکارسازی ساز و کارهای درون سلولی این فرآیند و ارزیابی‌های بیشتر آزمایشگاهی و مزرعه‌ای ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از شرکت تولید اسپرم زر ژن فیروزکوه و همچنین گروه بیولوژی اسپرم پژوهشگاه رویان برای حمایت‌های بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

1. Bailey JL, Bilodeau j, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*. 2000; 21(1): 1-9.

different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci.* 2003; 78(1-2): 85-98.

14. Vandaele L, Thys M, Bijttebier J, Van Langendonck A, et al. Short-term exposure to hydrogen peroxide during oocyte maturation improves bovine embryo development. *Reproduction.* 2010; 139: 505-511.

15. Kuo YH, Pribenszky C, Huang SY. Higher litter size is achieved by the insemination of high hydrostatic pressure-treated frozen-thawed boar semen. *Theriogenology.* 2008; 70: 1366-1395.

16. Kaarniranta K, Elo M, Sironen R, Lammi M, et al. Hsp70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95: 2319-2324.

17. Huang SY, Pribenszky C, Kuo YH, Teng SH, et al. Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. *Anim Reprod Sci.* 2009; 112(1-2): 136-149.

18. Galley HF. Bench-to bedside review: targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. *Crit Care.* 2010; 14(4): 230.

19. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* 2007; 404(1): 1-13.

20. Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota P, et al. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update.* 2009; 15(5): 553-572.

The Time Effect of Induced Mild Oxidative Stress before Freezing on the Post-Thawed Sperm Quality

Sharafi M, M.Sc.^{1,2}, Zhandi M, Ph.D.^{1*}, Shahverdi A, Ph.D.², Shakeri M, Ph.D.¹, Nejati Amiri E, M.Sc.¹, Nejati Javaremi A, Ph.D.¹

1. Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran, Karaj

2. Department of Embryology, Royan Institute for Reproductive Biomedicine Research Center, ACER, Iran

* Email corresponding author: mzhandi@ut.ac.ir

Received: 19 Jan. 2014

Accepted: 16 Feb. 2014

Abstract

Aim: The purpose of this study was to consider the effect of mild oxidative stress period on the frozen-thawed bull semen performance.

Material and Methods: In this study, 120 minutes was considered for equilibration of sperm before freezing. One μM of Nitric Oxide (NO) at the 0, 45, 90 and 120 cooling period was added to the diluant before cryopreservation. Sperm motion parameters, plasma membrane integrity, acrosome integrity, viability, apoptosis and mitochondria activity were assessed.

Results: Induction of oxidative stress with nitric oxide in the T0 and T45 groups led to significant improvement of total (88.4 ± 2.8 , 84.7 ± 2.7) and progressive motility (50.4 ± 2.5 , 49.5 ± 2.5) when compared to other groups. Percentage of plasma membrane integrity and viability were not different in T0 (74.4 ± 2.9 and 85.6 ± 2.9) and T45 (75.6 ± 2.9 and 84.6 ± 2.3) groups, where as it was significantly higher when compared with T90 (63.6 ± 2.9 and 69.6 ± 2.3) and T120 (61.5 ± 2.9 and 54 ± 2.3). Moreover, the highest significant percentage of spermatozoa with active mitochondria was observed in the T0 (82.5 ± 3.1) when compared with T45 (65.7 ± 3.1), T90 (42 ± 3.1) and T120 (43 ± 3.1). Acrosome integrity and linearity of sperm were not affected by the oxidative stress treatment time.

Conclusion: It seems that applying oxidative stress using 1 μM NO would improve post-thawed bull sperm quality at the T0 and T45 time of cooling.

Keywords: Stress, Sperm, Motility, Apoptosis, Mitochondria