مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ٦، شماره ٢، تابستان ١٣٩٤، ٢٢٠-٢١٣

# القای تنش‌های ملایم اسموتیک در محیط انجماد اسپرم و اثر آن‌ها بر کیفیت اسپرم گاو

سهراب طوسی .M.Sc، مهدی امین افشار .Ph.D*، سمانه قره الیاسی پور .M.Sc

- گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: aminafshar@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۸

## چکیده

**هدف:** هدف از این پژوهش، بررسی اثر ایجاد تنش‌های ناشی از تنش‌های اسمزی زیر حد کشنده (۳۲۵، ۳۵۰، ۳۷۵ و ۴۰۰ میلی اسمولار) در رقیق‌کننده تجاری بیوکسل بر شاخص‌های کیفی اسپرم گاو نر هلشتاین پس از فرایند انجماد-ذوب بود.

**مواد و روش‌ها:** اسپرم گیری از چهار راس گاو نر هلشتاین با استفاده از واژن مصنوعی دو بار در هفته نجام شد. کل اسپرم‌های به‌دست آمده با یکدیگر مخلوط و سپس به پنج بخش مساوی تقسیم شدند. هر بخش مطابق با تیمارهای آزمایشی حاوی تنش‌های اسمزی متفاوت، منجمد-ذوب شدند. تیمار با تنش اسمزی ۳۰۰ میلی اسمولار نیز به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. تحرک و تحرک پیش‌رونده اسپرم ها با کمک سیستم آنالیز رایانه‌ای اسپرم اندازه‌گیری شدند. همچنین ویژگی‌های توان زیستی، یکپارچگی غشا، مورفولوژی، فعالیت میتوکندریایی و پراکسیداسیون لپید غشایی اسپرم‌های منجمد-ذوب شده نیز به‌ترتیب با روش‌های ائوزین-نگروزین، هاست، هانکوک، رودامین و تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شدند.

**نتایج:** نتایج نشان داد که تیمار حاوی تنش اسمزی ۳۷۵ میلی اسمولار بیشترین بهبود معنی‌داری را در درصد تحرک، تحرک پیش‌رونده و توان زیستی در مقایسه با سایر تیمارها دارا بود. فعالیت میتوکندریایی نیز در تیمارهای آزمایشی حاوی تنش اسمزی ۳۵۰ و ۳۷۵ میلی اسمولار در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) بالاتر بود. تیمارهای با فشار اسمزی متفاوت تاثیر معنی‌داری بر ویژگی‌های مورفولوژی اسپرم و پراکسیداسیون لیپید غشایی نشان ندادند.

**نتیجه گیری:** به‌نظر می‌رسد که القای تنش‌های اسمزی ملایم و زیر حد کشنده در رقیق‌کننده‌های انجماد اسپرم گاو بتواند سبب بهبود معنی‌دار برخی ازخصوصیات کیفی اسپرم‌ها ازجمله تحرک و توان زیستی آنها گردد.

**واژگان کلیدی:** انجماد، تنش، فشار اسمزی، زنده مانی، میتوکندری

## مقدمه

تلقیح مصنوعی یکی از مهم‌ترین فناوری‌های تولیدمثلی می باشد که برای اصلاح ژنتیکی حیوانات ارائه شده است. در این تکنیک، تنها با چند راس حیوان نر با ارزش ژنتیکی بالا می‌توان اسپرم مورد نیاز برای تلقیح هزاران دام ماده را تهیه کرد (۱). از طریق حفظ انجمادی اسپرم امکان بارور نمودن هم‌زمان تعداد زیادی حیوان ماده با استفاده از اسپرم نرهای با ارزش اصلاحی برتر، حذف هزینه‌های مربوط به نگه‌داری نرها، افزایش مخزن ژنی، انتقال آسان مایع منی از مراکز تولید به دورترین مکان‌ها، حذف اختلاف بین دام‌های دارای تولید مثل فصلی در فصل جفت‌گیری خواهد بود و از طرف دیگر مشکلی برای برنامه‌ریزی جفت‌گیری وجود نخواهد داشت (۲). همچنین می‌توان به ذخیره ژن‌ها برای استفاده در آینده و تضمین در مقابل از دست دادن نرهای منحصر به فرد اشاره نمود (۳). امروزه تلاش‌های قابل ملاحظه‌ای به‌منظور توسعه فناوری انجماد اسپرم در حال انجام است. انجماد اسپرم با مشکلاتی ازجمله کاهش زنده‌مانی و جنبایی بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی مواجه است و این عوامل پس از انجماد– یخ‌گشایی متاثر از عوامل متعددی از قبیل کیفیت منی، نوع و غلظت اجزای موجود در محیط انجماد می باشد. بنابراین، استفاده از محیط انجماد مناسب منی که بتواند از اسپرم‌ها در برابر آسیب‌های انجماد- یخ‌گشایی محافظت کند و زنده‌مانی و جنبایی اسپرم را بعد از آن حفظ کند، گام مهمی برای استفاده از تلقیح مصنوعی می‌باشد (۴ و ۵). وجود انواعی از تنش‌های اسمزی، شیمیایی و مکانیکی در زمان انجماد-ذوب اسپرم سبب شده است که محققین زیادی مطالعاتی را در ارتباط با تنش‌های اسمزی روی اسپرم انجام دهند (۶). تنش‌های اسموتیک توسط تغییر در حجم سلولی، نتیجه‌ای از حرکت آب و محلول در سرتاسر غشای پلاسمایی اسپرم است (۷). محققین معتقدند که قرار گرفتن اسپرم در تنش‌های زیر حد کشنده و ملایم منجر به فعال شدن راه‌های مرگ سلولی خواهد شد (۸). تحقیقات نشان داده است، زمانی که اسپرم در طی فرآیند انجماد در معرض تنش اسموتیک و یا تنش دمایی (شوک سرمایی) قرار می گیرد، باعث آسیب و تخریب غشای اسپرم می‌شود (۹). لذا به‌نظر می‌رسد که القای تنش‌های ملایم قبل از فرآیند انجماد و آگاه سازی اسپرم از تنش‌های جدی تر بتواند به‌عنوان یک عامل کمکی در آماده سازی اسپرم نقش مهمی در حفظ ساختار آن در طی فرآیند انجماد-ذوب داشته باشد (۱۰). لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر تنش‌های اسموتیک تعدیل شده و زیر حد کشنده (۳۰۰، ۳۲۵، ۳۵۰، ۳۷۵ و ۴۰۰ میلی اسمولار) در رقیق‌کننده تجاری بیوکسل پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی بر روی اسپرم گاو نر هلشتاین بود.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق، نمونه منی از ۴ راس گاو نر نژاد هلشتاین با استفاده از واژن مصنوعی و به‌صورت هفته ای دو بار جمع آوری شد. نمونه‌های منی جمع آوری شده بلافاصله مورد بررسی‌های اولیه قرار گرفت و انزال‌هایی با حجم بین ۰/۷۵ تا ۲ میلی‌لیتر، غلظت ۱۰۹×۱≥ اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک بیشتر از ۷۰ درصد و تعداد اسپرم غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد به‌عنوان انزال نرمال در نظر گرفته و در آزمایش استفاده شد. به‌منظور حذف اثرات فردی، نمونه‌های منی با هم مخلوط و به پنج بخش مساوی تقسیم شدند تا هر کدام در یک تیمار آزمایشی مورد رقیق سازی قرار گیرند و در قالب طرح کاملا تصادفی مورد ارزیابی قرار بگیرند. از رقیق‌کننده‌ای با منشا گیاهی با نام تجاری بیوکسل (IMV, France) در این آزمایش استفاده شد. فشارهای اسمزی مورد نظر مطابق با تیمارهای آزمایشی که شامل۳۲۵، ۳۵۰، ۳۷۵ و ۴۰۰ میلی اسمولار بودند، با اضافه کردن غلظت‌های متفاوتی از تری هالوز (Sigma, USA) ایجاد شد. همچنین رقیق کننده حاوی فشار اسمزی ۳۰۰ میلی اسمولار نیز به‌عنوان گروه کنترل مورد استفاده قرار گرفت.

***انجماد و ذوب منی:*** به‌منظور انجماد اسپرم، پس از رقیق سازی منی در تیمار آزمایشی مربوطه، منی‌های رقیق شده در داخل پایوت‌های ۰/۲۵میلی‌لیتری (IMV, France) بسته بندی شدند و سپس به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. پس از گذراندن دوره تعادل، پایوت‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه با فاصله ۵ سانتی‌متری در معرض بخار ازت مایع قرار گرفتند و سپس در ازت مایع غوطه‌ور شدند. در نهایت نمونه‌ها به‌منظور نگه‌داری به تانک ازت منتقل شدند (۱۱).

برای یخ گشایی نمونه‌ها، پس از خارج کردن پایوت‌های منی از ازت، پایوت‌ها به‌مدت ۳۰ ثانیه در داخل آب گرم ۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس نمونه‌های منی ذوب شده به‌داخل لوله آزمایش انتقال داده شدند (۱۲).

***ارزیابی اسپرم‌ها پس از ذوب شدن:*** اولین شاخص ارزیابی شده در این تحقیق خصوصیات حرکتی اسپرم پس از ذوب شدن بود. به این منظور ۳ پایوت از هر تیمار آزمایشی ذوب شد و سپس مقدار ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه منی روی لام قرار داده شد و در نهایت یک لامل تمیز روی آن قرار داده شد، نمونه‌های مورد نظر با استفاده از سیستم آنالیز اسپرم کامپیوتری(Version 5.1, Micro optic, Spain) بررسی شدند. پس از بررسی نمونه‌ها، میزان جنبایی کل و نیز جنبایی پیش رونده به‌عنوان مهم‌ترین شاخص‌های حرکتی اسپرم ثبت گردیدند.

به‌منظور ارزیابی سلامت غشای اسپرم از محلول هیپواسموتیک و مطابق با روش ریوال و همکاران استفاده شد (۱۳). محلول هیپواسموتیک بر اساس فشار اسمزی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند و اسپرم با قرار گرفتن در این محیط به‌سرعت واکنش نشان می‌دهد. واکنش اسپرم به محیط هیپواسموتیک به‌صورت تورم دم می باشد. در این‌حالت اسپرم‌هایی که غشا پلاسمایی سالمی دارند به محلول واکنش داده ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. در واقع پس از انجام این تست اسپرم‌های با دم گره خورده به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم و اسپرم‌های که دم آن‌ها صاف است به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی آسیب دیده تلقی می‌شوند (۱۴). بدین ترتیب، ۱۰ میکرولیتر از منی ذوب شده با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هیپواسموتیک که حاوی فروکتوز (۹ گرم در لیتر، Sigma, USA) و سیترات سدیم (۴/۹گرم در لیتر، Sigma, USA) بود مخلوط گردید و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. در نهایت حداقل ۳ قطره از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. بررسی میکروسکوپی با استفاده از یک صفحه گرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ صورت گرفت. در هر تیمار حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های با غشای سالم محاسبه شد.

برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ آمیزی حیاتی ائوزین - نیگروزین استفاده شد. مواد تشکیل دهنده این محیط شامل رنگ ائوزین (۱۶/۷ گرم در لیتر، Sigma, USA)، رنگ نیگروزین (۱۰۰ گرم در لیتر، Sigma, USA) و سیترات سدیم (۲۹ گرم در لیتر،Sigma, USA ) بود. اساس این رنگ آمیزی بدین صورت است که رنگ ائوزین به‌داخل اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند، در حالی‌که اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای انجام این رنگ آمیزی، ۲۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم بر روی لام قرار گرفت. سپس ۲۰ میکرولیتر از رنگ آماده شده ائوزین - نیگروزین به نمونه‌ها اضافه شد. پس از ۳۰ ثانیه، با استفاده از ۲۰ میکرولیتر نمونه، گسترش تهیه شد. سپس پس از خشک شدن نمونه‌ها، در زیر میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ قرار داده شدند و به‌منظور شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد (۱۵).

به‌منظور بررسی مورفولوژی غیر نرمال اسپرم پس از فرآیند انجماد-ذوب، حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول هانکوک که شامل فرمالین ۳۷ درصد (۶۲/۵ میلی‌لیتر)، محلول سالین (۱۵۰ میلی‌لیتر)، محلول بافر (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دوبار تقطیر (۵۰۰ میلی‌لیتر) بود، افزوده شد و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شد و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست در بزرگ‌نمایی ۲۰۰، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه شد (۱۶).

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت میتوکندریایی اسپرم، پس از یخ گشایی نمونه‌های اسپرم رقیق سازی با بافر تریس، مقدار ۱۰ میکرولیتر رودامین (۰۱/ میلی گرم در میلی لیتر، Invitrogen USA) به هر نمونه اضافه شد و مکانی تاریک و در دمای اتاق به‌مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از طی ۲۰ دقیقه برای حذف قسمت رقیق‌کننده، نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و پلت‌های تشکیل شده با ۵۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس مخلوط شدند پس از آن به‌مقدار ۱۰ میکرولیتر PI (Invitrogen, USA) به هر نمونه اضافه شد و سپس فعالیت میتوکندریایی نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتر (Becton Dickinson, USA) اندازه‌گیری شدند (۱۷). میزان مالون دی آلدهید نیز به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید و بر اساس روش تیوباربیوتیریک اسید اندازه‌گیری شد. با توجه به اینکه یک مولکول MDA با دو مولکول TBA واکنش می‌دهد و فرآورده آن یک مولکول صورتی رنگ خواهد بود، بنابراین از معرف TBA به منظور محاسبه غلظت MDA استفاده شد. برای تهیه معرف TBA، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر محتوی ۵/ گرم NaOH، ۰/۶۷ گرم از ۲-تیوباربیوتیریک اسید و ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک گلایسیال اضافه شد. در این روش ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم

کـه غلظـت آن بـه یـک میلیـون اسـپرم رسـیده بـود، بـه ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. سپس نـیم میلـی‌لیتـر از معـرف TBA به نمونه اضافه شده و به‌مـدت ۶۰ دقیقـه در دمـای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه و با ۴۰۰۰ سانتریفوژ شدند. در نهایت مایع رویی جمع گردید و میزان جذب نوری آن با طول موج ۵۳۲ نـانومتر قرائـت گردید. سپس منحنی استاندارد MDA با استفاده از ۱، ۱، ۳ و ۳ تترا اتوکسی پروپان رسم گردیـد و از روی ایـن منحنـی غلظـت MDA بر حسب نانومول در میلی لیتر محاسبه شد (۱۸).

***آنالیزهای آماری***: داده‌های حاصل در قالب طرح کاملا تصادفی و بر اساس مدل‌های آماری زیر به‌کمک رویـه Proc GLM نـرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

$$y_{ijk} = \mu + a_i + e_{ij}$$

Y: خصوصیات کمی و کیفی اسپرم

μ: میانگین جامعه

iα: اثر فشارهای اسمزی متفاوت

eij: اثر باقیمانده

مقایسه میانگن‌ها توسط آزمون توکی انجام شد.

## نتایج

همان‌طور که جدول ۱ نشان می‌دهد، ایجاد فشـار اسـمزی ۳۷۵ میلی‌مولار باعث بهبود معنی‌دار میزان جنبایی و جنبـایی پـیش رونده اسپرم به‌ترتیب با میزان ۱/۵±۷۱و۱/۷±۵۱ در مقایسـه بـا سایر تیمارها گردید (P<۰/۰۵). افزایش فشار اسمزی از ۳۷۵ بـه ۴۰۰ میلی اسمولار منجر به کاهش معنی‌دار میزان جنبایی کـل و پیش رونده به‌ترتیـب بـا مقـادیر ۱/۲± ۵۳ و ۱/۸±۳۶ درصـد گردید (P<۰/۰۵). تیمارهای ۳۰۰ و ۳۲۵ میلی اسـمولار تفـاوت معنی‌داری را در میزان جنبایی کل و جنبایی پیش رونده اسـپرم ایجاد نکردند در حالی‌که تیمار ۳۵۰ میلی اسمولار باعث افزایش معنی‌دار میزان جنبایی کل و پـیش رونـده بـه‌ترتیـب بـا میـزان ۱/۳±۶۴ و ۱/۹±۴۹ درصد در مقایسه با تیمارهـای ۳۰۰ و ۳۲۵ میلی اسمولار گردید (P<۰/۰۵).

از نظر سایر فراسنجه‌های جنبایی، همچون خطی بودن جنبـایی، راستی مسیر طی شده، تناوب عرضی زنشی، جنبایی عرض سـر، سرعت در مسیر مستقیم و سرعت در مسیر میانگین، تیمارهـای حاوی فشار اسمزی مختلف تاثیر معنی‌داری بر آن‌ها نداشتند.

جدول ۲ ویژگی‌های یکپارچگی غشـا، زنـده مـانی و مورفولـوژی اسپرم راپس از فرآیند انجماد-ذوب در تیمارهای مختلـف نشـان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که فشار اسمزی ۳۷۵ میلی اسمولار باعث افزایش معنی‌دار میزان یکپارچگی غشای اسپرم بـه میـزان ۱/۴۸±۸۲ درصـد در مقایسـه بـا تیمارهـای ۳۰۰، ۳۲۵، ۳۵۰ و ۴۰۰ میلی اسمولار به‌ترتیب بـا مقـادیر (۱/۷±۵۷، ۱/۵۲± ۵۹، ۱/۶۱± ۶۶ و۱/۵۹± ۵۲ ) شد (P<۰/۰۵). همچنین تیمار فشـار اسمزی ۳۷۵ میلی اسمولار درصد اسـپرم‌هـای زنـده را پـس از فرآیند انجمـاد-ذوب بـه‌میـزان ۱/۷۱±۷۵ در مقایسـه بـا سـایر تیمارهای فشار اسمزی افزایش داد.

همچنین نتایج مربوط به مورفولوژی اسـپرم در جـدول ۲ نشـان می‌دهد که حالت‌های مختلف مورفولوژیک اسپرم شامل آکروزم، سر و دم‌های غیر نرمال در هیچ یـک از تیمارهـای آزمایشـی بـا یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند و مورفولوژی غیر نرمال تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت.

نتایج مربوط به تعیین میزان تولید مالون دی آلدهیـد بـه‌عنـوان شاخص پراکسیداسیون لپید غشایی در نمودار ۱ نشان داده شده است. میزان تولید مالون دی الدهید در تیمارهـای حـاوی فشـار اسمزی ۳۰۰، ۳۲۵، ۳۵۰، ۳۷۵ و ۴۰۰ میلی اسمولار بـه‌ترتیـب شامل ۴، ۳/۹۱، ۴/۰۲، ۳/۹۷ و ۳/۸۳ نانوگرم بود که این تیمارها تاثیر معنی‌داری بر میزان پراکسیداسیون لپید غشایی نداشته اند.

همچنین نمودار ۲ نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت میتوکنـدریایی اسپرم پس از انجماد-ذوب در محیط انجماد با فشارهای اسـمزی متفاوت را نشان می‌دهد. بیشترین میزان فعالیـت میتوکنـدریایی در تیمارهای حاوی فشار اسمزی ۳۵۰ و ۳۷۵ میلی اسـمولار بـه ترتیب با مقادیر ۶۴ و ۶۹ درصد مشاهده گردید که اختلاف آن‌ها در مقایسه با تیمارهای ۳۰۰، ۳۲۵ و ۴۰۰ میلی اسمولار به‌طـور معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵).

## بحث

از فناوری حفظ انجمـادی اسـپرم در تولیـدمثل جهـت انتخـاب جنس نر با ژن‌های برتر و توزیع ژن‌های برتر در گله‌هـا بـدون در نظر گرفتن محدودیت زمانی و مکانی و نیز حفـظ گونـه‌هـای در حال انقراض استفاده‌های فراوانی می‌گـردد. همچنـین مطالعـات نامحدودی بر روی فعالیت اسپرم و اثرات متقابل آن‌ها بـا گامـت ماده در آزمایشگاه ازجمله دیگر استفاده‌های آزمایشگاهی انجماد

اسپرم وجود دارد (۱۹). در طی فرآیند انجماد-ذوب اسپرم، فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل جنبایی، زنده‌مانی و واکنش آکروزوم به‌طور معنی‌داری دچار کاهش می‌شود (۴). بنابراین یکی از بهترین روش‌ها جهت بررسی کیفیت محیط انجماد و روش انجماد- ذوب، ارزیابی فراسنجه‌هایی همچون جنبایی، زنده‌مانی و واکنش آکروزوم اسپرم است (۲۰). در این مطالعه نیز از روش‌های ذکرشده و نیز روش‌های تشخیص ساز و کارهای درون‌سلولی همچون فعالیت میتوکندریایی برای بررسی کیفیت و صلاحیت محیط‌های انجماد استفاده شد. در این تحقیق نشان داده شد که ایجاد تنش‌های ملایم و زیر حد کشنده اسموتیک قبل از فرآیند انجماد می‌تواند تا حد قابل‌توجهی دستگاه‌های دفاعی اسپرم را پیش از تنش‌های جدی و سخت همچون تنش انجماد فعال سازد.

در تحقیق حاضر تحرک و زنده‌مانی اسپرم پس از انجماد- ذوب در تمامی محیط‌های انجماد در مقایسه با قبل از انجماد کاهش چشم‌گیری نشان داد. اگرچه هدف از این مطالعه مقایسه کیفیت اسپرم قبل و پس از انجماد نبوده است اما مهم‌ترین دلیل کاهش تحرک اسپرم و زنده مانی پس از انجماد-ذوب، آسیب‌های فراساختاری و بیوشیمیایی در حین این فرآیند است که می‌توانند در یک‌زمان و یا در زمان‌های مختلفی روی دهد. این آسیب‌ها شامل تخریب غشا و تشکیل بلوره‌های یخ درون سلولی است که تنها بخش کمی از اسپرم‌ها بعد از انجماد – ذوب دارای غشا سالم و فعالیت طبیعی میتوکندریایی می‌باشند و درنتیجه تعداد اسپرم‌های متحرک کمتری بعد از انجماد-ذوب وجود خواهد داشت (۲۱). همچنین، فرآیند انجماد ذوب در اسپرم پستانداران به‌دلیل تولید رادیکال‌های آزاد و اثرات تخریبی آن‌ها بر روی غشای پلاسمایی با کاهش کیفیت اسپرم پس از انجماد- ذوب همراه است. به‌همین دلیل، محققین تلاش‌های زیادی در جهت حذف رادیکال‌های آزاد از محیط‌های انجماد- ذوب داشته‌اند (۲۲). تمام روش‌های جلوگیری از فعالیت رادیکال‌های آزاد همواره روش‌های تدافعی بوده است. این روش‌ها به‌طور رایج شامل استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌هایی همچون گلوتاتیون، سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و سایر آنزیم‌های سنتتیک می‌باشد که قابلیت نسبتا خوبی برای مقابله با رادیکال‌های آزاد دارند (۶ ). اما آنچه که مهم است این است که همیشه در محیط‌های انجماد- ذوب به‌دلیل تنش‌های شدید حرارتی و اکسیداتیو غلظت رادیکال‌های آزاد بیشتر از آنتی‌اکسیدان‌ها بوده است (۱۰). این موضوع سبب شده است که روش‌های جایگزینی همچون روش-های تهاجمی کنترل‌شده را برای مقابله با تنش‌های اکسیداتیو اسپرم بررسی کنند (۸). تاکنون تنش‌های متعددی مانند تنش‌های حرارتی و تنش‌های فشار هیدروستاتیک بر روی تخمک، جنین و اسپرم انجام‌شده است. مطالعات نشان می‌دهد که القا کردن تنش‌های فشار هیدروستاتیک بر روی اسپرم پیش از فرآیند انجماد باعث افزایش کیفیت آن‌ها و بهبود تحرک و زنده مانی اسپرم پس از انجماد ذوب می‌گردد (۲۳). در مطالعه دیگری توسط کو و همکاران (۲۴) با ایجاد تنش‌های ملایم هیدروستاتیک بر روی اسپرم خوک ، تفاوت معنی‌داری در نرخ آبستنی پس از تلقیح مصنوعی مشاهده نکردند اما نرخ چندقلوزایی در گروه اسپرم‌های با تنش ملایم‌تر افزایش معنی‌داری پیداکرده بود. در همین راستا محققین معتقدند که ایجاد تنش‌های ملایم می‌تواند باعث افزایش پروتئین‌هایی در داخل اسپرم شود که نقش مهمی در فرآیند لقاح ایفا می‌کنند (۲۵). این پروتئین‌ها همچون پروتئین‌های شوک حرارتی، پروتئین‌های یوبیکوئیتین و نیز پروتئین مرتبط با فعالیت سیتوکروم اکسیداز هست که به‌طور مستقیم در جلوگیری از فعالیت‌های آپوپتوتیک تاثیرگذار می‌باشند و نیز باعث افزایش فعالیت میتوکندریایی اسپرم می‌شوند.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ایجاد تنش‌های اسموتیک ملایم در سطح ۳۷۵ میلی اسمولار باعث بهبود خصوصیات حرکتی اسپرم شامل جنبایی کل، جنبایی پیش رونده و همچنین ویژگی های یکپارچگی غشا و زنده مانی اسپرم در مقایسه با گروه کنترل ( فشار اسمزی ۳۰۰ میلی اسمولار) و سایر گروه‌ها می شود. به‌نظر می‌رسد که ایجاد تنش های اسموتیک ملایم با استفاده از ترهالوز توانسته است که ساز و کارهای درون سلولی اسپرم را پیش از تنش انجماد فعال سازد. این ساز و کارها شامل فعال شدن و فسفریلاسیون پروتئین‌ها و چاپرون‌های درون سلولی مانند پروتئین‌های شوک حرارتی است که می‌تواند در اثر انواع مختلف تنش‌ها افزایش پیدا کنند (۲۴). این پروتئین‌ها قادر هستند در ترمیم‌های درون سلولی شامل ترمیم شکست DNA و فعال سازی سازوکارهای پیام رسانی 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 (۲۵). نتایج این تحقیق نیز موید این مطلب

است زیرا که در گروه‌هایی که اسپرم با تنش‌های تعدیل شده‌ای از فشار اسمزی روبرو بوده است درصد کمتری از میزان مرگ و میر اسپرم مشاهده شده و بیشترین میزان اسپرم‌های زنده در گروه‌های با تنش های اسمزی ۳۵۰ و ۳۵۷ میلی اسمولار در مقایسه با سایر گروه‌ها مشاهده شده است.

همچنین در این مطالعه، القای تنش اسموتیک ملایم در سطوح ۳۵۰ و ۳۷۵ میلی اسمولار به‌خوبی درصد اسپرم‌های با میتوکندری فعال را افزایش داده است. 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 (۱۰). تحقیقات نشان می‌دهد که پروتئین‌های 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 (۲۵) از طرف دیگر با توجه به اینکه هرچه تعداد میتوکندری‌های فعال اسپرم افزایش پیدا کند انرژی لازم برای جنبایی اسپرم بیشتر فراهم می شود، 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 (۱۵).

## نتیجه گیری

از نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش می‌توان به این نکته پی برد که تنش‌های اسموتیک در حدهای پایین که زیر حد کشنده باشند می‌تواند باعث فعال شدن مکانیسم ضد آپوپتوزیس در اسپرم شود که در نتیجه آن باعث بهبود کیفیت و زنده‌مانی اسپرم پس از انجماد- ذوب می‌شود.

*جدول ۱: ویژگی‌های جنبایی اسپرم پس از انجماد در محیط‌های با فشار اسمزی (میلی اسمولار) متفاوت (میانگین±انحراف معیار).*

| صفات | ۳۰۰ | ۳۲۵ | ۳۵۰ | ۳۷۵ | ۴۰۰ |
|---|---|---|---|---|---|
| جنبایی(٪) | ۵۴±۱/۲c | ۵۵±۱/۳c | ۶۴±۱/۳b | ۷۱±۱/۵a | ۵۳±۱/۲c |
| جنبایی‌پیشرونده(٪) | ۳۵±۱/۸c | ۳۴±۲c | ۴۹±۱/۹b | ۵۱±۱/۷b | ۳۶±۱/۸c |
| سرعت‌در مسیرمیانگین | ۸۴/۹±۳/۴ | ۷۶/۶±۳/۲ | ۸۹/۵±۳ | ۸۳/۲±۳/۴ | ۸۴/۰۲±۳ |
| سرعت در مسیر منحنی | ۱۲۲/۹±۳/۱ | ۱۱۴/۹±۳/۲ | ۱۲۲/۴±۳/۵۱ | ۱۱۹/۲±۳/۳ | ۱۲۱/۶±۳/۱ |
| سرعت در مسیر مستقیم | ۶۷/۶±۳/۲ | ۶۲/۷±۲/۸ | ۷۵/۵±۳/۶ | ۶۹/۴±۳/۴ | ۶۸/۱±۳/۲ |
| جنبایی عرضی سر | ۵/۲۴±۰/۱۷ | ۵/۲۶±۰/۲۱ | ۵/۰۲±۰/۱۴ | ۵/۱۴±۰/۱۸ | ۵/۳۲±۰/۱۵ |
| تناوب عرضی زنش | ۲۰/۸±۰/۹۸ | ۲۱/۲±۱/۱ | ۲۳/۶±۱/۳ | ۲۳±۰/۹۹ | ۲۲±۱/۲ |
| راستی مسیر طی شده | ۷۶/۴±۱/۵ | ۸۰±۱/۲ | ۸۱/۴±۱/۷ | ۸۰/۶±۱/۹ | ۷۶±۱/۴ |
| خطی بودن جنبایی | ۵۵/۶±۱/۹ | ۵۵/۶±۲ | ۶۲±۲/۵ | ۵۸/۴±۲/۴ | ۵۶±۲/۱ |

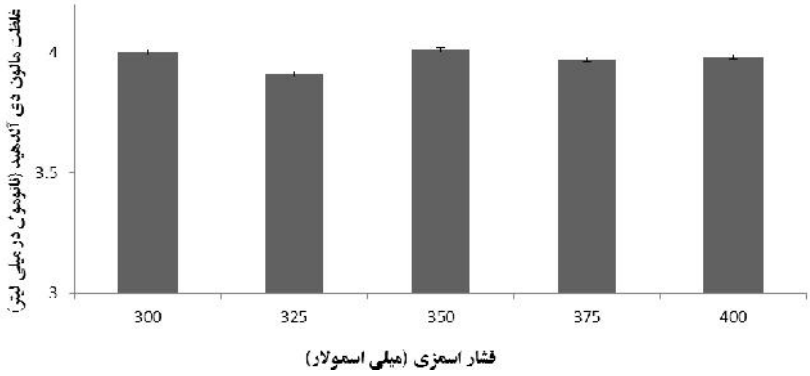
*abc میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در هر ردیف برای اثر تیمار اختلاف معنی‌دار دارند ($P<۰/۰۵$). رقیق کننده حاوی فشار اسمزی ۳۰۰ میلی اسمولار نیز به‌عنوان گروه کنترل مورد استفاده قرار گرفت.*

*جدول ۲: ویژگی‌های کیفی اسپرم پس از انجماد در محیط‌های با فشار اسمزی (میلی اسمولار) متفاوت (میانگین±انحراف معیار)..*

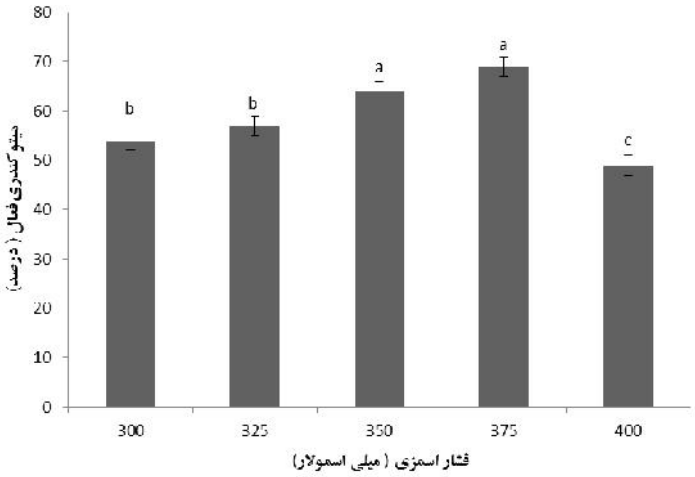
| صفات(٪) | ۳۰۰ | ۳۲۵ | ۳۵۰ | ۳۷۵ | ۴۰۰ |
|---|---|---|---|---|---|
| یکپارچگی غشا | ۵۷±۱/۷c | ۵۹±۱/۵۲c | ۶۶±۱/۶۱b | ۸۲±۱/۴۸a | ۵۲±۱/۵۹c |
| اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی | ۲۲/۲±۱/۶۵ | ۲۳/۳±۱/۲۶ | ۲۶/۳±۱/۳۵ | ۲۷/۷±۱/۴۱ | ۲۳/۶±۱/۵ |
| زنده‌مانی | ۵۱±۱/۵۹c | ۵۹±۱/۶۷c | ۶۵±۱/۴۸b | ۷۵±۱/۷۱a | ۵۴±۱/۴۲c |

*abc میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در هرردیف برای اثر تیمار اختلاف معنی‌دار دارند ($P<۰/۰۵$). رقیق کننده حاوی فشار اسمزی ۳۰۰ میلی اسمولار نیز به‌عنوان گروه کنترل مورد استفاده قرار گرفت.*

*نمودار۱: میزان تولید مالون دی آلدهید پس از فرآیند انجماد- ذوب. در این مطالعه رقیق کننده حاوی فشار اسمزی ۳۰۰ میلی اسمولار نیز به‌عنوان گروه کنترل مورد استفاده قرار گرفت. میزان پراکسیداسیون لپید غشایی اسپرم پس از فرآیند انجماد-ذوب در گروه های مختلف تیماری. هیچ تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد.*




*نمودار۲: میزان فعالیت میتوکندری اسپرم پس از انجماد در گروه‌های مختلف تیماری. abc میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P< ۰/۰۵ ). همچنین رقیق کننده حاوی فشار اسمزی ۳۰۰ میلی اسمولار نیز به‌عنوان گروه کنترل مورد استفاده قرار گرفت.*




## منابع


1. Sharafi M, Forouzanfar M, Hosseini SM, Hajian M, et al. In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation. IJFS. 2009; 3: 149-152.

2. 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(3): 275-282.

3. Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, et al. MH. In vitro comparison of egg yolk–based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen. Theriogenology. 2010; 73(4): 480-487.

4. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science. 2000; 62(1): 77-111.

5. Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell and tissue banking. 2009; 10(1): 49-62.

6. Pribenszky C, Vajta G, Molnar M, Du Y, et al. Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. Biology of reproduction. 2010; 83(5): 690-697.

7. Ball A, Anthony Vo. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. Journal of andrology. 2001; 22(6): 1061-1069.

8. Vandaele L, Thys M, Bijttebier J, Langendonckt AV, et al. Short-term exposure to hydrogen peroxide

9. during oocyte maturation improves bovine embryo development. Reproduction. 2010; 139(3): 505-511.

10. Devireddy RV, Swanlund DJ, Alghamdi AS, Duoos LA, et al. Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa. Reproduction. 2002; 124(5): 643-648.

11. Sharafi M, Zhandi M, Shahverdi A, Shakeri M. Beneficial effects of nitric oxide induced mild oxidative stress on post-thawed bull semen quality. IJFS. 2014. In pres.

12. Uysal O, Bucak MN. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen."Acta Veterinaria Brno. 2007; 76(3): 383-390.

13. Bucak MN, Tuncer PB, Sarıözkan S, Başpınar N, et al. "Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. Cryobiology. 2010; 61(3): 248-253.

14. Revell S, Mrode R. An osmotic resistance test for bovine semen.Anim. Reprod. Sci. 1994; 36(1): 77–86.

15. Emamverdi M, Zhandi M, Zare Shahneh A, Sharafi M, et al. Optimization of Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically Defined Soybean Lecithin Based Extender. Reproduction in Domestic Animals. 2013; 48(6): 899-904.

16. Saemi F, Zamiri MJ, Akhlaghi A, Niakousari M, et al. .Dietary inclusion of dried tomato pomace improves the seminal characteristics in Iranian native roosters." Poultry science. 2012; 91(9): 2310-2315.

17. Schäfer S, Holzmann A. The use of transmigration and Spermac™ stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. Animal reproduction science. 2000; 59(3): 201-211.

18. Shahverdi A, Sharafi M, Gourabi H, Amiri Yekta A, et al. Fertility and Flow Cytometric Evaluations of Frozen-thawed Rooster Semen in Cryopreservation Medium containing Low Density Lipoprotein. Theriogenology. 2014; 83(1): 3-5.

19. Atessahin A, Bucak MN, Tuncer PB, Kızıl M. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze–thawing process. Small Ruminant Research. 2008;77(1): 38-44.

20. Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB, Ulutaş PA, et al. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. Small Ruminant Research. 2009; 8(2): 90-95.

21. Evans JP, Magurran AE. Patterns of sperm precedence and predictors of paternity in the Trinidadian guppy. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. 2001; 268 (1468): 719-724.

22. Thun R, Hurtado M, Janett F. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. Theriogenology. 2002; 57(3): 1087-1094.

23. Bailey JL, Blodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon minireview." Journal of Andrology. 2000; 21(1): 1-7.

24. 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. Animal reproduction science. 2009; 112 (1): 136-149.

25. 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(8): 1395-1396.

26. Pribenszky C, Du Y, Molnár M, Harnos A, et al. Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment."Animal reproduction science. 2008; 106(1): 200-207.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2015; 6(2): 213-220

*Original Article*

# Mild osmotic stresses induction in sperm freezing medium and their effects on bull sperm quality

Tousi S, M.Sc. , Aminafshar M, Ph.D*, Gharaelyasipour S, M.Sc.

- Department of Animal Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

* Email corresponding author: aminafshar@gmail.com

Received: 15 Dec. 2014 Accepted: 17 Feb. 2015

## Abstract

**Aim:** The purpose of this study was to evaluate the effects of sub-lethal osmotic stress (325, 350, 375 and 400 mOsm) during cryopreservation in commercially diluter medium (Bioexcell) on Holstein mail cow sperm qualitative characters after freezing-thawing.

**Material and Methods:** Semen was collected from four Holstein mail cows using artificial vagina two times for a week. All of obtained semen mixed together and then were divided into five equal parts. Each part was freeze-melted according to the experimental treatments consisting of different osmotic stresses. 300 mOsm treatment medium was applied as control group. Sperms motility and progressive motility were assessed by computer assessment semen analysis. Also sperms viability, membrane integrity, mitochondria activity and membrane lipid peroxidation of frozen-thawed semen were assessed using Eosin-Nigrosin, hypo osmotic swelling test, Hankok, Rhodamin 123 and TBA procedures, respectively.

**Results:** Results showed that 375 mOsm osmotic stress treatment had the most significant improvement of motility%, progressive motility and viability in comparison with other treatments. Also mitochondria activity in 350 and 375 mOsm osmotic pressures treatments was significantly higher than other experimental treatments ($P<0.05$). Different osmotic stresses treatments did not show significant effect on sperm morphology and membrane lipid proxidation.

**Conclusion:** It is seemed that mild and sub-lethal osmotic stresses induction in cow sperm freezing diluters can significantly improved some of sperm qualitative characters such as their motility and viability.

**Keywords:** Cryopreservation, Stress, Osmotic Pressure, Viability, Mitochondrium