مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵

ارزیابی ارتباط بین سلامت آکروزوم و برخی خصوصیات اسپرم منجمد گاو هلشتاین

قدرت الله محمدی Ph.D. [1*]، حامد مهدیون .DVM[2]، سعد گورانی نژاد Ph.D. [1]، غلامحسین خواجه Ph.D. [1]

۱- دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، اهواز، ایران
۲- فارغ التحصیل دکترای عمومی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، اهواز، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: g.mohammadi@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۲۱

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه یافتن روشی اصلاح شده برای ارزیابی آکروزوم و بررسی سلامت آکروزوم اسپرم‌های منجمد گاو هلشتاین و بررسی ارتباط بین سلامت آکروزوم با تحرک، میزان زنده بودن و واکنش به محلول هیپواسمول ۱۰۰ میلی اسمول بود.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش ۴۰ عدد پایوت اسپرم منجمد گاو هلشتاین تهیه و آزمایش‌های سلامت آکروزوم، میزان تحرک، زنده بودن و واکنش به محلول هیپواسمول بررسی شد.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان داد که تعداد اسپرم‌های با آکروزوم طبیعی ۵/۷۲±۸۴/۵۲ درصد، میانگین تحرک ۸/۲۲±۳۱/۵۲ درصد، میزان اسپرم‌های زنده ۱۰/۲۳±۶۳/۵۷ درصد، میزان اسپرم‌های ناهنجار ۳/۲۳±۲۱/۵۷ درصد و میزان واکنش اسپرم‌ها به محلول هیپواسمول ۶/۶۸±۴۱/۹۶ درصد به‌دست آمد. ارتباط مثبت و معنی‌داری بین سلامت آکروزوم با میزان تحرک، زنده بودن و سلامت ساختار اسپرم‌ها مشاهده شد ($p<۰/۰۱$) ولی با میزان واکنش به محلول هیپواسموتیک ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). در این مطالعه همبستگی مثبت و معنی‌داری بین میزان ناهنجاری آکروزوم با میزان ناهنجارهای ساختاری اسپرم به‌دست آمد ($p<۰/۰۵$) و بین مقدار ناهنجاری آکروزوم با میزان تحرک و زنده بودن اسپرم‌ها یک رابطه منفی معنی‌داری حاصل شد ($p<۰/۰۱$). بین میزان ناهنجاری آکروزوم با مقدار واکنش به محلول هیپواسموتیک ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش رابطه معنی‌داری بین سلامت آکروزوم با تحرک، سلامت ساختار و میزان زنده بودن اسپرم‌ها به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: از آنجایی‌که میزان باروری اسپرم‌ها ارتباط زیادی با سلامت آکروزوم، سلامت ساختار، تحرک و زنده بودن اسپرم‌ها دارد و آکروزوم اسپرم طی انجماد و ذوب شدن تحت تاثیر قرار می‌گیرد بنابراین ارزیابی سلامت ساختار آکروزوم می‌تواند به‌عنوان یکی از آزمایش‌های سودمند ارزیابی باروری اسپرم‌های منجمد مطرح باشد.

واژگان کلیدی: اسپرم منجمد، ارزیابی آکروزوم، گاو نر هلشتاین

مقدمه

انتقال ژن‌های برتر یکی از روش‌های مؤثر در اصلاح ژنتیکی دام‌های اهلی می‌باشد. یکی از بهترین روش‌های اصلاح ژنتیکی، تلقیح مصنوعی و استفاده از اسپرم‌های منجمد است. در زمان تلقیح مصنوعی، کیفیت اسپرم‌های منجمد از اهمیت خاصی برخوردار هستند. از فاکتورهای تعیین کیفیت اسپرم‌ها می‌توان به درصد اسپرم‌های زنده، تحرک و سلامت آکروزوم آن‌ها اشاره کرد. بر این اساس تحرک، سلامت ساختار و سلامت آکروزوم اسپرم‌ها را به‌عنوان مهمترین فاکتورهای موثر بر میزان باروری اسپرم‌ها در نظر می‌گیرند (۱).

آکروزوم غشایی دو لایه است که دو سوم بخش قدامی هسته را می‌پوشاند. آکروزوم حاوی آنزیم‌های هیدرولیزکننده پروآکروزین (Proacrosine)، استراز (Estrase)، هیالورونیداز (Hyaloronidase) و اسید هیدرولاز (Hydrolase acid) می‌باشد که در لقاح و بارورکردن تخمک نقش مهمی دارند (۲ و ۳).

از جمله نقص‌های آکروزوم که بر روی باروری اسپرم‌ها موثر هستند می‌توان به فقدان آکروزوم، ناصاف و ناکامل بودن آکروزوم و آکروزوم دکمه‌ای (Knobbed acrosome) اشاره کرد. یافته‌های حاصل از مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان داده که نقص‌های آکروزومی، به‌ویژه آکروزوم‌های جدا شده از مهم‌ترین علل ناباروری دام‌ها می‌باشند (۴).

آزمایش‌ها نشان می‌دهد که سلامت آکروزوم می‌تواند از جمله شاخص‌های باروری باشد (۵). از جمله عواملی که بر روی سلامت اسپرم‌های منجمد موثر است می‌توان به نحوه نگه‌داری و ذوب کردن و نوع رقیق‌کننده اسپرم‌ها اشاره کرد (۶). پژوهش‌ها نشان دادند که سرعت یخ‌گشایی اثر زیادی بر سلامت غشای آکروزوم و تحرک اسپرم‌های منجمد دارد (۷).

اکثر روش‌های ارزیابی آکروزوم از روند طولانی و پیچیده‌ای برخوردار هستند و گاهی نتایج مناسب و قابل قبولی نیز حاصل نمی‌شود (۶). امروزه از تکنیک‌های گوناگونی برای بررسی سلامت آکروزوم اسپرم‌های تازه یا منجمد در گونه‌های مختلف استفاده می‌شود. از جمله این تکنیک‌ها می‌توان به فلوسیتومتری (۸)، فلورومتری (۹) و روش‌های چشمی اشاره کرد (۱۰).

روش‌های چشمی با استفاده از رنگ‌آمیزی و سپس مشاهده اسپرم با میکروسکوپ نوری انجام می‌شود. هنگام استفاده از این روش‌ها، دستیابی به یک تکنیک ساده و سریع برای ارزیابی وضعیت آکروزوم اسپرم بسیار ضروری است (۱۱).

در ارزیابی آکروزوم، وضعیت آکروزوم به چهار صورت آکروزوم سالم، آکروزوم متورم و ناهموار، آکروزوم کنده شده و فقدان آکروزوم تقسیم می‌شوند (۱۲).

برای رنگ‌آمیزی و شناسایی آکروزوم به‌روش چشمی اغلب از تعداد کمی رنگ استفاده می‌شود که رنگ گیمسا یکی از مهم‌ترین رنگ هاست. یک رنگ‌آمیزی زمانی مناسب است که آکروزوم را بدون رنگ کردن ناحیه پشت آکروزوم رنگ کند. یکی از مشکلات رنگ‌آمیزی آکروزوم در اسپرم‌های منجمد، نوع محلول رقیق کننده است که اغلب در رنگ‌آمیزی آکروزوم اختلال ایجاد می‌کند (۱۳).

هدف از این پژوهش استفاده از روشی ساده و مناسب برای رنگ‌آمیزی و ارزیابی آکروزوم اسپرم‌های منجمد و بررسی ارتباط بین وضعیت آکروزوم و برخی خصوصیات میکروسکوپی اسپرم مانند تحرک، میزان زنده بودن و واکنش به محلول هیپواسمول اسپرم‌های منجمد گاو هلشتاین بوده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۴۰ پایوت اسپرم منجمد گاو هلشتاین از شرکت جاهد (کرج، ایران) خریداری شد. پایوت‌های منجمد به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند تا از حالت انجماد خارج شوند (۱۴).

آزمایش رنگ‌آمیزی آکروزوم: ابتدا برای برطرف کردن مشکل رقیق کننده، از دو روش سانتریفوژ و بدون سانتریفوژ استفاده شد و نتایج حاصل از دو روش با هم مقایسه شدند.

پس از تهیه گسترش از نمونه‌های سانتریفوژ شده و بدون سانتریفوژ و پس از خشک شدن لام، برای ثابت کردن اسپرم‌ها از دو روش متانول (۷۰، ۸۰ و ۹۶ درصد) و فرمال سالین (مخلوط فرمالین ۴۰ درصد+ سرم سالین) با غلظت‌های ۲، ۳ و ۵ درصد استفاده شد.

پس از ثابت شدن اسپرم‌ها، برای رنگ‌آمیزی، از مخلوط رنگ گیمسا با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ درصد با زمان‌های رنگ‌آمیزی ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ ساعت استفاده شد.

آزمایش تحرک: برای انجام این آزمایش، ۵۰ میکرولیتر

اسپرم منجمد ذوب شده را با ۵۰ میکرولیتر سرم نمکی نرمال درون یک میکروتیوب مخلوط کرده و پس از ۵ دقیقه تیمار در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط را روی لام ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته و روی آن یک لامل قرار داده سپس با درشت‌نمایی ۴۰۰ (میکروسکوپ CX31 الیمپوس)، درصد تحرک اسپرم‌ها بررسی شد (۱۵).

آزمایش رنگ‌آمیزی حیاتی: در این آزمایش با استفاده از روش محمدی و همکاران (۱۵) آزمایش رنگ‌آمیزی حیاتی انجام شد. بدین منظور ۳۰ میکرولیتر مخلوط رنگ ائوزین-نگروزین را به‌درون یک میکروتیوب ریخته و به بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد سپس ۲۰ میکرولیتر اسپرم منجمد ذوب شده به آن اضافه شده و پس از ۶۰ ثانیه تیمار، از مخلوط حاصل شده، ۱۰ میکرولیتر برداشته روی یک لام تمیز قرار داده گسترش تهیه و فوری خشک شد. در این آزمایش تعداد اسپرم‌های زنده (بی‌رنگ) و مرده (قرمز رنگ) با درشت‌نمایی ۴۰۰ با استفاده از میکروسکوپ CX31 الیمپوس مشاهده و حداقل ۲۰۰ اسپرم بررسی شد (۱۵).

آزمایش بررسی ساختار اسپرم‌ها: برای بررسی ساختار اسپرم‌ها ۲۵ میکرولیتر اسپرم ذوب شده را با ۵۰ میکرولیتر جوهر هندی مخلوط و پس از ۶۰ ثانیه تیمار، گسترش تهیه شد (۱۵ و ۱۶). وضعیت ساختار اسپرم‌ها با درشت‌نمایی ۴۰۰ با استفاده از میکروسکوپ CX31 الیمپوس مشاهده و حداقل ۲۰۰ اسپرم بررسی شد.

آنالیز آماری: نتایج حاصل از آزمایش‌ها با استفاده از روش آماری توصیفی با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 ارزیابی شدند. میزان ارتباط بین آزمایش‌های مختلف با استفاده از آزمایش همبستگی پیرسون در درجه اطمینان ۹۵ درصد ($p<۰/۰۵$) ارزیابی شدند.

نتایج

بر اساس نتایج به‌دست آمده بهترین روش برای رنگ‌آمیزی آکروزوم حالتی است که ابتدا اسپرم ذوب شده را سانتریفوژ کرده، گسترش تهیه و به‌مدت ۳۰ دقیقه با محلول فرمال سالین ۵ درصد ثابت شود سپس لام ثابت شده بدون شستشو مستقیم به مخلوط رنگ گیمسای ۰/۵ درصد منتقل شود و به‌مدت ۸ تا ۱۰ ساعت در مخلوط رنگ باقی بماند.

در این پژوهش، گسترش‌های بدون سانتریفوژ نیز انجام شد اما به‌علت اختلال در رنگ‌آمیزی نتایج مناسبی به‌دست نیامد. برای ثابت کردن از اتانول ۹۶ درصد نیز استفاده شد اما نتایج حاصل از فرمال سالین دارای کیفیت و شفافیت بهتری بودند. در این تحقیق از غلظت‌های بیشتر رنگ گیمسا نیز استفاده شد اما باقیمانده رنگ به‌صورت رسوب بر روی گسترش باقی مانده و باعث اختلال در بررسی آکروزوم شد.

پس از بهینه‌سازی رنگ‌آمیزی آکروزوم، اسپرم‌های با آکروزوم کامل، قرمز رنگ و اسپرم‌های فاقد آکروزوم، سفید رنگ و نقص‌های آکروزوم نیز به‌وضوح قابل مشاهده بودند.

پس از بررسی نقص‌های آکروزوم مشخص شد که فقدان آکروزوم بیشترین نوع عارضه (شکل ۱) و نقص‌هایی مانند جدا شدن قسمتی از آکروزوم نیز مشاهده شد (شکل ۲).

بر اساس نتایج به‌دست آمده تعداد اسپرم‌های با آکروزوم طبیعی ۸۴/۵۲+۵/۷۲، میانگین تحرک در پایوت‌های مورد آزمایش ۳۱/۵۲+۸/۲۲ درصد، مقدار اسپرم‌های زنده ۶۳/۵۷+۱۰/۲۳ درصد، تعداد اسپرم‌های ناهنجار ۲۱/۵۷+۳/۲۳ درصد و تعداد اسپرم‌هایی که به محلول هیپواسمول ۱۰۰ میلی اسمول واکنش داده بودند ۴۱/۹۶+۶/۶۸ درصد به دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱: میانگین شاخص‌های تحرک، اسپرم زنده، ناهنجاری ساختاری، ناهنجاری آکروزوم، سلامت آکروزوم و واکنش به محلول هیپواسمول اسپرم منجمد ذوب شده گاوهای هلشتاین

شاخص	تعداد	میانگین	انحراف معیار
تحرک	۴۰	۳۱/۵۲	۸/۲۲
تعداد اسپرم زنده	۴۰	۶۳/۵۷	۱۰/۲۳
مقدار ناهنجاری ساختاری	۴۰	۲۱/۵۷	۳/۲۳
مقدار نواقص آکروزومی	۴۰	۱۵/۷۱	۵/۷۱
مقدار آکروزوم طبیعی	۴۰	۸۴/۵۲	۵/۷۲
واکنش به محلول هیپواسمول (۱۰۰ میلی اسمول/لیتر)	۴۰	۴۱/۹۵	۶/۶۸

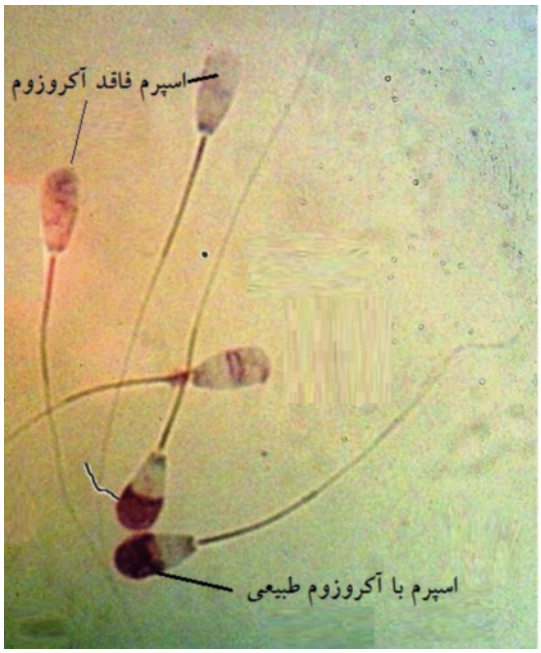
بر اساس یافته‌های به‌دست آمده که در جدول ۲ نشان داده شده است، ارتباط مثبت و معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) بین سلامت آکروزوم با میزان تحرک، زنده بودن و سلامت ساختار اسپرم‌ها مشاهده شد ولی با میزان واکنش به محلول هیپواسموتیک ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). بر اساس یافته‌های حاصل از این پژوهش همبستگی مثبت و معناداری ($p<۰/۰۵$) بین میزان ناهنجاری آکروزوم با میزان ناهنجارهای ساختاری اسپرم و بین میزان ناهنجاری آکروزوم با میزان تحرک و زنده بودن اسپرم‌ها یک رابطه منفی معنی‌داری به‌دست آمد ($p<۰/۰۱$) اما بین میزان ناهنجاری آکروزوم با میزان واکنش به محلول هیپواسموتیک ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). نتایج این مطالعه نشان داد که بین مقدار تحرک با زنده بودن و مقدار واکنش به محلول هیپواسمول ارتباط مثبت و معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$) و یک رابطه مثبت و معنی‌داری بین میزان زنده بودن اسپرم‌ها و مقدار واکنش به محلول هیپواسمول مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲: مقدار همبستگی شاخص‌های سلامت آکروزوم، ناهنجاری آکروزوم، تحرک، تعداد اسپرم زنده، ناهنجاری ساختاری و واکنش به محلول هیپواسمول اسپرم منجمد ذوب شده گاوهای نر هلشتاین

	سلامت آکروزوم	ناهنجاری آکروزوم	تحرک	زنده بودن	ناهنجاری ساختار اسپرم	واکنش به محلول هیپواسمول
سلامت آکروزوم	۱	-۱/۰۰۰**	۰/۵۷۵*	۰/۷۸۵**	-۰/۴۸۵*	۰/۲۵۳
ناهنجاری آکروزوم	-۱/۰۰۰**	۱	-۰/۵۷۵*	-۰/۷۸۵**	۰/۴۸۵*	-۰/۲۵
تحرک	۰/۵۷۵*	-۰/۵۷۵*	۱	۰/۷۶۱**	-۰/۵۴۱*	۰/۴۵۰*
زنده بودن	۰/۷۸۵**	-۰/۷۸۵**	۰/۷۶۱**	۱	-۰/۴۷۵*	۰/۴۶۵*
ناهنجاری ساختار اسپرم	-۰/۴۸۵*	۰/۴۸۵*	-۰/۵۴۱*	-۰/۴۷۵*	۱	-۰/۴۳۰
واکنش به محلول هیپواسمول	۰/۲۵۳	-۰/۲۵۳	۰/۴۵۰*	۰/۴۶۵*	۰/۴۳۰	۱

*ارتباط معنی‌دار در حد ۰/۰۵

** ارتباط معنی‌دار در حد ۰/۰۱



شکل ۱: تصویر اسپرم‌های با آکروزوم طبیعی و فاقد آکروزوم

شکل ۲: اسپرم با آکروزوم آسیب دیده و اسپرم دارای آکروزوم طبیعی

بحث

برای ارزیابی آکروزوم از رنگ‌آمیزی‌های فلورسنت و معمولی استفاده می‌شود، در رنگ‌آمیزی معمولی از رنگ‌های گیمسا، کومسی بلو و تریپانبلو استفاده می‌شودد. یکی از معروف‌ترین رنگ‌های مورد استفاده برای ارزیابی آکروزوم، استفاده از گیمسا می‌باشد. در پژوهش حاضر به‌دلیل سهولت و در دسترس بودن و عدم نیاز به میکروسکوپ فلورسنت از رنگ گیمسا استفاده شد. برای بررسی آکروزوم باید رنگ‌آمیزی به‌صورتی باشد که لام دارای رسوب رنگ نباشد، مرز بین آکروزوم و محیط اطراف به‌خوبی مشخص و مرز بین آکروزوم و پس آکروزوم مشخص باشد. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر از مخلوط رنگ گیمسای ۰/۵ درصد و مدت زمان تیمار ۸ تا ۱۰ ساعت استفاده شده است. در این روش آکروزوم به‌تدریج رنگ گرفته و رسوب رنگ نیز روی گسترش باقی نمی‌ماند. بر اساس نتایج حاصل از آزمایش‌های این پژوهش بهتر است اسپرم‌های ذوب شده قبل از تهیه گسترش، سانتریفوژ شوند تا مواد موجود در رقیق کننده که باعث مهار رنگ‌آمیزی آکروزوم می‌گردند حذف شوند. در مطالعه Saacke و همکاران (۱۷)، از محلول ثابت‌کننده استفاده نشد و مدت زمان رنگ‌آمیزی ۳۰ تا ۴۰ دقیقه و از محلول ۱/۱۰ محلول ذخیره استفاده شده بود. اما در پژوهش Hackett و همکاران(۱۶) از محلول ۱/۱۰ گیمسا و مدت زمان رنگ‌آمیزی ۳۰ تا ۶۰ دقیقه استفاده شده بود. در پژوهش Kutvolgyi و همکاران (۱۸) برای رنگ‌آمیزی آکروزوم از گیمسای ۷/۵ درصد و به‌مدت ۴ ساعت استفاده شده بود. در مطالعه Kovacs و همکاران (۶) نیز از گیمسای ۷/۵ درصد استفاده شده بود. در این مطالعات از ترکیب رنگ‌های مختلفی مانند قرمز خنثی، تریپانبلو و گیمسا استفاده شده است و نیاز به فراهم نمودن شرایط خاص برای رنگ‌آمیزی می‌باشد. بر اساس پژوهش Berger و همکاران (۱۹) برای مطالعه آکروزوم از رنگ‌آمیزی سه گانه (بیسمارک قهوه‌ای، رز بنگال و تریپانبلو) به‌منظور بررسی آکروزوم و پس آکروزوم استفاده شد. رنگ‌آمیزی فوق به‌واسطه داشتن مراحل زیاد و استفاده از رنگ‌های بیشتر تا حدودی پیچیده‌تر است. در هیچکدام از مطالعات فوق از سانتریفوژ قبل از رنگ‌آمیزی استفاده نشده بود. درصورتی‌که در پژوهش حاضر از روش سانتریفوژ و بدون سانتریفوژ استفاده شده بود و مشخص شد که انجام سانتریفوژ قبل از رنگ‌آمیزی، علاوه بر اینکه تاثیری روی نتایج نداشت بلکه باعث افزایش کیفیت رنگ-پذیری اسپرم‌ها نیز شد.

بر اساس مطالعه Ahmad و همکاران (۲۰) مقدار سلامت ساختار آکروزومی اسپرم‌های منجمد گاوی ذوب شده حداقل ۷۲ و حداکثر ۸۰ درصد، بر اساس مطالعه Galli و همکاران (۲۱) میزان سلامت ساختار آکروزوم اسپرم‌های منجمد گاوی به‌طور متوسط ۴۳ درصد، در تحقیق Richardson و همکاران (۵) مقدار سلامت آکروزوم اسپرم‌های منجمد گاوی حداقل ۱۲/۸± ۴۹/۸ و حداکثر ۱۰/۸±۶۱/۵ درصد، در مطالعه Correa و همکاران (۱۴) میزان سلامت آکروزوم حداقل ۵/۰ ± ۷۸/۲ و حداکثر ۴/۶±۸۳/۷ درصد، در پژوهش Nur و همکاران (۲۲) میزان ناهنجاری آکروزوم حداقل ۰/۲±۲/۹۰ و حداکثر ۰/۳±۷/۷۷ درصد، و بر اساس مطالعه Muino و همکاران (۷) مقدار ناهنجاری آکروزومی اسپرم‌های منجمد ذوب شده در دمای ۳۵ درجه ۰/۱۳±۸ درصد مشاهده شد. این در حالی است که در تحقیق حاضر میزان سلامت آکروزوم به‌طور متوسط ۵/۷۲+۸۴/۵۲ مشاهده شد که با نتایج حاصل از مطالعات Ahmad و همکاران (۲۰) و Correa و همکاران (۱۴) مشابه است. بر اساس مطالعه Ahmad و همکاران (۲۰) نوع آنتی‌بیوتیک و رقیق کننده روی میزان سلامت ساختار آکروزوم اسپرم‌ها پس از ذوب شدن موثر هستند.

در مطالعه Nur و همکاران (۲۲) مقدار ناهنجاری آکروزوم با نامناسب بودن محیط نگه‌داری ارتباط معنی‌داری نشان داد. با اینحال بر اساس پژوهش Muino و همکاران (۷) میزان ناهنجاری آکروزومی اسپرم‌های منجمد در دمای ذوب متفاوت و در زمان‌های مختلف بعد از ذوب، متفاوت است، به‌طوری‌که ذوب کردن اسپرم‌ها در دمای بالاتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش میزان ناهنجاری آکروزومی و تهیه گسترش در زمان‌های طولانی‌تر از زمان ذوب شدن سبب افزایش میزان ناهنجاری آکروزومی نیز می‌شود.

بر اساس مطالعه Anzar و همکاران (۲۳)، ارزیابی مقدار تحرک اسپرم نسبت به سلامت آکروزوم برای بررسی میزان باروری از اهمیت بیشتری برخوردار است.

بر اساس مطالعه Richardson و همکاران (۵)، میزان همبستگی بین سلامت آکروزوم و تحرک ۰/۶۵ مشاهده شد. بر اساس تحقیق Daader و همکاران (۲۴) ارتباط مثبت و معنی‌داری بین تحرک و میزان سلامت اسپرم خرگوش‌ها مشاهده شد. در پژوهش حاضر نیز بین میزان سلامت آکروزوم و تحرک ارتباط مثبت و معنی‌داری مشاهده شد.

در مطالعه حاضر یک همبستگی مثبت معنی‌داری بین سلامت آکروزوم و میزان زنده بودن اسپرم‌ها مشاهده شد. Graham و همکاران (۲۵) نیز یک ارتباط معنی‌داری بین میزان زنده بودن و سلامت آکروزوم به‌دست آوردند؛ آن‌ها ملاحظه کردند که اغلب اسپرم‌های زنده دارای آکروزوم سالم هستند. Casey و همکاران (۲۶) نیز مشاهده کردند که ۲۹ تا ۸۱ درصد اسپرم‌های مرده نریان آکروزوم ناسالم داشتند.

بر اساس مطالعه Thundathil و همکاران (۲۷)، اسپرم‌هایی که دارای آکروزوم ناقص مانند آکروزوم دکمه‌ای هستند غشای پلاسمایی ناسالمی دارند و به آزمایش تورم هیپو اسموتیک پاسخ نمی‌دهند. بر اساس مطالعه Esteves و همکاران (۲۸)، ارتباط معنی‌داری بین آزمایش تورم هیپواسموتیک و سلامت آکروزوم اسپرم‌های منجمد انسان (با استفاده از رنگ فلورسنت Hoescht 33258) مشاهده نشد. در مطالعه حاضر نیز رابطه معناداری بین سلامت آکروزوم و میزان پاسخ به محلول هیپواسمول مشاهده نشد.

در این تحقیق، بین میزان سلامت آکروزوم با میزان تحرک، زنده بودن و سلامت ساختار اسپرم‌ها رابطه مثبت معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) و بین میزان ناهنجاری آکروزوم با میزان ناهنجارهای ساختاری اسپرم ارتباط مثبت و معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) و با میزان تحرک و زنده بودن اسپرم‌ها ارتباط منفی معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) مشاهده شد. بنابراین یک همبستگی مثبت و معنی‌داری بین سلامت ساختار و میزان تحرک اسپرم‌ها با وضعیت آکروزوم اسپرم‌های منجمد گاوی وجود دارد.

مقدار تحرک با زنده بودن و میزان واکنش به محلول هیپواسمول ارتباط مثبت و معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$). همچنین میزان زنده بودن اسپرم‌ها با میزان واکنش به محلول هیپواسمول ارتباط مثبت و معنی‌داری دارد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که رابطه معنی‌داری بین سلامت آکروزوم با تحرک، سلامت ساختار و میزان زنده بودن اسپرم‌ها وجود دارد. باتوجه به اینکه میزان باروری اسپرم‌ها ارتباط زیادی با سلامت آکروزوم، سلامت ساختار، تحرک و زنده بودن اسپرم‌ها دارد بنابراین علاوه بر بررسی تحرک، ساختار و زنده بودن اسپرم‌ها، بررسی ساختار آکروزوم به‌ویژه زمانی که اختلالی در باروری دام نر وجود داشته باشد نیز می‌تواند به‌عنوان یکی از آزمایش‌های ارزیابی اسپرم‌های منجمد مدنظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش از محل اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شده است به این وسیله مراتب تشکر خود را اعلام می‌دارد.

منابع

1. Barth AD, Oko RJ. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. 1th edn., Iowa State University Press, Ames, 1989; 17-37.

2. Heras MA, Valcarcel A, Furnus C, Perez L, et al. Changas in sperm-bound amidase activity suggest subtle damage to rams sperm acrosomes by freezing/thawing, not detected by light microscopy. Anim Reprod Sci. 1996; 45(1-2): 81-89.

3. Brito LFC. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. Clinical Techniques in Equine Practice. 2007; 6(4): 249-264.

4. Pesch S, Bostedt H, Failing K, Bergmann M. Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. Therigenology. 2006; 91(3-4): 285-298.

5. Richardson GF, Donald AW, MacKlnnon CE. Comparison of different techniques to determine the percentage of intact acrosomes in frozen-thawed bull semen. Theriogenology. 1992; 38: 557-564.

6. Kovacs A, Sarlos P, Olah J, Egerszegi I. Improved viability and acrosome staining to frozen-thawed semen samples - technical note. Anim Sci Biotech. 2010; 43(1): 1-3.

7. Muino R, Rivera MM, Rigau T, Rodriguez-Gill JE, et al. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. Anim Reprod Sci. 2008; 109: 50-64.

8. Wilhelm KM, Graham JK., Squires EL. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-fre hamster oocyte penetration. Theriogenology. 1996; 46(4): 559-578.

9. Moce E, Graham JK. In vitro evaluation of sperm quality. Anim Reprod Sci. 2008; 105(1-2): 104-118.

10. Tartaglione CM, Ritta MN. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. Theriogenology. 2004; 62(7): 1245-1252.

11. Jankovicova J, Simon M, Antalikova J, Horovska L. Acrosomal and viability status of bovine spermatozoa evaluated by two staining methods. Acta Vet Hung. 2008; 56: 133-137.

12. Watson PF., Duncan AE. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. Cryobiology. 1988; 25(2): 131-142.

13. Cross NL, Meizel S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. Biol Reprod. 1989; 41(4): 635-641.

14. Correa JR, Pace MM, Zavos PM. Relationship among frozen- thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility. Theriogenology. 1997; 48(5): 721-731.

15. Mohammadi G., Mahdion H., Goraninejad S., Khadjeh GH. Et al. Modified methods for evaluation of bull frozen-thawed sperm. 2011; 3(2): 135-146.

16. Hackett AJ and Macpherson JW. Some staining procedures for spermatozoa: A review. Can Vet J. 1965; 6(3): 55-62.

17. Saacke RG, Dejarnette JM, Bame JH, Karabinus DS. Et al. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super and single-ovulating cattle. Theriogenology. 1998; 50: 117-128.

18. Kutvolgyi G, Stefler J, Kovacs A. Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. Biotech Histochem. 2006; 81(4-6): 109-117.

19. Berger T, Turner DO, Meizel S, Hedricck JL. The zonapellucida induced acrosome reaction in boar sperm. Biol Reprod. 1989; 40(3): 525-530.

20. Ahmad K, Foote RH, Kdprut M. Postthaw motility, acrosome integrity and fertility of frozen thawed bull spermatozoa. Theriogenology. 1987; 27: 923-930.

21. Galli A, Basetti M, Balduzzi D, Martignoni M. Frozen bovine semen quality and bovine cervical mucus penetration test.

Theriogenology. 1991; 35(4): 837-844.
22. Nur Z, Dogan I, Gunay U, Soylu MK. Effects of different temperature treatments applied to deep stored bull semen on post-thaw cold shocked spermatozoa. Bull Vet Inst Pulawy. 2006; 50: 79-83.
23. Anzar M, Graham EF. Role of sperm motility and acrosome integrity in the fertility in the filtration of bovine semen. Theriogenology. 1996; 45(2): 513-520.
24. Daader, A.H, Zeidan ASB. Motility and acrosomal integrity of frozen rabbit spermatozoa as affected by different extenders, Cryoprotects and packing methods. 9th World Rabbit Congress – June 10-13, 2008, Verona – Italy.
25. Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH. Analysis of sperm cell viability, Acrosome integrity, and mitochondrial function using flowcytometry. Biol Reprod. 1990; 43(1): 55-64.
26. Casey PJ, Hillman RB, Robertson KR, Yudin AL, et al. Validation of an Acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. J Andol. 1993; 14(4): 289-297.
27. Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ. Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. Theriogenology. 2002; 58(1): 87-102.
28. Esteves SC, Sharma RK, Thomas Jr AJ, Agarwal A. Evaluation of Acrosomal Status and Sperm Viability in Fresh and Cryopreserved Specimens by the Use of Fluorescent Peanut Agglutinin Lectin in conjunction with Hypo-osmotic Swelling Test. Int Braz J Urol. 2007; 33(3): 364-376.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Autumn 2017; 7(3):

Evaluation of the relationship between Acrosome integrity and some of the cryopreservation traits of Holstein bull sperm

Mohammadi G, Ph.D.[1], Mahdion H, DVM[2], Gooraninejad S, Ph.D.[1], Khadjeh GH, Ph.D.[1]

1- Shahid Chamran University of Ahvaz, Veterinary faculty, Clinical Science group, Ahvaz, Iran
2- Graduated of Veterinary medicine Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
* Email corresponding author: g.mohammadi@scu.ac.ir

Received: 30 Jun. 2016 Accepted: 11 Sep. 2016

Abstract

Aim: The aim of the present study was to find a simple method for evaluation of acrosomal integrity and evaluation of relationship between acrosomal integrity with motility, viability and reaction to hypoosmolar solution.

Material and Methods: 40 frozen sperm of Holstein bull were purchased and acrosomal integrity, motility, viability and reaction to hypoosmolar solution were examined.

Results: Based on the results, the percentage of acrosomal integrity was 84.52±5.72, motility was 31.52±8.22, alive sperm was 63.57±10.23, abnormal sperm was 21.57±3.23 and reaction to hypoosmolar solution was 41.96±6.68. Results showed the significant positive relationship between acrosomal integrity and motility, and alive sperm and normal sperm ($P<0.01$), but no relation between acrosome integrity and reaction to hypoosmolar solution was observed. The results showed a significant positive relationship between abnormal acrosomes and abnormal sperms ($P<0.05$), while a significant negative relationship observed between abnormal acrosome with motility and live sperm rate ($P<0.01$). No significant relationship was observed between abnormal acrosomes and reaction to hypoosmolar solution ($P>0.05$). There is a significant relation between acrosome integrity with motility, normal sperm and alive sperm.

Conclusion: Since sperm fertility is related with acrosome integrity, normal sperm, motility and sperm viability and because sperm acrosome during freezing and thawing affected so evaluation of acrosome integrity can be considered as one of the useful examination for assessment of cryopreserved sperm fertility.

Key words: Acrosome Evaluation, Cryopreserved sperm, Holstein bull