مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶

اثرات فیزیولوژیکی رقیق‌کننده انجماد مغناطیسی شده بر پارامترهای سلولی، شیمیایی و باروری اسپرم خروس پس از انجماد

محسن شرفی .Ph.D*، زهرا عسگریان زاده .M.Sc، محمد امیر کریمی ترشیزی .Ph.D

– دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم طیور، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m.sharafi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۴

چکیده

هدف: این مطالعه به‌منظور بررسی اعمال شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی بر محیط انجمادی اسپرم انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش از القای میدان مغناطیسی با شدت‌های ۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ گوس، به‌منظور تعیین شدت بهینه در طی فرآیند انجماد-ذوب استفاده شد. نمونه‌های منی از ۱۰ قطعه خروس گله مرغ مادر گوشتی ۲۴ هفته نژاد راس ۳۰۸ با استفاده از روش ماساژ شکمی جمع‌آوری شد. در این پژوهش تیمارهای آزمایش شامل: ۱) رقیق‌کننده معمولی، ۲) رقیق‌کننده مغناطیسی شده با شدت ۲۰۰۰G ، ۳) رقیق‌کننده مغناطیسی شده با شدت ۴۰۰۰G و رقیق‌کننده مغناطیسی شده با شدت ۶۰۰۰G بود. رقیق‌کننده مورد استفاده در این تحقیق، رقیق‌کننده Lake بود. این رقیق‌کننده با سطح ۱ درصد لسیتین سویا و ۵ درصد گلیسرول ترکیب و سپس بر اساس تیمارهای آزمایشی ذکر شده، با شدت‌های مختلف امواج مغناطیسی روبرو شد. اسپرم رقیق‌شده بر اساس هر تیمار، پس از سرد سازی در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری منجمد شد. پس از انجماد، فراسنجه‌هایی همچون تحرک کل، تحرک پیشرونده، مورفولوژی اسپرم، یکپارچگی غشای اسپرم، یکپارچگی آکروزوم، میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید، آپوپتوزیس و پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم اندازه‌گیری شدند.

نتایج: نتایج نشان داد شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی هیچ تاثیر معنی‌داری بر جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، یکپارچگی غشاء، مورفولوژی، پراکسیداسیون لیپیدی، یکپارچگی آکروزوم و سازوکارهای آپوپتوزیس اسپرم خروس ندارد. فقط پتانسیل غشا میتوکندری در گروه کنترل از سایر گروه‌ها بیشتر بود (۶۰/۵ درصد، P<۰/۰۵)

نتیجه گیری: ندارد باید اضافه شود

واژگان کلیدی: اسپرم خروس، امواج مغناطیسی، انجماد-ذوب، رقیق‌کننده

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

تلقیح مصنوعی یک فناوری تولیدمثلی است که در آن از بهترین نرهای پرورشی استفاده موثر می‌شود و می‌تواند منجر به بهبود کیفیت ژنتیکی گله پرورشی شود (۱). این تکنیک یکی از ابزارهای مدیریتی کارآمد برای بهینه‌سازی تولیدمثل ماکیان است و لازمه استفاده بهینه از آن، امکان ذخیره‌سازی اسپرم به‌صورت مایع و منجمد می‌باشد. در روش نگه‌داری اسپرم به‌صورت مایع، اسپرم‌های جمع‌آوری‌شده به نسبت‌های مشخص با رقیق‌کننده‌های مناسب رقیق می‌شوند. رقیق‌سازی اسپرم با حفظ متابولیسم مطلوب و جنبایی و باروری مناسب اسپرم‌ها، هدف اصلی ذخیره اسپرم به‌صورت مایع است (۲). در نگه‌داری اسپرم به‌صورت مایع، با افزایش زمان ذخیره-سازی، جنبایی و باروری کاهش می‌یابد (۳). استفاده از اسپرم مایع بیش‌ترین باروری و هچ را به‌همراه دارد ولی با توجه به مشکلات مربوط به نمونه‌گیری مستمر و عدم دسترسی به پرنده‌های نر برتر و افزایش هزینه نگه‌داری نمی‌توان به استفاده دائم از آن تکیه کرد. محدودیت‌های زمانی ذخیره‌سازی به‌صورت مایع موجب گرایش محققین به‌سوی انجماد اسپرم شده است. اگرچه تلاش‌های متعددی برای توسعه یک روش مناسب برای انجماد اسپرم طیور صورت گرفته است اما هنوز یک پروتکل موفق برای انجماد به دست نیامده است (۴ و ۵). از مزایای منجمد کردن اسپرم می‌توان به بارور نمودن هم‌زمان تعداد زیادی ماده با استفاده از اسپرم نرهای با نژاد برتر، از میان رفتن هزینه‌های مربوط به نگه‌داری نرها، افزایش مخزن ژنی، انتقال آسان مایع منی از مراکز تولید و جمع‌آوری به دورترین مکان‌ها اشاره کرد. هم‌چنین می‌توان به ذخیره‌ی ژن‌ها برای استفاده‌ی آینده و تضمین در مقابل از دست دادن نرهای منحصربه‌فرد و جلوگیری از انقراض نسل نژادهای خاص اشاره نمود. از طرفی فرآیند انجماد با مشکلات و تنش‌های انجمادی همراه است. جنس غشای اسپرم که از فسفولیپیدها و اسیدهای چرب می‌باشد باعث افزایش این حساسیت می‌شود (۱). از آنجایی‌که تلقیح مصنوعی موفق تحت تاثیر دسترسی به اسپرم‌های بارور بعد از فرآیند انجماد-ذوب می‌باشد، بنابراین استفاده از فناوری‌هایی که بتواند آسیب‌های انجمادی را به حداقل برساند، ضروری به‌نظر می‌رسد.

استفاده از امواج میدان مغناطیسی با شدت‌های مختلف و کنترل شده شیوه نوین و تازه‌ای برای تغییر خواص بیوفیزیکی و شیمیایی رقیق‌کننده در زمینه انجماد و یا علم انجماد سلول‌های جنسی می‌باشد. در مورد استفاده از امواج مغناطیسی در رقیق‌کننده‌های انجمادی اسپرم خروس تاکنون پژوهشی صورت نگرفته و این مطالعه اولین مورد بررسی آثار امواج مغناطیسی با شدت‌های مختلف بر قابلیت انجماد اسپرم خروس می‌باشد.

هدف اصلی در این تحقیق به حداقل رساندن تخریب‌های ممکن طی فرآیند انجماد-ذوب اسپرم خروس است. هرگونه دست‌کاری در فرآیندها و محیط‌های انجماد-ذوب اسپرم خروس تاثیر قابل‌توجهی بر کیفیت اسپرم و باروری آن دارد. حال این سوال مطرح است که آیا امواج مغناطیسی می‌تواند باعث کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و حفظ بهتر کیفیت اسپرم پس از فرآیند انجماد-ذوب در رقیق‌کننده‌های انجمادی اسپرم می‌شود؟

مواد و روش‌ها

مکان آزمایش و مدیریت خروس‌ها: این پژوهش در بخش تحقیقات طیور گروه علوم طیور دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. آنالیزهای تخصصی اسپرم و مطالعات آزمایشگاهی در آزمایشگاه علوم دامی دانشکده کشاورزی تربیت مدرس و آزمایشگاه جنین‌شناسی پژوهشگاه رویان صورت گرفت. هرکدام از خروس‌ها در پن‌هایی جداگانه به ابعاد یک متر در دو متر، مجهز به آب‌خوری و دان‌خوری نگه‌داری شدند. سالن از لحاظ نور، دما و رطوبت و تهویه به‌طور اتوماتیک تحت کنترل بود سن خروس‌ها ۲۴ هفته و مدت روشنایی در طول دوره آزمایش ۱۶ ساعت بود. دمای نگه‌داری در کل دوره آزمایش بین ۱۸ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد بود. رطوبت محل نگه‌داری در محدوده ۵۰ تا ۵۵ درصد حفظ شد.

Archive of SID

www.SID.ir

مدیریت خوراک و آب: روزانه مقدار ۱۲۵ گرم خوراک به‌ازای هر خروس در یک نوبت و اول صبح در اختیار آن‌ها قرار می‌گرفت. آب مصرفی هم به مقدار آزاد در مدت روشنایی در اختیار پرنده قرار داده شد و آب‌خوری‌ها مرتب کنترل می‌شدند. جیره خروس‌ها طبق کاتالوگ راهنمای سویه راس ۳۰۸ دارای ۲۷۵۰ کیلوکالری و ۱۲درصد پروتئین بود.

جمع‌آوری منی: جمع‌آوری منی از ۱۰ قطعه خروس بالغ مادر، نژاد راس ۳۰۸ با سن ۲۴ هفته، دو بار در هفته به‌روش ماساژ شکمی انجام شد و بلافاصله پس از جمع‌آوری، منی به آزمایشگاه منتقل شد و بررسی‌های اولیه روی منی صورت گرفت. در هر انزال حجم، غلظت و جنبایی اسپرم پس از جمع‌آوری تعیین شد و سپس به‌منظور حذف اثرات متقابل و فردی نمونه‌ها با یکدیگر ادغام و به بخش‌های مساوی مطابق با تیمارهای آزمایشی تقسیم شدند.

تیمارهای آزمایش شامل موارد زیر بودند:

۱) رقیق‌کننده معمولی

۲) رقیق‌کننده مغناطیسی شده با شدت ۲۰۰۰G

۳) رقیق‌کننده مغناطیسی شده با شدت ۴۰۰۰G

۴) رقیق‌کننده مغناطیسی شده با شدت ۶۰۰۰G

مراحل آماده‌سازی رقیق‌کننده‌ها: رقیق‌کننده مورد استفاده در این تحقیق، رقیق‌کننده Lake بود که به‌صورت دستی تهیه شده و اجزای آن در جدول ۱ آورده شده است. این رقیق‌کننده با سطح ۱ درصد لسیتین سویا و ۵ درصد گلیسرول ترکیب و سپس بر اساس تیمارهای آزمایشی ذکر شده، با شدت‌های مختلف امواج مغناطیسی روبرو شد.

جدول ۱: نوع و مقدار ترکیبات لازم برای ساخت رقیق‌کننده Lake

ردیف	نام ماده	مقدار (گرم /۵۰ میلی‌لیتر)
۱	Potassium acetate	۰/۲۵ گرم
۲	Sodium glutamate	۰/۹۶گرم
۳	D-fructose	۰/۴ گرم
۴	Polyvinyl pirrolidone	۰/۱۵ گرم
۵	Magnesium acetate	۰/۰۳۵ گرم
۶	Glycine	۰/۱۸۷ گرم

ساخت رقیق‌کننده مغناطیسی شده: برای تهیه رقیق‌کننده مغناطیسی مواد شیمیایی توزین شده را با آب مقطر دو بار تقطیر مخلوط کرده و روی هم‌زن قرار داده تا مواد مورد نظر حل و همگن‌شده و پس از آن رقیق‌کننده را به چهار بخش مساوی تقسیم کرده و طول موج‌های مختلف مغناطیسی (۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ گوس) به آن‌ها القا شد. به این‌ترتیب رقیق‌کننده پایه تهیه و در دمای چهار درجه سلسیوس نگه‌داری شد. دستگاه القا کننده میدان مغناطیسی در این مطالعه شامل دو مگنت نئودمیم بود که با سیم لاکی روپوش دار پیچیده شده بود و با استفاده از تغییر ولتاژ ورودی به آن قادر به تولید شدت های مختلف میدان مغناطیسی بود. همچنین برای عبور آب از بین دو مگنت از لوله‌ای استفاده می‌شود که در آن آب به‌مدت ده دقیقه از بین دو مگنت عبور داده می شود و پس از یک ساعت برای ساخت رقیق کننده مورد استفاده قرار می‌گرفت. برای اندازه گیری میدان مغناطیسی القا شده با شدت‌های مختف از دستگاه گوس متر استفاده شد.

فرآوری و انجماد اسپرم: بعد از جمع‌آوری اسپرم از هر یک از خروس‌ها همه اسپرم‌ها جهت حذف اثرات فردی

Archive of SID

www.SID.ir

باهم مخلوط شدند و به چهار بخش مساوی جهت رقیق‌سازی در چهار محیط انجماد تقسیم شدند. سپس با رقیق‌کننده که از قبل برای هر تیمار آماده شده بود، با نسبت یک به ۱۰ (یک میلی‌لیتر اسپرم در ۱۰ میلی‌لیتر رقیق‌کننده) رقیق شدند. پس‌از آن لوله‌های منی در ظرف محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و به‌مدت دو ساعت در یخچال ۵ درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به دمای تعادل نگه‌داری شدند. پس از رسیدن دمای رقیق‌کننده حاوی تیمارهای مختلف به نزدیک پنج درجه سلسیوس، بلافاصله در نی (استرا) انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شدند. در مرحله بعد نی‌های بسته‌شده حاوی سیمن به فاصله چهار سانتی‌متری بالای سطح نیتروژن مایع قرار گرفتند. پس از گذشت چهار دقیقه با سرعت پایوت‌ها در داخل نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) غوطه‌ور شدند و در گابلت‌های مخصوص هر تیمار قرار داده شدند. نمونه‌ها سپس به‌داخل تانک مخصوص نیتروژن انتقال داده شدند.

ارزیابی جنبایی اسپرم با استفاده از نرم‌افزار CASA: برای بررسی جنبایی و خصوصیات سرعتی اسپرم پس از انجماد-ذوب، یک پایوت از هر گروه تیماری ذوب‌شده و به‌درون لوله‌های میکروتیوب انتقال داده شدند. سپس با استفاده از سمپلر متغیر و با برداشتن پنج میکرولیتر از منی روی لام مخصوص ریخته می‌شود، لام مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار CASA نصب‌شده روی کامپیوتر متصل به میکروسکوپ بررسی شد. پس از بررسی نمونه منی، داده جنبایی و همچنین داده‌های وابسته به جنبایی و یا داده‌های سرعتی اسپرم توسط این برنامه ثبت شد.

ارزیابی فعالیت غشا: در این مطالعه برای بررسی فعالیت و یکپارچگی غشا از تست تورم هیپواسموتیک (HOST) استفاده شد (۶). به این منظور ۳۰ میکرولیتر از اسپرم رقیق‌شده با رقیق‌کننده به نسبت ۱:۱۰ را با ۳۰۰ میکرولیتر از محلول HOST مخلوط کرده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شده و سپس درصد اسپرم‌های با غشای سالم و آسیب‌دیده محاسبه شد.

ارزیابی مورفولوژی اسپرم: به‌منظور ارزیابی مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم و تعیین درصد اسپرم‌های نرمال و غیر نرمال از محلول هانکوک استفاده شد (۷). برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل سه قطره از هر نمونه به میکروتیوپ‌های حاوی یک میلی‌لیتر محلول هانکوک افزوده شد و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار داده و توسط یک لامل پوشانده شد و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم، زیر میکروسکوپ فاز کنتراست، با بزرگنمایی ۲۰۰، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه شد.

ارزیابی پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم خروس پس از انجماد-ذوب با رنگ رودامین ۱۲۳: پتانسیل غشای میتوکندری در اثر تنش‌های اکسیداتیو و فرآوری‌های انجماد دچار افت شدید می‌شود که توسط رنگ رودامین۱۲۳ مورد بررسی قرار می‌گیرد (۳). رودامین به‌طور فعال وارد زنجیره تنفسی میتوکندری می‌شود و تجمع آن در میتوکندری باعث تولید فلوروسنت سبزرنگ می‌شود. فقدان فلوروسنت نشان‌دهنده نقص در پتانسیل غشای میتوکندری است. در نمودار حاصل از دستگاه فلوسایتومتری نمونه دارای رودامین مثبت و PI منفی (-PI\+R123) به‌عنوان نمونه دارای میتوکندری فعال و رودامین مثبت و PI مثبت (+PI/ +R123) به‌عنوان میتوکندری غیرفعال در نظر گرفته می‌شود.

ارزیابی یکپارچگی آکروزوم در اسپرم خروس پس از انجماد-ذوب با رنگ PSA: برای اندازه‌گیری یکپارچگی آکروزوم از رنگ فلورسنت PSA استفاده شد. تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید با میکروسکوپ فلورسنس (Olympus; 51BX) با بزرگنمایی ۴۰۰ ارزیابی شد. اسپرم‌های با سر سبز به‌عنوان آکروزوم دست‌نخورده و سالم و اسپرم‌های با کمربند سبز به‌عنوان آکروزوم تخریب شده در نظر گرفته شد.

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی آپوپتوزیس در اسپرم خروس پس از فرآیند انجماد-ذوب: در این آزمایش از فسفاتیدیل سرین، به‌عنوان نشانگر برای تشخیص زنده‌بودن یا آپوپتوزیس شدن اسپرم استفاده شد (۸). حضور این نشانگر در سطح غشای پلاسمایی اسپرم، از نشانه اولیه آپوپتوزیس می‌باشد که در حالت طبیعی یا حالت زنده اسپرم در داخل سیتوپلاسم اسپرم یافت می‌شود. در طول فرآیند آپوپتوزیس، فسفاتیدیل‌سرین از سطح سیتوپلاسمی غشای پلاسمایی به سطح خارجی سلولی تغییر مکان می‌دهد. آنکسین در حضور یون کلسیم تمایل زیادی به اتصال به فسفاتیدیل‌سرین دارد و به‌همین دلیل می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر در تشخیص آپوپتوزیس مورد استفاده قرار گیرد.

در نموداری که دستگاه فلوسایتومتری ارائه می‌دهد اگر نمونه‌ها آنکسین منفی و PIمنفی (A^-/PI^-) باشند، به‌عنوان اسپرم زنده تلقی می‌شوند. اگر آنکسین مثبت و PIمنفی (A^+/PI^-) باشد نمونه زنده ولی دچار آپوپتوزیس اولیه شده است. اگر آنکسین مثبت و PI مثبت (A^+/PI^+) باشد به‌عنوان اسپرم مرده و دچار آپوپتوزیس ثانویه شده تلقی می‌شود. آنکسین منفی و PI مثبت (A^-/PI^+) به‌عنوان اسپرم نکروز شده تلقی می‌شود که در این مطالعه دو گروه آخر به‌عنوان اسپرم‌های مرده در نظر گرفته شدند.

اندازه‌گیری میزان تغییرات مالون‌دی‌آلدهید با روش TBARS: یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدی مالون‌دی‌آلدهید (MDA) می‌باشد که به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو مدنظر قرار می‌گیرد. یک مولکول MDA با دو ملکول TBA واکنش می‌دهد و فرآورده این واکنش، مولکولی صورتی‌رنگ است که بیش‌ترین جذب را در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر دارد. جذب نوری نمونه‌های مختلف یادداشت شد و در پایان، نتایج حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتری در فرمول منحنی استاندارد گذاشته و غلظت MDA (نانو مول در میلی‌لیتر منی) محاسبه شد(۹).

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌های استخراج‌شده که دارای چهار تیمار و شش تکرار بودند در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS، رویه GLMانجام شد و مقایسه میانگین با آزمون توکی در سطح ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج

در این آزمایش اثر رقیق‌کننده مغناطیسی شده با شدت‌های مختلف امواج مغناطیسی بر کیفیت اسپرم منجمد ـ ذوب‌شده اسپرم خروس مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد قابل‌توجهی فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از انجماد-ذوب اندازه‌گیری شد تا بتوان تاثیر رقیق‌کننده مغناطیسی شده با شدت‌های مختلف را بر تغییرات کیفیت اسپرم خروس پس از دوره حفظ انجمادی ارزیابی نمود. فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده در این آزمایش شامل جنبایی و ویژگی‌های وابسته حرکتی، مورفولوژی، زنده-مانی، آپوپتوزیس، یکپارچگی آکروزوم، پتانسیل غشای میتوکندری، میزان تغییرات مالون‌دی‌آلدهید پس از انجماد-ذوب بود.

ارزیابی جنبایی و ویژگی‌های وابسته حرکتی اسپرم

جدول ۲ مقادیر به‌دست‌آمده از ویژگی‌های جنبایی اسپرم توسط نرم‌افزار کامپیوتری آنالیز اسپرم پس از فرآیند انجماد با رقیق‌کننده مغناطیسی شده را نشان می‌دهد. شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی هیچ تاثیر معنی‌داری بر جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر (VAP)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL) و سرعت در مسیر منحنی (VCL) اسپرم، پس از انجماد-ذوب در گروه‌های مختلف نداشت. همچنین راستی مسیر طی شده (STR) اسپرم در گروه‌های مختلف شاهد، ۲۰۰۰ و ۶۰۰۰ گوس به‌ترتیب با مقادیر (۱/۵ ± ۷۰/۵)، (۱/۵ ± ۶۸/۷) و (۱/۵ ± ۶۹/۶) اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند، ولی این سه گروه با گروه

Archive of SID
www.SID.ir

۴۰۰۰ گوس با مقدار (۱/۵ ± ۵۴/۸) اختلاف معنی‌دار داشتند.

جدول ۲: مقایسه میزان جنبایی و ویژگی‌های حرکتی اسپرم خروس پس از فرآیند انجماد در رقیق‌کننده‌های مغناطیسی شده

صفات	G۰	G۲۰۰۰	G۴۰۰۰	G۶۰۰۰	SEM
TM(٪)	۵۴/۹	۵۵/۸	۵۳/۶	۵۶/۰	۱/۲۵
PM(٪)	۳۲/۸	۳۴/۳	۳۰/۱	۳۲/۰	۰/۲۸
VAP(µm/s)	۲۷/۲	۲۸/۲	۲۵/۰	۲۶/۱	۱/۶
VSL(µm/s)	۲۰/۵	۱۸/۹	۲۱/۴	۱۹/۰	۱/۳
VCL(µm/s)	۶۲/۲	۵۹/۷	۶۱/۱	۶۰/۳	۰/۷۱
STR(µm/s)	[a]۷۰/۵	[a]۶۸/۷	[b]۵۴/۸	[a]۶۹/۶	۱/۵
LIN(٪)	۳۷/۰	۳۶/۲	۳۷/۵	۳۶/۰	۱/۴

[a b]در هر ردیف میانگین‌هایی که دارای حروف غیرمشابه هستند تفاوت معنی‌دار دارند $p\leq ۰/۰۵$.

TM: درصد اسپرم‌های دارای حرکت

PM: جنبایی پیش‌رونده: درصد اسپرم‌های دارای جنبایی رو به جلو

VAP: میانگین سرعت در مسیر (میکرون بر ثانیه)

VSL: سرعت در مسیر مستقیم (میکرون بر ثانیه)

VCL: سرعت در مسیر منحنی (میکرون بر ثانیه)

STR: اریتی مسیر طی شده (درصد)

LIN: درصد خطی بودن جنبایی (درصد)

ارزیابی یکپارچگی غشا و مورفولوژی اسپرم

داده‌ها نشان می‌دهند که هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های شاهد، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ گوس از لحاظ یکپارچگی غشا اسپرم به‌ترتیب با مقادیر ۵۴، ۵۶/۲، ۵۵/۱ و ۵۴/۹ درصد با انحراف معیار میانگین ۱/۴۱ وجود نداشت. همچنین نتایج مربوط به ارزیابی مورفولوژی اسپرم نشان می‌دهد که شدت‌های مختلف امواج مغناطیسی اعمال‌شده بر رقیق‌کننده هیچ‌گونه تاثیر معنی‌داری روی مورفولوژی اسپرم نداشته است.

ارزیابی پتانسیل غشا میتوکندری و یکپارچگی آکروزوم اسپرم

جدول ۳ نتایج مربوط به مقایسه میزان پتانسیل غشاء میتوکندری اسپرم خروس پس از فرآیند انجماد در رقیق‌کننده‌های مغناطیسی شده را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که میانگین پتانسیل غشا میتوکندری یا اسپرم‌های با میتوکندری فعال در گروه‌های تیماری ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ به ترتیب با مقادیر ۵۲، ۵۴/۶ و ۵۳/۷ درصد و با انحراف معیار ۲/۱ هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند. در حالی‌که این مقادیر نسبت به گروه شاهد با میزان ۲/۱ ± ۶۰/۵ تفاوت معنی‌دار داشتند ($p<۰/۰۵$). اعمال شدت‌های مختلف مغناطیسی بر رقیق‌کننده باعث کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$)، در اسپرم‌های با میتوکندری فعال شد. همچنین نتایج رنگ‌آمیزی PSA در این آزمایش نشان داد که یکپارچگی آکروزوم اسپرم طی فرآیند انجماد تحت تاثیر رقیق‌کننده مغناطیسی شده قرار نگرفته و اختلافی بین گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳: مقایسه میزان پتانسیل غشا میتوکندری، یکپارچگی آکروزوم و مالون دی آلدهید در اسپرم خروس پس از فرآیند انجماد در رقیق‌کننده‌های مغناطیسی شده

صفات	G۰	G۲۰۰۰	G۴۰۰۰	G۶۰۰۰	SEM
پتانسیل غشاء میتوکندری(٪)	^{a}۶۰/۵	^{b}۵۲/۰	^{b}۵۴/۶	^{b}۵۳/۷	۲/۱
یکپارچگی آکروزوم (٪)	۸۲	۸۰	۷۸	۸۳	۲/۳
مالون دی آلدهید (nmol/ml)	^{a}۲/۵۴	^{b}۳/۲۴	^{b}۳/۳۵	^{b}۳/۵۱	۰/۷۸

$^{a\,b}$میانگین‌هایی که دارای حروف غیرمشابه هستند تفاوت معنی‌دار دارند $p\leq ۰/۰۵$.

ارزیابی زنده‌مانی و پیشرفت آپوپتوزیس اسپرم

نتایج میزان زنده‌مانی و پیشرفت آپوپتوزیس در اسپرم ذوب‌شده در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد هیچ تفاوت معنی‌داری از نظر درصد اسپرم‌های زنده در گروه‌های شاهد، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ گوس به‌ترتیب با مقادیر ۶۰/۲، ۵۹/۲، ۶۱ و ۵۸/۵ درصد مشاهده نشد. با بررسی داده‌های مربوط به آپوپتوزیس در گروه‌ها مشاهده شد که هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های شاهد، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ گوس به‌ترتیب با مقادیر ۱۷/۴، ۱۴/۲، ۱۳/۷ و ۱۵/۸درصد مشاهده نشد. بررسی داده‌های میزان اسپرم مرده در گروه‌های مختلف نیز نشان می‌دهد که هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های شاهد، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ گوس به‌ترتیب با مقادیر ۲۲/۴، ۲۶/۶، ۲۵/۳ و ۲۵/۷ درصد مشاهده نشد.

ارزیابی میزان مالون‌دی‌آلدهید اسپرم

نتایج اکسیداسیون لیپید غشاء در گروه‌های مختلف پس از فرآیند انجماد در رقیق‌کننده‌های مغناطیسی شده نشان می‌دهد که با افزایش شدت میدان مغناطیسی اعمال‌شده بر رقیق‌کننده lake استفاده‌شده در این آزمایش میزان پراکسیداسیون لیپید نیز افزایش پیدا می‌کرد به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان لیپید پراکسیداسیون در گروه‌های ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ گوس به‌ترتیب با مقادیر ۳/۲۴، ۳/۳۵ و ۳/۵۱ درصد مشاهده شد که در مقایسه با گروه شاهد (۲/۵۴ درصد) به‌طور معنی‌داری بالاتر بودند ($p<۰/۰۵$)، اما بین سه گروه گزارش شده اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳).

بحث

در طی فرآیند انجماد، اسپرم‌ها تحت شرایط تنش‌زای متعدد قرار می‌گیرند که می‌تواند باعث اختلال در عمل‌کرد و یا آسیب اندامک‌های سلولی شود. از جمله این تنش‌ها می‌توان به تنش سرمایی و تنش اسمزی اشاره کرد و در نتیجه میزان اکسیداسیون غشا به‌واسطه درصد بیشتر واکنش‌های اکسیداتیو افزایش می‌یابد که این امر در نهایت زنده ماندن و عمر اسپرم را کاهش می‌دهد (۱۰ و ۱۱). نشان داده شده است که میزان لقاح پس از انجماد اسپرم به‌واسطه عملکرد نامناسب غشای آن به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (۱۲ و ۱۳). همچنین انجماد منجر به تغییرات DNA، سیتواسکلت اسپرم، مهار اتصال اسپرم به تخمک و تخریب آکسونم اسپرم شده که منجر به کاهش جنبایی آن می‌شود (۱۴ و ۱۵). اگرچه تلاش‌های متعددی برای توسعه یک روش مناسب برای انجماد اسپرم طیور صورت گرفته است، اما هنوز یک پروتکل موفق برای انجماد به دست نیامده است (۱۶). گونه‌های فعال اکسیژن که القا کننده‌های قوی آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو هستند بر تنظیم عملکردهای خاص سلول مانند آپوپتوزیس نقش دارند. 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 (۱۷). این موضوع سبب شده است که محققین روش‌ها و رویکردهای جدیدی برای محافظت از اسپرم در حین فرآیند انجماد-ذوب پیشنهاد دهند. فرضیه

Archive of SID

www.SID.ir

این پژوهش این بود که امواج مغناطیسی گونه‌های اکسیژن فعال را از طریق الکترون‌دهی به آن‌ها غیرفعال می‌کنند. میدان مغناطیسی با تضعیف پیوندهای واندروالسی بین مولکول‌های آب (۱۸)، و با شکستن پیوندهای هیدروژنی باعث آزادسازی الکترون و افزایش انتقال الکترون (۱۹) به گونه‌های اکسیژن فعال و در نتیجه باعث غیرفعال‌سازی آن‌ها می‌شوند و این‌گونه از اسپرم در برابر گونه‌های اکسیژن فعال محافظت می‌کند و در نتیجه باعث افزایش کیفیت اسپرم می‌شود. همچنین میدان مغناطیسی از طریق افزایش حلالیت محیط‌های پایه رقیق‌کننده و نیز از طریق تشکیل کریستال‌های انجمادی کوچک‌تر، باعث محافظت از اسپرم در شرایط انجمادی و بهبود کیفیت اسپرم می‌شود.

گرچه هنوز اطلاعات دقیقی از نحوه چگونگی اثرات القای شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی بر اسپرم خروس وجود ندارد، ولی تاکنون اثرات مثبت آن بر اسپرم گونه‌هایی مانند خوک، گاو، جوجه گوشتی، موش و سلول‌های بنیادی جنین انسان گزارش شده است. در طی فرآیند انجماد، اسپرم‌ها تحت شرایط تنش‌زا متعدد قرار می‌گیرند که می‌تواند باعث اختلال در عملکرد و یا آسیب اندامک‌های سلولی شود. این آزمایش اولین مطالعه به‌منظور بررسی اعمال شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی بر محیط انجمادی اسپرم است (۲۰).

سوگا و همکاران (۲۱) که نتایج حاصل از تحقیقات آن‌ها نشان داد ذوب نمونه‌های اسپرم که میدان مغناطیسی به‌مدت ۳۰ دقیقه به آن‌ها القاشده بود جنبایی و زنده‌مانی بالاتری نسبت به نمونه‌های غیر مغناطیسی شده داشتند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر اثر میدان مغناطیسی بر اسپرم انسان مورد بررسی قرار گرفت (۲۲). میدان‌های مغناطیسی با فرکانس ۱۰ هرتز باعث افزایش حرکت سریع اسپرم (۱/۸ برابر) بعد از چهار ساعت شد. یافته‌های حاصل از تحقیق تاتنو و همکاران (۲۳) نشان داد که قرار گرفتن اسپرم در معرض میدان مغناطیسی باعث بهبود ویژگی‌های حرکتی اسپرم در شرایط آزمایشگاهی می‌شود.

با توجه به مطالعات اخیر روی اثرات میدان‌های مغناطیسی بر اسپرم گاو، خوک و انسان می‌توان به این نتیجه رسید که میدان مغناطیسی باعث بهبود و افزایش برخی پارامترهای اسپرم از جمله حرکت پیشرونده اسپرم می‌شود. در این آزمایش نشان داده‌شده که میدان‌های مغناطیسی با فرکانس پایین هیچ آسیبی به آکروزوم اسپرم انسان وارد نمی‌کند. کاهش جنبایی اسپرم در شدت‌های بالای میدان مغناطیسی در نمونه‌های رقیق‌شده با آب مغناطیسی را می‌توان به علت افزایش سطح گونه‌های اکسیژن فعال نسبت داد زیراROS با کاهش جنبایی اسپرم ارتباط مستقیم دارد و این احتمال وجود دارد که افزایش سطح ROS باعث اکسیداسیون گروه‌های سولفیدریل و درنتیجه کاهش فسفوریلاسیون پروتئین‌های آکسونمال در اسپرم می‌شود که این امر باعث کاهش جنبایی می‌گردد (۲۴).

یکی دیگر از دلایل کاهش عملکرد اسپرم در تیمارهای ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ گوس این است که رادیکال‌های آزاد پس از عبور از غشا، منجر به مهار فعالیت برخی از آنزیم‌ها نظیر گلوکز-۶-فسفات‌دهیدروژناز (G6PD) می‌شود. این آنزیم‌ها میزان انتقال گلوکز از طریق شنت هگزوزمونوفسفات (مسیرپنتوزفسفات) را کنترل می‌کند این مسیر در شرایط عادی تولیدکننده نیکوتین‌آمید-آدنین‌دی‌نوکلئوتید فسفات (NADPH) احیاشده برای واکنش‌های احیایی در سلول است. NADPH به‌عنوان منبع الکترون جهت تولید ROSتوسط سیستم آنزیمی NADPH اکسیداز مورداستفاده قرار می‌گیرد. مهار شنت هگزوزمونوفسفات باعث کاهش تولیدNADPH به‌عنوان اکی‌والان احیاء کننده در سلول می‌شود. در نتیجه عمل آنزیم گلوتاتیون‌پراکسیداز به گلوتاتیون (G-SH) به فرم اکسید شده آن تبدیل می‌گردد. سلول برای احیای مجدد گلوتاتیون اکسید شده به NADPH احتیاج دارد، بنابراین کاهش سطح NADPH به‌علت مهار آنزیم G6PD باعث کاهش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز به‌عنوان سد دفاعی آنتی‌اکسیدانتی می‌شود، بنابراین میزان

Archive of SID

www.SID.ir

پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای اسپرم افزایش می‌یابد، در نتیجه سیالیت غشاء کاهش پیدا می‌کند، نتیجه‌ی این تغییرات کاهش جنبایی اسپرم خواهد بود (۲۵ و ۲۶). بررسی نتایج حاصل که اثر میدان مغناطیسی با شدت‌های مختلف بر رقیق‌کننده استفاده شده در محیط انجمادی اسپرم خروس بود، نشان می‌دهد که هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های شاهد، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ گوس از نظر اسپرم زنده، آپوپتوتیک و مرده مشاهده نشد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که استفاده از رقیق‌کننده مغناطیسی شده در محیط انجماد اسپرم خروس، تفاوت معنی‌داری در میزان اسپرم‌های غیر نرمال ایجاد نکرد. فرض بر این است که اسپرم‌های صدمه‌دیده طی انجماد و ذوب باعث افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌شود که می‌تواند به اسپرم‌های نرمال موجود در همان نمونه آسیب بزند. فاکتورها و عوامل مختلفی وجود دارد که بر شدت بهینه این امواج بر نتایج انجماد تاثیرگذار است. مهم‌ترین این فاکتورها فرمولاسیون انجمادی است و به‌نظر می‌رسد اجزای رقیق‌کننده‌های انجمادی ازجمله قندها و نمک‌ها و بافرها بر نتایج امواج با شدت‌های مختلف تاثیرگذار است. همچنین از دیگر فاکتورهای تاثیرگذار تفاوت‌های گونه‌ای، مورفولوژی اسپرم و ترکیبات موجود در غشای اسپرم می‌باشد و با توجه به این‌که مورفولوژی اسپرم در خروس ساختاری کاملا متفاوت و مجزا با اسپرم پستانداران دارد، این قابل پیش‌بینی است که میزان شدت بهینه امواج در خروس و سایر گونه‌ها متفاوت باشد. امواج باعث افزایش نفوذ نگه‌دارنده‌های انجمادی به‌داخل اسپرم می‌شود. آب مغناطیسی شده نگه‌دارنده‌های انجمادی مثل لسیتین سویا را بهتر در خود حل می‌کند و باعث می‌شود پوشش آپولیپوپروتئینی لسیتین سویا غشا اسپرم را بهتر حفاظت کند.

نتیجه‌گیری

اگرچه فاکتورها و عوامل متنوعی می‌توانند بر نتایج مغناطیسی کردن رقیق‌کننده‌های انجمادی تاثیرگذار باشند، اما به‌نظر می‌رسد مغناطیسی کردن مستقیم رقیق‌کننده انجمادی در پرندگان نتایج مفیدی نداشته باشد. شاید به‌دلیل بالاتر بودن فشار اسمزی رقیق‌کننده‌های پرندگان و بالا بودن تعداد نمک‌های موجود در آن‌ها سبب عدم تاثیرگذاری امواج مغناطیسی بر خود رقیق‌کننده‌ها شده باشد. با این حال انجام مطالعات بیشتر هم در نحوه ساخت رقیق‌کننده و هم در نحوه مغناطیسی کردن مستقیم خود رقیق‌کننده توصیه می‌شود.

منابع

1. Bailey JL, Bilodeau J, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. J Androl. 2000; 21(1): 1-7.

2. Noirault J, Brillard J. Effects of frequency of semen collection on quantitative and qualitative characteristics of semen in turkey breeder males. Poult Sci. 1999; 78(7): 1034-1039.

3. Douard V, Hermier D, Magistrini M, Labbe C. Impact of change in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology. 2004; 61: 1-13.

4. Long J, Kulkarni G. An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. Poult Sci. 2004; 83(9): 1594-1601.

5. Auger JA, Ronot XA, Dadoune JP. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. J Androl. 1989; 10(6): 439-48.

6. Fattah A, Sharafi M, Masoudi R, Shahverdi A, et al. L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. Cryobiology. 2017; 74: 148-153.

7. Shahverdi A, Sharafi M, Gourabi H, Yekta AA, et al. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-

Archive of SID

www.SID.ir

8. Emamverdi M, Zhandi M, Zare Shahneh A, Sharafi M,et al. Optimization of ram semen cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin-based extender. Reprod Domest Anim. 2013; 48(6): 899-904.

9. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Meth Enzym. 1990; 186: 407–421.

10. Lowe S, Lin A. Apoptosis in cancer. Carcinogenesis. 2000; 21(3): 485–495.

11. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis، autophagy and the cross-talk between them. Cell Death Diff. 2009; 16(7): 966-975.

12. Lane JD, Lucocq J, Pryde J, Barr FA, et al. Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. J Cell Biol. 2002. 156(3): 495-509.

13. Chiu R, Novikov L, Mukherjee S, Shields D. A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis. J Cell Biol. 2002; 159(4): 637-648.

14. Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. Natur Rev Can. 2008; 8(2): 121-132.

15. Broadhead ML, Dass CR, Choong PF. Cancer cell apoptotic pathways mediated by PEDF: prospects for therapy. Trend Molecul Med. 2009; 15(10): 461-467.

16. Chun-Yen L, Po-Li W, Wei-Jen C, Yung-Kai H, et al. Slow freezing coupled static magnetic field exposure enhances cryopreservative efficiency—A study on human erythrocytes. PloS one. 2013; 8(3):e58988.

17. 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(5): 690-697.

18. Krems RV. Breaking van der Waals molecules with magnetic fields. Phys Rev Lett. 2004; 93: 013201.

19. Chang KT, Weng CI. An investigation into the structure of aqueous NaCl electrolyte solutions under magnetic fields. Comp Mat Sci. 2008; 43(4): 1048-1055.

20. Gliozzi T, Zaniboni L, Cerolini S. DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology. 2011; 75(9): 1613-1622.

21. Suga D, Shinjo A. Effects of 600 gauss static magnetic field on the freezing of cattle sperm. J Magnet Soc Japan. 1997; 21: 1134-1137.

22. Falahati SA, Anvari M, Khalili MA. Effects of combined magnetic fields on human sperm parameters. Iran J Radiat Res. 2011; 9(3): 195-200.

23. Tateno H, Iijima S, Nakanishi Y, Kamiguchi Y, et al. No induction of chromosome aberrations in human spermatozoa exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. Mut Res. 1989; 414: 31–35.

24. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez M, Sharma R, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Hum Reprod. 2001; 16(9): 1922-1930.

25. Armstrong JS, Bivalacqua TJ, Chamulitrat W, Sikka S, et al. A comparison of the NADPH oxidase in human sperm and white blood cells. In J Androl. 2002; 25(4): 223-229.

26. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiw MA. Role of reactive oxygen species in the density lipoprotein. Theriogenology. 2015; 83(1): 78-85.

Archive of SID

www.SID.ir

pathophysiology of human reproduction. Fertil Ster. 2003; 79(4): 829-843.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Spring 2017; 8(1)

Physiological effects of magnetized freezing extender on cellular, chemical and fertility parameters of rooster semen after thawing

Sharafi M, Ph.D.*, Asgariazadeh Z, M.Sc., Karimi Torshizi MA, Ph.D.

- Department of Poultry Science, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

* Email corresponding author: m.sharafi@modares.ac.ir

Received: 30 May. 2017 Accepted: 5 Sep. 2017

Abstract

Aim: This study was carried out to investigate the application of different magnetic intensities on the sperm freezing medium.

Material and methods: In this experiment, the magnetic field induction of 0, 2000, 4000 and 6000 Gauss was used to determine the optimum intensity during the freeze-thawing process. Semen samples were collected from 10 pieces of 24-week-old Ross 308 broiler chickens using abdominal massage technique. In this study, the experimental treatments were: 1) ordinary diluent, 2) G2000-intensive magnetic diluent, 3) G4000-intensive magnetic diluent, and G6000-intensive magnetic diluent. The used diluent in this study was the Lake diluent. This diluent was mixed with 1% soy lecithin and 5% glycerol, and then on the basis of the experimental treatments, they encountered different magnetic intensities. Diluted sperm was frozen based on each treatment, after cooling in a 0.25 ml straws. After freezing some sperm parameters such as total and progressive motilities, morphology, membrane integrity, MDA production, apoptosis status and mitochondrial activity were evaluated.

Results: Results showed that different magnetic fields had no significant effect on total and progressive mobilities, membrane integrity, morphology, lipid peroxidation, acrosome integrity and apoptosis mechanisms of rooster sperm. Just mitochondrial membrane potential in the control group was higher than other groups (60.5%, $P<0.05$).

Conclusion: It seems that exposure of rooster semen cryopreservation media with magnetic field cannot be efficient for quality of sperm after thawing.

Keywords: freezing-thawing, rooster sperm, magnetic waves, extender

Archive of SID

www.SID.ir