Archive of SID

علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۵، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۳ (ص ۳۴۲-۳۳۵)

اثر افزودن سطوح متفاوت سولفات روی به رقیق‌کنندهٔ منی بر کیفیت اسپرم گاو پس از انجماد-ذوب

فردین فرهادی [۱]، آرمین توحیدی [۲*] و ملک شاکری [۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۶/۱۱)

چکیده

هدف از این پژوهش، مقایسهٔ اثر افزودن سطوح متفاوت روی به رقیق‌کنندهٔ منی بر ویژگی‌های حیاتی اسپرم پس از انجماد در گاو بود. اسپرم‌گیری از چهار گاو نر هلشتاین هفته‌ای دو بار انجام شد و سپس نمونه‌های مناسب با هم مخلوط شدند. نمونه‌های اسپرم (در پنج تکرار) به چهار گروه شامل سطوح صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومول روی (Zn-0, Zn-50-Zn-100, Zn-150) اختصاص داده و منجمد شدند. نمونه‌های اسپرم بعد از انجماد از نظر جنبایی و ریخت‌شناختی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشا، سلامت آکروزوم، پراکندگی کروماتین اسپرم و تولید مالون‌دی‌الدئید بررسی شدند. اختلاف معناداری در درصد جنبایی و ریخت‌شناسی اسپرم در محیط‌های دارای روی با گروه شاهد وجود نداشت. گروه‌های Zn-100 و Zn-150 دارای درصد بیشتری از اسپرم‌های با آکروزوم سالم در مقایسه با شاهد بودند (p<۰/۰۰۵). زنده‌مانی و یکپارچگی غشا در گروه Zn-100 از گروه شاهد بهتر بود (P<۰/۰۵ و P<۰/۰۱). درصد اسپرم‌های با DNA آسیب‌دیده در گروه Zn-150 در گروه مقایسه با گروه‌های دیگر بیشتر بود (p<۰/۰۰۵). درصد تولید مالون‌دی‌آلدهید در گروه Zn-100 و Zn-150 از بقیهٔ گروه‌ها کمتر بود (P< ۰/۰۵). بنابراین استفاده از روی در رقیق‌کنندهٔ منی گاو سبب بهبود برخی فراسنجه‌های اسپرم بعد از فرایند انجماد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، رقیق‌کننده، روی، گاو.

مقدمه

یکی از فناوری‌های مهم برای حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی، انجماد اسپرم است. با این حال انجماد باعث آسیب به اسپرم شامل کاهش جنبایی، زنده‌مانی و آسیب به غشای اسپرم و DNA می‌شود (Vishwanath & Shannon, 2000; Medeiros *et al*., 2002). آسیب‌ها شامل تشکیل بلورهای یخی، استرس اکسیداتیو، تغییرات اسمزی و سازمان‌دهی مجدد لیپید-پروتئین در غشای سلولی است (Bailey *et al*., 2000). تنش اکسیداتیو از مهم‌ترین عوارض ناشی از فرایند انجماد-ذوب برای اسپرم است. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی موجود در سلول‌های اسپرم در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها طی فرایند انجماد- ذوب ناکافی به نظر می‌رسد، زیرا غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها در فرایند رقیق‌سازی کاهش قابل توجهی می‌یابد. از طرفی اسپرم پستانداران فاقد یک جزء سیستوپلاسمیک مهم آنتی‌اکسیدانی است که با آثار زیان‌بار رادیکال‌های فعال اکسیژنی و پراکسیداسیون لیپیدی مقابله کند (Surai *et al*., 1998). محافظ سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در مرحلهٔ اول منشأ سیتوپلاسمی دارد و چون اسپرم در مرحلهٔ انتهایی تمایز، بخش بیشتری از سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهد، در نتیجه رادیکال‌های آزاد در حین انجماد و

* تلفن: ۰۹۱۲۱۴۰۴۰۸۱
E-mail: atowhidi@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

یخ‌گشایی باعث اختلال در عملکرد اسپرم می‌شوند (Aitken & Fisher, 1994). رادیکال‌های آزاد در غلظت‌های کنترل‌شده و پایین در عملکردهای خاصی از اسپرم از قبیل ظرفیت‌دار شدن و واکنش آکروزومی نقش تنظیم‌کننده دارند. بنابراین برای درک کامل عملکرد اسپرم باید تعادل مهم لیپیدها، رادیکال‌های فعال اکسیژنی و اجزای مختلف سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول را در نظر گرفت. اضافه‌کردن آنتی‌اکسیدان‌های لازم برای محافظت از غشای سلول‌های اسپرم و جلوگیری از تشکیل پراکسیداسیون اکسیژن لازم و ضروری است و می‌تواند اثرات زیان‌بار رادیکال‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داده و سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی منی از قبیل جنبایی و یکپارچگی غشا پس از ذوب شود (Aisen *et al.*, 2002). روی یکی از عوامل کمکی آنزیم سوپراکسیددسموتاز است که سبب دیس موتاسیون آنیون سوپر اکساید (ناشی از متابولیسم هوازی‌شده) می‌شود و آن را به هیدروژن پراکساید تبدیل می‌کند. روی علاوه بر نقش کوفاکتوری برای سوپر اکسید دیس موتاز با القای سیگنال‌های پاسخ به تنش در مقابله با استرس اکسیداتیو نقش دارد (Klotz *et al.*, 2003). روی با چند سازوکار به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم از ایجاد و گسترش آسیب‌های اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (Powell, 2000). روی به‌طور برگشت‌پذیری به اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره‌بلند متصل به فسفولیپیدهای غشایی مانند اسید آراشیدونیک متصل می‌شود. تصور می‌شود که روی سبب محافظت اسیدهای چرب غیراشباع در برابر اکسیداسیون ناشی از آهن در محیط درون تنی می‌شود (Hida *et al.*, 1995). معلوم شده که روی برای ساخت اسپرم و تولید تستوسترون ضروری است (Kvist *et al.*, 1987). اضافه‌کردن روی باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم می‌شود و لیپیدهای غشای اسپرم را از پراکسیداسیون محافظت می‌کند (Hidiroglou & Knipfel, 1984). غلظت روی مایع منی ارتباط مستقیم با جنبایی، زنده‌مانی و ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم‌ها دارد (Alavi-Shoushtari *et al.*, 2009).

کامل‌بودن DNA اسپرم برای انتقال موفقیت‌آمیز صفات ژنتیکی به نسل بعد ضروری است. طی سال‌های گذشته علاوه بر ویژگی‌های حیاتی اسپرم مانند جنبایی و زنده‌مانی، سلامت DNA اسپرم پس از انجماد برای باروری کافی اسپرم مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین مراقبت از DNA اسپرم هنگام انجماد و یخ‌گشایی بسیار مهم است. رادیکال‌های آزاد طی انجماد و ذوب منی موجب مهار قدرت جنبایی، آسیب به DNA و نیز تغییر در شکل ظاهری سلول‌های اسپرم می‌شوند. افزودن روی به محیط رقیق‌کننده به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی از تأثیرات مخرب ROSها جلوگیری می‌کند، در نتیجه می‌تواند تأثیر مهمی در کاهش آسیب‌رسانی به DNA و پراکسیداسیون لیپید اسپرم طی انجماد منی داشته باشند (Kevist *et al.*, 1987).

عنصر روی همچنین با گروه‌های سولفدریل اسپرم در ارتباط است و باعث به‌وجودآمدن پیوندهای غیر کوالان s....Zn....s می‌شود. گروه‌های سولفدریل در ساختار کروماتین اسپرم باعث تشکیل پیوندهای دی سولفیدی می‌شوند. وجود این پیوندها علت پایداری ساختار کروماتین اسپرم است. این پیوندها در افزایش متراکم‌شدن کروماتین اسپرم در فرایند اسپرماتوژنز و در نتیجه محافظت بهتر طی فرایند انجماد-ذوب مؤثر هستند (Dissanayake *et al.*, 2010; Kotdawala *et al.*, 2012). اما در این خصوص در مورد گاو گزارشی وجود ندارد. بنابراین، هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر افزودن سطوح متفاوت روی به رقیق‌کنندهٔ منی گاو بر انجمادپذیری اسپرم و ویژگی‌های کیفی آن در گاو بود.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش

این پژوهش در مرکز آزمون نتاج گاوهای شیری وگوشتی ایران و گروه علوم دامی دانشگاه تهران واقع در کرج اجرا شد. رقیق‌کنندهٔ استفاده‌شده در این پژوهش رقیق‌کنندهٔ تجاری آندرومد (Minitube, Germany) بود و روی استفاده‌شده سولفات روی (Merck آلمان) بود. اسپرم‌گیری از چهار گاو نر بالغ هلشتاین انجام شد. جمع‌آوری منی با استفاده از مهبل مصنوعی هفته‌ای دو بار انجام گرفت. بی‌درنگ پس از جمع‌آوری منی و انتقال آن به آزمایشگاه بررسی‌های ابتدایی روی منی اجرا شد.

www.SID.ir

Archive of SID

حجم بین ۶-۴ میلی‌لیتر، غلظت بیش از ۱۰۹×۱/۵ در هر میلی‌لیتر و جنبایی پیش‌رونده بیشتر از ۷۵ درصد در هر انزال، به‌عنوان منی بهینه در نظر گرفته شد. پس از اطمینان از سالم‌بودن نمونه‌ها، منی جمع‌آوری‌شده از چهار گاو نر با هدف از میان برداشتن تأثیرات فردی با یکدیگر آمیخته شدند. در این پژوهش پنج تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد.

روش انجماد و ذوب اسپرم

نمونه‌های اسپرم در چهار گروه شامل سطوح صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومول سولفات روی (Zn-0, Zn-50-Zn-100, Zn-150) تقسیم شدند. رقیق‌سازی طوری انجام شد که در هر پایوت، غلظت پایانی اسپرم به ۱۰۶×۲۰ اسپرم زنده برسد. پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها داخل نی‌های ۰/۵ کشیده شد. سردسازی و بسته‌بندی نی‌ها با دستگاه نیمه‌خودکار (IMV, France) انجام گرفت. نی‌ها به مدت ۴-۳ ساعت در سردخانه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به دستگاه انجماد (IMV, France) که قبلاً دمای آن به ۴ درجهٔ سانتی‌گراد رسیده بود، منتقل شد و در ۹ دقیقه دمای آن به ۱۴۰- درجهٔ سانتی‌گراد رسید. در پی آن، نی‌ها داخل ازت مایع (۱۹۶-) غوطه‌ور شدند. برای ذوب منی پس از بیرون‌آوردن نی‌ها از نیتروژن مایع، نی‌ها ۳۰ ثانیه در آب ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گذاشته شد. برای ارزیابی (از هر تیمار برای هر تکرار) سه نی ذوب شد. سپس محتوای اسپرم به درون میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شد و ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوباسیون شد و سپس فراسنجه‌های اسپرم ارزیابی شد.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های منی

جنبایی اسپرم

با استفاده از سمپلر ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از نمونهٔ ذوب‌شده را روی لام گذاشته شده و با گذاشتن یک لامل، نمونه روی لام پخش شد. جنبایی اسپرم با استفاده از دستگاه آنالیز کامپیوتری اسپرم (Minitube-Germany) ارزیابی شد. برای برآورد درصد جنبایی اسپرم، سه میدان دید به‌صورت تصادفی گزینش و اجازه داده شد تا دستگاه آنالیز اسپرم میدان‌ها را بررسی کند و عدد پایانی به‌دست‌آمده به‌عنوان جنبایی هر نمونه در نظر گرفته شد.

یکپارچگی غشای اسپرم

در این پژوهش برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از آزمون هاس[1] استفاده شد. بعد از یخ‌گشایی نی‌ها به داخل میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری تخلیه شده و ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شد و سپس قسمت بالای میکروتیوب که حاوی رقیق‌کننده بود، جداسازی و بعد از آن ۱۰ میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک که حاوی فروکتوز و سیترات سدیم بود، اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه با تهیهٔ حداقل سه قطره (۱۰ میکرولیتر) از نمونهٔ انکوبه‌شده، با استفاده از میکروسکوپ معکوس فاز کنتراست (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) بررسی شد. در هر گروه تیماری با استفاده از دوربین قرارگرفته روی میکروسکوپ عکس گرفته شد و حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های با دم گره‌خورده نسبت به گره‌نخورده محاسبه شد (Revell & Mrode, 1994).

زنده‌مانی

برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ ائوزین-نیگروزین استفاده شد. برای این رنگ‌آمیزی ۲۰ میکرولیتر از نمونهٔ اسپرم روی لام قرار داده شد. بیست میکرولیتر از رنگ آمادهٔ ائوزین- نیگروزین نیز برداشته و روی نمونه ریخته شد و با سمپلر نمونه به‌آرامی به هم زده شد تا اسپرم با رنگ آمیخته شود. پس از ۳۰ ثانیه، ۲۰ میکرولیتر از نمونه برداشته و بر گوشهٔ لام دیگری گذاشته شد و با یک لام دیگر به‌آرامی گسترش یافت. پس از خشک‌شدن، لام در زیر میکروسکوپ (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ قرار گرفت. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگ‌شده و رنگ‌نشده محاسبه شد (WHO, 2010).

ریخت‌شناسی

برای بررسی ریخت‌شناسی در این پژوهش از محلول هانکوک استفاده شد. محیط هانکوک شامل ۶۲/۵

1. Hypo Osmotic Swelling (HOS)

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌لیتر فرمالین (۳۷ درصد)، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی سدیم، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر است. محلول نمکی سدیم شامل ۹/۰۱ گرم کلرید سدیم در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر است. محلول بافر خود از دو محیط جداگانه تشکیل شده است. محیط نخست شامل ۲۱/۶۸۲ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبدار ($H_2O_2 \times Na_2HPO_4$) در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و محیط دوم از ۲۲/۲۵۴ گرم فسفات پتاسیم ($KHPO_4$) در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر تشکیل شده است. با مخلوط‌کردن ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط نخست با ۸۰ میلی‌لیتر از محیط دوم، ۲۸۰ میلی‌لیتر محلول بافر تهیه می‌شود (Hancock, 1956). برای ارزیابی چند قطره از هر نمونهٔ منی به میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک اضافه شد. یک قطره از این محلول روی لام قرار داده شد و لامل به‌آرامی روی آن قرار گرفت و با استفاده از میکروسکوپ معکوس فاز کنتراست (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) بررسی شد. در هر گروه تیماری با استفاده از دوربین قرارگرفته روی میکروسکوپ عکس گرفته شد و حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. درصد اسپرم‌های طبیعی و اسپرم‌های غیرطبیعی شامل غیرطبیعی‌بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم محاسبه شد.

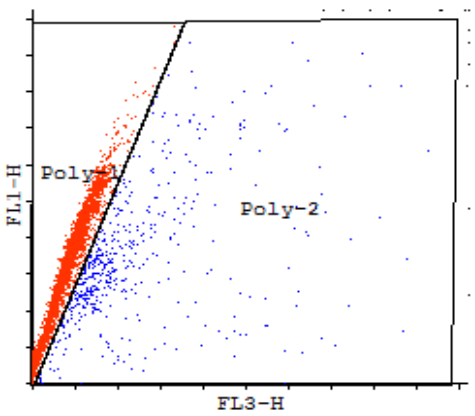
سلامت آکروزوم

برای ارزیابی وضعیت سلامت آکروزومی اسپرم از پروب فلوروسنت PSA-FITC[1] استفاده شد. رنگ PSA به اسپرم‌هایی دارای آکروزوم ناسالم که کلسیم‌شان تخلیه شده است، می‌چسبد. FITC رنگی فلورسنت است که به وسیلهٔ آن اسپرم‌های رنگ‌گرفته تشخیص داده می‌شود. ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید برای پیداکردن الگو با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (BX51; Olympus, 400x magnification) شمارش شد (Emamverdi *et al.*, 2013). اسپرم‌های دارای رنگ فلورسنت در ناحیهٔ آکروزوم به عنوان اسپرم دارای آکروزوم سالم و اسپرم‌های بدون رنگ فلورسنت یا رنگ جزئی در این ناحیه به عنوان اسپرم دارای آکروزوم آسیب‌دیده یا گسیخته شمارش شدند.

1. Pisum sativum agglutinin linked to fluorescein isothiocyanate

سلامت کروماتین و DNA اسپرم

بررسی سلامت کروماتین و DNA اسپرم با تست SCSA[2] و دستگاه فلوسایتومتری انجام شد. محتوای نی اسپرم بعد از یخ‌گشایی داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۵ دقیقه با دور ۵۰۰g سانتریفیوژ شد. بخش رویی به‌آرامی برداشته و دور ریخته شد. پلیت اسپرم باقیمانده در ۲ میلی‌لیتر بافر (۰/۱۵ میلی‌مول NaCl، ۱ میلی‌مول EDTA و ۱۰ میلی‌مولار تریس در pH=۷/۲) حل شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول برداشته و به آن ۴۰۰ میکرولیتر محلول اسیدی (۰/۱ درصد تریتون X-100 در ۰/۰۸ مول اسید هیدروکلریک و ۰/۱۵ مول NaCl) اضافه شد. بعد از ۳۰ ثانیه ۱۲۰۰ میکرولیتر آکریدین اورانژ (شامل ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول هیدروکلرید آکریدین اورانژ (A8097) در ۰/۱۵ مول NaCl، ۱ میلی‌مول EDTA، ۰/۲ میلی‌مول Na_2HPO_4 و ۰/۱ میلی‌مول اسید سیتریک در pH=۶) اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه اسپرم‌ها با دستگاه فلوسایتومتری (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) ارزیابی شد. فلورسنت سبز نشان‌دهندهٔ اسپرم با DNA سالم و فلورسنت قرمز نشان‌دهندهٔ اسپرم دارای DNA آسیب‌دیده در نظر گرفته شد (Topraggaleh *et al.*, 2013) (نمودار ۱).



نمودار ۱. نمودار آنالیز فلوسایتومتریک کروماتین اسپرم گاو بعد از انجماد- ذوب با رنگ‌آمیزی فلورسنت. POLY-1: نشان‌دهندهٔ اسپرم‌هایی با DNA آسیب‌دیده. POLY-2: نشان‌دهندهٔ اسپرم‌هایی با DNA سالم.

2. Sperm Chromatin Structure Assay

www.SID.ir

Archive of SID

مالون‌دی‌آلدئید

برای بررسی غلظت مالون‌دی‌آلدئید در این پژوهش از اسید تیوباربیتوریک استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر از هر نمونهٔ منی با ۱ میلی‌لیتر EDTA، ۱ میلی‌لیتر BHT و ۲ میلی‌لیتر TCA با هم مخلوط و در لولهٔ مخروط ریخته شدند. لوله‌ها در ۱۲۰۰ ×g برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژشدن، ۱ میلی‌لیتر از محلول بالای لوله با ۱ میلی‌لیتر TBA در میکروتیوب آمیخته شدند. لوله‌ها ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند. جذب نوری نمونه‌های مختلف به طول موج ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتری یادداشت شدند و در پایان غلظت مالون‌دی‌آلدئید محاسبه شد (Esterbauer & Cheeseman, 1990).

آنالیز آماری

ارزیابی نرمال‌بودن داده‌ها با رویهٔ univariate نرم‌افزار SAS انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SAS و به رویهٔ GLM در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. میانگین داده‌ها به روش LSMeans مقایسه و اختلاف معناداری در سطح ۰/۰۵ گزارش شد.

نتایج و بحث

در این بررسی محیط‌های حاوی روی بر درصد جنبایی اسپرم اثر معناداری نداشتند (جدول ۱). در پژوهشی که روی اسپرم انسان انجام گرفت، نشان داده شدکه اضافه‌کردن سطح ۱/۲ میکرومول بر میلی‌لیتر روی به محیط کشت، کاهش معناداری در درصد جنبایی اسپرم بین زمان‌های صفر و چهار ساعت ایجاد می‌کند، یعنی با گذشت زمان درصد جنبایی کاهش می‌یافت. اما اضافه‌کردن ۰/۶ میکرومول بر میلی‌لیتر به محیط کشت سبب افزایش جنبایی اسپرم در مقایسه با گروه شاهد شد، هرچند اختلاف معناداری مشاهده نشد. همچنین درصد بازیافت اسپرم در گروه ۰/۶ میکرومول بر میلی‌لیتر بیشتر بود و تفاوت معناداری با گروه شاهد داشت (Dissanayake *et al*., 2008).

میانگین درصد زنده‌مانی اسپرم در محیط حاوی ۱۰۰ میکرومول روی دارای بیشترین مقدار بود و اختلاف معناداری با گروه شاهد داشت ($P<0/05$) (جدول ۱). در پژوهشی روی اسپرم گاومیش، نشان داده شد که روی موجود در پلاسمای منی ارتباط مستقیمی با زنده‌مانی و جنبایی پیش‌رونده اسپرم‌ها دارد (Alavi-Shoushtari., 2009). بین روی پلاسمای منی و تعداد اسپرم ارتباط قابل توجهی وجود دارد (Netter *et al*., 1981). رادیکال‌های آزاد می‌توانند تأثیرات مضر و مفیدی بر عملکرد اسپرم داشته باشند. این تأثیرات متناسب با نوع و غلظت رادیکال‌های آزاد و مدت زمانی که اسپرم در معرض آن قرار می‌گیرد، متغیرند. نشان داده شده است که مقدار اندکی ROS توسط اسپرم‌ها در شرایط فیزیولوژیک ایجاد می‌شود که برای ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی اسپرم نیاز است، اما مقادیر زیاد آن با جنبایی و تعداد اسپرم رابطهٔ منفی دارد (Agarwal *et al*., 2006).

میانگین درصد یکپارچگی غشای اسپرم و سلامت آکروزوم در محیط حاوی ۱۰۰ میکرومول روی دارای بیشترین مقدار بود و به ترتیب اختلاف معناداری با سایر گروه‌ها و گروه شاهد و Zn-50 داشت (به ترتیب $P<0/01$ و ($p<0/005$) (جدول ۲). افزودن روی به عنوان آنتی‌اکسیدان به رقیق‌کنندهٔ منی از بی‌ثباتی غشای اسپرم هنگام یخ‌گشایی جلوگیری و همچنین به حفظ محتویات آکروزوم کمک می‌کند (Bettger & O'Dell, 1981). افزایش رادیکال‌های آزاد در مایع منی موجب پراکسیداسیون لیپید و آسیب به غشای اسپرم و آکروزوم آن می‌شود (Hidiroglou & Knipfel, 1984; Weisiger & Fridovich, 1973). در پژوهش حاضر نیز احتمالاً روی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی که دارد، مانع پراکسیداسیون لیپید و آسیب به غشا و آکروزوم شده است. در انسان محیط‌های سولفات روی دارای درصد بیشتری از اسپرم‌های با آکروزوم سالم در مقایسه با گروه شاهد بوده و اختلاف معناداری داشتند (Kotdawala *et al*., 2012).

در این پژوهش میانگین درصد اسپرم‌های طبیعی در محیط‌های حاوی سولفات روی با گروه شاهد اختلاف معنادار نداشت (جدول ۱). مکمل روی در قوچ‌های جوان باعث افزایش تولید اسپرم روزانه و کاهش تولید اسپرم‌های غیرطبیعی شد (Underwood & Somers,

www.SID.ir

Archive of SID

1969). همچنین رادیکال‌های آزاد در مایع منی موجب تغییر حرکت و مورفولوژی اسپرم می‌شود (Agarwal *et al.*, 2006). در هر حال برخلاف گزارش‌های فوق، در مطالعهٔ حاضر اثر روی بر مورفولوژی اسپرم دیده نشد.

جدول ۱. میانگین (± خطای استاندارد) درصد خصوصیات کیفی اسپرم بعد از انجماد در محیط‌های روی و گروه شاهد

مورفولوژی (٪)	زنده‌مانی (٪)	جنبایی پیش‌رونده (٪)	جنبایی کل (٪)	غلظت سولفات روی میکرو مول
۸۰/۸±۱/۳۱	۷۰/۶±۱/۲۵	۶۳/۹۸±۲/۷۶	۷۱/۷۶±۱/۲۳	۰
۸۱±۱/۳۱	۷۳/۸±۱/۲۵	۶۲/۲±۲/۷۶	۷۱/۲±۱/۲۳	۵۰
۸۵/۶±۱/۳۱	[b]۷۵/۲±۱/۲۵	۶۶/۱۸±۲/۷۶	۷۲/۵۸±۱/۲۳	۱۰۰
۸۰/۴±۱/۳۱	۷۱/۸±۱/۲۵	۵۷/۲۶±۲/۷۶	۶۸/۶۲±۱/۲۳	۱۵۰

b. اختلاف معناداری با گروه کنترل (p< ۰/۰۵).

میانگین درصد DNA آسیب‌دیده در محیط ۱۵۰ میکرومول در مقایسه با محیط‌های دیگر بیشتر بود و اختلاف معناداری با گروه شاهد و سایر گروه‌ها داشت (p<۰/۰۰۵) (جدول ۲). در یک پژوهش روی اسپرم انسان سطح ۱۰۰ میکرومول روی در مقایسه با گروه شاهد و سطوح دیگر روی (۰، ۱۰، ۵۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، میکرومول) دارای درصد بیشتری از DNA سالم بود و اختلاف معناداری با گروه شاهد داشت (Kotdawala *et al.*, 2012). روی باعث پایداری غشای سلول و کروماتین هستهٔ اسپرم می‌شود و فاکتور اصلی در برابر فعالیت‌های ضد باکتری است (Chia *et al.*, 2000) عنصر روی با گروه‌های سولفیدریل اسپرم در ارتباط است و باعث به‌وجودآمدن پیوندهای غیرکوالان s....Zn....s در ساختار کروماتین اسپرم می‌شود. در نتیجه سبب پایداری ساختار کروماتین اسپرم در فرایند اسپرماتوژنز شده و در محافظت بهتر طی فرایند انجماد-ذوب مؤثر است (Dissanayake *et al.*, 2010; Kotdawala *et al.*, 2012). اما برخلاف تصور، افزودن سولفات روی نه تنها نتوانست سبب بهبود شاخص سلامت کروماتین اسپرم شود، بلکه در محیط ۱۵۰ میکرو مول روی، قطعه‌قطعه‌شدن رشتهٔ DNA افزایش یافته و اختلاف معناداری با بقیهٔ محیط‌های انجماد اسپرم داشت. با توجه به آنکه ترشحات غدهٔ پروستات هم واجد مقدار زیادی از عنصر روی بوده است، در نتیجه سطح اخیر روی افزوده‌شده در این مطالعه احتمالاً دارای تأثیر منفی بر کروماتین اسپرم بوده است. همچنین غلظت زیاد روی موجب کاهش جذب اکسیژن توسط سلول اسپرم شده و تأثیر منفی بر فراسنجه های اسپرم دارد (Kevist *et al.*, 1987).

جدول ۲. میانگین (± خطای استاندارد) درصد خصوصیات کیفی اسپرم بعد از انجماد در محیط‌های روی و گروه شاهد

DNA آسیب‌دیده (٪)	مالون دی آلدئید (٪)	سلامت اکروزوم (٪)	یکپارچگی غشا (٪)	غلظت سولفات روی میکرو مول
۴/۳۷±۰/۲	۱/۱۲±۰/۱۳	۷۶/۷۸±۱/۳۹	۶۱/۸±۱/۱۴	۰
۴/۰۶±۰/۲	۰/۸±۰۱۳	۷۷/۸±۱/۳۹	۶۲/۵±۱/۱۴	۵۰
۴/۲۴±۰/۲	[c]۰/۵۶±۰/۱۳	[a]۹۰/۰۹±۱/۳۹	[b]۶۸/۳±۱/۱۴	۱۰۰
[a]۵/۶۴±۰/۲	[c]۰/۶۷±۰/۱۳	[a]۸۱/۲۶±۱/۳۹	۶۵/۳±۱/۱۴	۱۵۰

a b c. میانگین‌هایی که با گروه کنترل اختلاف معناداری دارند ([a]p<۰/۰۰۵، [b]p< ۰/۰۱، [c]p<. ۰/۰۵).

میانگین درصد تولید مالون‌دی‌آلدئید در محیط‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومول روی کمتر بود و اختلاف معناداری با گروه شاهد داشت (P< ۰/۰۵) (جدول ۲). روی با جایگزین‌کردن آهن (III) با آهن (II) مانع ورود آهن در چرخهٔ تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (Ohkawa *et al.*, 1979). در پژوهشی اثر روی بر آسیب‌های اکسیداتیو در بیضهٔ موش‌ها بررسی شد و نتایج نشان داد که غلظت آهن در بیضهٔ موش‌های با جیرهٔ غذایی کمبود روی، بیشتر بوده و تفاوت معناداری با جیره‌های غذایی دارای روی داشتند. آسیب‌های اکسیداتیو مشاهده‌شده ممکن است در اثر

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش رادیکال‌های آزاد مربوط به تجمع آهن در بافت یا کاهش فرایندهای آنتی‌اکسیدانی وابسته به روی رخ داده باشد (Oteiza *et al.*, 1995). اضافه‌کردن عنصر روی در نمونه‌های اسپرم انسان، تفاوت معناداری از لحاظ پراکسیداسیون چربی‌ها و تورم هایپواسموتیک با گروه شاهد ایجاد کرد، بنابراین روی دارای تأثیرات آنتی‌اکسیدانی است (Arabi, 2005). غلظت اکسیژن با سطح بالای روی در مایع منی کاهش می‌یابد و باعث اختلال در مصرف اکسیژن توسط اسپرم می‌شود (Wong *et al.*, 2001).

در آزمایش حاضر اثر افزودن سولفات روی به محیط انجماد اسپرم گاو بر ویژگی‌های کیفی و حیاتی اسپرم ارزیابی شد. در این مطالعه خاصیت آنتی‌اکسیدانی سولفات روی و اثر مفید آن بر انجمادپذیری اسپرم با کاهش تولید مالون دی آلدهید نشان داده شد. همچنین، در این آزمایش برای نخستین بار در گاو احتمال دخالت عنصر روی در پایداری کروماتین اسپرم طی فرایند انجماد-ذوب ارزیابی شد. نتایج به‌دست‌آمده نتوانست چنین نقشی را برای سولفات روی در اسپرم گاو البته در سطوح بررسی‌شده به اثبات برساند. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی از سطوح پایین‌تر سولفات روی یا اشکال شیمیایی دیگر روی برای ارزیابی چنین سازوکاری استفاده شود.

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این پژوهش نشان داد که استفاده از دُز مناسب روی می‌تواند به عنوان مکملی مناسب در رقیق‌کنندهٔ منی از اسپرم گاو محافظت بهتری کند.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به دلیل فراهم‌کردن امکانات مالی و تجهیزاتی برای اجرای این طرح پژوهشی کمال قدردانی می‌شود. از مدیر عامل محترم شرکت نهاده‌های دامی جاهد جناب آقای مهندس ورناصری و مدیریت و کارکنان محترم مرکز آزمون نتاج گاوهای شیری و گوشتی ایران که امکانات مورد نیاز اجرای این طرح را مهیا کردند نیز تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Agarwal, A., Gupta, S. & Sikka, S. (2006). The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 18(3), 325-332.
2. Aisen, E. G., Medina, V. H. & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57(7), 1801-1808.
3. Aitken, J. & Fisher, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, 16(4), 259-267.
4. Alavi-Shoushtari, S., Rezai, S. A., Ansari, M. K. & Khaki, A. (2009). Effects of the seminal plasma zinc content and catalase activity on the semen quality of water buffalo (Bubalus bubalis) bulls. Pakistan *Journal of Biological Sciences*, 12(2), 134-139.
5. Arabi, M. (2005). Antioxidant effect of manganese on human spermatosoa treated in the different conditions comparision with zinc, nickle, and trolox. *Iranian Journal of BiologyI*, 17 (3). (in Farsi)
6. Bailey, J. L., Blodeau, J. F. & Cormier, N. Y (2000). Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon Minireview. *Journal of andrology*, 21(1), 1-7.
7. Bettger, W. J. & O'Dell, B. L. (1981). A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sciences*, 28(13), 1425-1438.
8. Chia, S.E., ONG, C.N., Chua, L.H., Ho, L.M. & Tay, S.K. (2000). Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *Journal of Andrology*, 21(1), 53-57.
9. Chvapil, M. (1973). New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sciences*,13(8), 1041-1049.
10. Dissanayake, D. M. A. B., Wijesinghe, P. S., Ratnasooriya, W. D., Wilmalasena, S. & Palihawadana, T.S. (2006). Effects of different Zinc levels in the sperm culture medium on sperm recovery and quality of sperms in the swim up procedure for sperm processing *Ceylon Journal of Medical Science*, 49, 21-27.
11. Emamverdi, M., Zhandi, M., Shahneh, A.Z., Akhlaghi, A. & Motlagh, M.K. (2014). Flowcytometric and microscopic evaluation of post-thawed ram semen cryopreserved in chemically defined home-made or commercial extenders. *Animal Production Science*, 55(4), 551-558.
12. Esterbauer, H. & Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*, 186, 407-421.
13. Hancock, J. (1956). The morphology of boar spermatozoa. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 76(3), 84-97.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Hida, H., Coudray, C., Calop, J. & Favier, A. (1995). Effect of antioxidants on adriamycin-induced microsomal lipid peroxidation. *Biological trace element research*, 47(1-3), 111-116.
15. Hidiroglou, M. & Knipfel, J. (1984). Zinc in mammalian sperm: a review. *Journal of Dairy Science*, 67(6), 1147-1156.
16. Klotz, L. O., Kröncke, K.D., Buchczyk, D. P. & Sies, H. (2003) Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *The Journal of nutrition*, 133(5), 1448-1451.
17. Kotdawala, A. P., Kumar., S., Salian, S. R., Thankachan, P., Govindraj, k. Kumar, P., Kalthur, G. & Adiga, S. k. (2012). Addition of zinc to human ejaculate prior to cryopreservation prevents freeze-thaw-induced DNA damage and preserves sperm function. *Journal of assisted reproduction and genetics* 29(12), 1447-1453.
18. Kvist, U., Björndahl, L. & Kjellberg, S. (1987). Sperm nuclear zinc, chromatin stability, and male fertility. *Scanning microscop*y, 1(3), 1241.
19. Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D. & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better *Theriogenology*, 57(1), 327-344.
20. Netter, A., Nahoul, K. & Hartoma, R. (1981). Effect of zinc administration on plasma testosterone, dihydrotestosterone, and sperm count. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 7(1), 69-73.
21. Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
22. Oteiza, P. I., Olin K. L., Fraga, C. G. & Keen C. L. (1995). Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *The Journal of Nutrition*, 125, 823-9.
23. Powell, S. R. (2000). The antioxidant properties of zinc. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1447S-1454S.
24. Revell, S. & Mrode, R. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal reproduction science*, 36(1), 77-86.
25. Surai, P., Blesbois, E., Grasseau, I., Chalah, T., Brillard, J. P., Wishart, G. J., Cerolini, S. & Sparks, N. H. C. (1998). Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: *Biochemistry and Molecular Biology*, 120(3), 527-533.
26. Topraggaleh, T., Shahverdi, A., Rastegarnia, A., Ebrahimi, B., Shafiepour, V. Esmaeili, V. & Janzamin, E. (2014). Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of buffalo bull. *Andrologia*, 46(7),777-783.
27. Underwood, E. Somers, M. (1969). Studies of zinc nutrition in sheep. I. The relation of zinc to growth, testicular development, and spermatogenesis in young rams. *Crop and Pasture Science*, 20(5), 889-897.
28. Vishwanath, R. & Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 23-53.
29. Weisiger, R. A. & Fridovich, I. (1973). Mitochondrial superoxide dismutase site of synthesis and intramitochondrial localization. *Journal of Biological Chemistry*, 248(13), 4793-4796.
30. WHO. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, World Health Organization.
31. Wong, W.Y., Flik, G., Groenen, P.M.W., Swinkels, D.W., Thomas, C. M. G., Copius- peereboom, H. J. C., Merkus, H. M. W. M. & Steegers-Theunissen, R. P. M. (2001). The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reproductive toxicology*, 15(2), 131-136.

www.SID.ir