علوم دامی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۲، تابستان ۱۳۹۵ (ص ۲۲۲-۲۱۵)
DOI: 10.22059/ijas.2016.59026

توانایی پاداکسندۀ آنزیمی کاتالاز در بهبود انجمادپذیری اسپرم اسب ترکمن

افشین سیفی جمادی[۱]، احمد زارع شحنه[۲*]، حمید کهرام[۳]، ابوالفضل اکبری[٤]، محسن ضامن[٥] و ابوالفضل واخیده[٦]

۱ و ۲. دانشجوی دکتری و استاد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۳. استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و استادیار مؤسسۀ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

٤، ٥ و ٦. استادیار، کارشناس علوم آزمایشگاهی و کارشناس دامپزشکی، مؤسسۀ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۸- تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۱۲/۳)

چکیده

هدف از انجام این آزمایش بررسی تأثیر پاداکسندۀ (آنتی‌اکسیدان) آنزیمی کاتالاز بر بهبود انجمادپذیری اسپرم اسب‌های ترکمن بود. در این پژوهش چهار سر نریان بالغ ترکمن با میانگین سنی هشت تا ده سال برای اسپرم‌گیری به کار گرفته شد. پس از گرفتن منی و فرآوری آن در آزمایشگاه، اسپرم‌های رقیق‌شده به گروه‌های تیماری حاوی ۰ (شاهد)، ۱۰۰ (CAT100)، ۱۵۰ (CAT150) و ۲۰۰ (CAT200) واحد پاداکسندۀ کاتالاز در هر میلی‌لیتر رقیق‌کنندۀ تقسیم‌شدۀ و با یک روش استاندارد، منجمد شدند. پس از یخ‌گشایی برای همۀ تیمارها جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشا، ناهنجاری کل و میزان پراکسیداسیون لیپیدی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که افزودن ۲۰۰ واحد بر میلی‌لیتر کاتالاز به رقیق‌کنندۀ اسپرم اسب، سبب بهبود فراسنجه‌های جنبایی کل، زنده‌مانی، یکپارچگی غشایی و کاهش پراکسیداسیون لیپید، نسبت به گروه شاهد و دیگر گروه‌های تیماری شد (P<۰/۰۵). همچنین تیمار ۱۵۰ واحد بر میلی‌لیتر کاتالاز نیز سبب بهبود جنبایی کل، زنده‌مانی و کاهش پراکسیداسیون لیپید نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). همچنین نتایج نشان می‌دهد که افزودن ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر کاتالاز تأثیر مثبتی روی اغلب فراسنجه‌های کیفی اسپرم ندارد (P>۰/۰۵). بر پایۀ نتایج به‌دست‌آمده، تیمارهای آزمایشی تأثیری در کاهش اسپرم‌های نابهنجار نسبت به گروه کنترل نداشتند (P>۰/۰۵). درنتیجه می‌توان گفت که افزودن ۲۰۰ واحد بر میلی‌لیتر کاتالاز به رقیق‌کننده، سبب بهبود انجمادپذیری اسپرم اسب‌های ترکمن می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسب ترکمن، انجماد اسپرم، پراکسیداسیون لیپید، رادیکال‌های آزاد، کاتالاز.

مقدمه

تلقیح مصنوعی[۱] مهم‌ترین فنی است که برای بهنژادی حیوانات ارائه شده است. با به‌کارگیری این فناوری، تنها با چند رأس حیوان نر انتخابی، می‌توان اسپرم موردنیاز برای تلقیح هزاران ماده را تأمین کرد. از برتری‌های منجمد کردن اسپرم می‌توان به بارور کردن همزمان شمار زیادی دام ماده با استفاده از اسپرم دام‌های نر با نژاد برتر، حذف هزینه‌های مربوط به نگهداری حیوانات نر، جابه‌جایی آسان مایع منی از مراکز تولید و گردآوری به دورترین مکان‌ها، از بین

* تلفن: ۰۲۶-۳۲۲۴۸۰۸۲
E-mail: azareh@ut.ac.ir

1. Artificial insemination

رفتن اثر فصل در جفت‌گیری، همچنین ذخیرهٔ ژن‌ها برای استفادهٔ آینده و تضمین در مقابل از دست دادن نرهای منحصربه‌فرد و جلوگیری از انقراض نسل نژادهای خاص اشاره کرد (Holt, 2000).

ساختار ویژهٔ غشای پلاسمایی اسپرم پستانداران میزان زیادی اسیدهای چرب غیراشباع دارد که سبب افزایش حساسیت غشای اسپرم نسبت به پراکسیداسیون لیپید[1] می‌شود. نظر به اینکه طی فرآوری اسپرم اسب پلاسمای منی که حاوی بیشتر فراسنجه‌های دخیل در ظرفیت پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) اسپرم است جدا می‌شود، حساسیت نسبت به آسیب‌های اکسندگی در اسپرم اسب بیشتر از دیگر گونه‌ها نمود پیدا می‌کند (Baumber *et al*., 2005; Loomis & Squires, 2005; Squires, 2005; Alvarenga *et al*., 2012).

مواد پاداکسندگی نقش مهمی در خنثی‌سازی انواع رادیکال‌های آزاد دارند، ولی متأسفانه در بیشتر موارد ویژگی پاداکسندگی رقیق‌کننده‌های رایج ضعیف است. همچنین، ظرفیت پاداکسنده‌های اسپرم در مقایسه با دیگر یاخته‌ها نیز پایین‌تر است (Kefer *et al*., 2009). بر پایهٔ تعریف، رادیکال آزاد مولکول اکسیژنی است که الکترون جفت‌نشده داشته باشد. این ترکیب‌ها در فرآیند فسفرزایی (فسفریلاسیون) اکسایشی (اکسیداتیو) در میتوکندری، به‌عنوان فرآوردهٔ جانبی تولید می‌شوند. تنش‌های اکسایشی هنگامی به وجود می‌آیند که نبود تعادل بین رادیکال‌های آزاد (ROS)[2] و پاداکسنده‌ها وجود داشته باشد. به‌رغم اینکه سطح متوسطی از ROS می‌تواند در فرآیندهای طبیعی بلوغ، ظرفیت‌پذیری[3] و واکنش آکروزومی نقش کمک‌کننده داشته باشد؛ اما باید توجه داشت که ROS بیش‌ازحد کاهش جنبایی و کاهش توان باروری اسپرم ذخیره‌شده را به ارمغان می‌آورد. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که می‌توان با افزودن پاداکسنده‌ها به رقیق‌کننده‌های منی سطح تولید ROS را تعدیل کرد (Ball, 2008). گزارش شده است که افزایش تولید ROS در میتوکندری سبب آغاز یک چند از فرآیندها در یاخته می‌شود که باعث از بین رفتن یاخته خواهند شد. رادیکال‌های تولیدی باعث آسیب به دیوارهٔ میتوکندری شده و درنتیجه سبب نشت الکترون از زنجیرهٔ انتقال الکترون می‌شوند، الکترون‌های نشت‌شده باعث تشکیل یون سوپراکسید و به دنبال آن تولید پراکسید هیدروژن خواهند شد که این رادیکال‌ها درنهایت باعث اکسید شدن هرچه بیشتر دیوارهٔ یاخته و تولید بیشتر ROS می‌شوند. رادیکال‌های آزاد با اتصال به DNA یاخته سبب آسیب به آن شده و درنتیجه یک سری واکنش‌های زنجیره‌ای فعال می‌شود که با مرگ یاخته همراه است. بنابراین کوچک‌ترین افزایش در رادیکال‌های تولیدی در میتوکندری سبب اختلال عملکرد و درنهایت مرگ یاخته می‌شود (Aitken *et al*., 2012; Agarwal *et al*., 2014). در حالت عادی مولکول اکسیژن یک جفت الکترون جفت‌نشده دارد که این الکترون‌ها، اکسیژن را مستعد تبدیل‌شدن به رادیکال آزاد می‌کنند. هنگامی‌که رادیکال‌های آزاد الکترون خود را به ساختارهای یاخته‌ای منتقل می‌کنند (لیپیدهای دیوارهٔ یاخته‌ای، آمینواسیدها و یا اسیدهای نوکلوئیک) سبب بروز آسیب در یاخته می‌شوند. تولید بیش‌ازحد ROSها در شرایط فیزیولوژیک یا بیماری شناختی (پاتولوژیک) خاص صورت می‌گیرد، به‌طور مثال در گلبول‌های سفید تولید مقدار زیاد رادیکال‌های آزاد به‌عنوان سامانهٔ دفاعی در برابر یاخته‌های مهاجم است (Seifi-Jamadi *et al*., 2016; Sanocka & Kurpisz, 2004).

یاختهٔ جنسی نر نیز در مراحل مختلف تمایز رادیکال‌های آزاد را تولید می‌کند که بخشی از این رادیکال‌ها برای تنظیم ظرفیت‌دار شدن اسپرم، واکنش آکروزومی و برای فرآیند پیوستن[4] اسپرم با اووسیت نیاز هستند. برای ادامه یافتن عملکرد حیاتی اسپرم، باید بخش اضافی رادیکال‌های آزاد توسط پاداکسنده‌ها بی‌اثر شوند (Sikka *et al*., 1995; Seifried *et al*., 2006). هنگامی‌که حجم رادیکال‌های آزاد بر میزان پاداکسنده‌های دستگاه تولیدمثل نر فزونی یابد، تنش

1. Lipid peroxidation
2. Reactive oxygen species
3. Capacitation
4. Fuse

اکسایشی بروز می‌کند که سبب آسیب به یاخته‌ها، بافت‌ها و اندام‌های گوناگون تولیدمثلی می‌شود. تنش اکسایشی در مایع منی همبستگی بالایی با غلظت اسپرم در منی دارد که این تنش تأثیر بدی روی جنبایی و دیگر عملکردهای اسپرم به‌ویژه پیوستن اسپرم به اووسیت خواهد داشت (Agarwal & Sekhon, 2010; Bouayed & Bohn, 2010).

در پژوهشی Agarwal *et al.* (2014) گزارش کردند که میزان ROS موجود در مایع منی همبستگی منفی بسیار بالایی با جنبایی، شمار اسپرم و ریخت‌شناسی عادی اسپرم‌ها دارد. در نمونه‌های بررسی‌شده در این پژوهش میزان بالای ROS سبب کاهش معنی‌دار جنبایی و دیگر فراسنجه‌های کیفی اسپرم شد که این خود در افزایش ناباروری مردان بسیار تأثیرگذار است. پاداکسنده‌ها مهم‌ترین سامانهٔ دفاعی در برابر ناباروری ناشی از رادیکال‌های آزاد هستند. پاداکسنده‌های آنزیمی و غیرآنزیمی رادیکال‌های مازاد را از محیط خارج ساخته و سبب ایجاد تعادل بین پاداکسنده‌ها و تنش اکسایشی می‌شوند (Kefer *et al*., 2009; Da Silva *et al*., 2010; Luo *et al*., 2013).

کاتالاز پاداکسنده‌ای است که در حالت طبیعی در مایع منی برای محافظت از اسپرم در برابر رادیکال‌های آزاد یافت می‌شود. در پژوهشی (Gibb *et al*., 2013) گزارش شده است که افزودن کوئرسیتین و کاتالاز (به میزان ۲۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) به رقیق‌کنندهٔ منی نریان تأثیر مطلوبی روی جنبایی و زنده‌مانی اسپرم‌های تعیین جنسیت‌شده داشت. همچنین در گزارشی دیگر پژوهشگران به این نتیجه رسیدند که افزودن کاتالاز به رقیق‌کنندهٔ اسپرم گاو در رقیق‌کننده بر پایهٔ تریس-زردهٔ تخم‌مرغ سبب بهبود فراسنجه‌هایی مانند زنده‌مانی و جنبایی اسپرم شده، اما در رقیق‌کننده‌های بر پایهٔ سیترات-زردهٔ تخم‌مرغ، اثری بر بهبود این فراسنجه‌ها نداشت (Asadpour *et al*., 2012). همچنین نشان داده شده است که استفاده از کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان پاداکسنده‌های آنزیمی در رقیق‌کنندهٔ اسپرم‌های گرفته‌شده از اپیدیدمیس گوزن قرمز سبب بهبود در فراسنجه‌های مختلف هم در حالت تازه[1] و هم پس از فرآیند یخ‌زدن- یخ‌گشایی شده است (Fernández-Santos *et al*., 2007). در گزارشی دیگر نشان داده شده است که استفاده از کاتالاز در رقیق‌کننده بر پایهٔ لسیتین سویا پس از سردسازی، سبب بهبود زنده‌مانی اسپرم سگ تا هشت روز شد (Kmenta *et al*., 2011). بنابراین بر پایهٔ بررسی‌های یادشده، هدف از اجرای این آزمایش بررسی تأثیر پاداکسندهٔ آنزیمی کاتالاز بر ویژگی‌های اسپرم اسب‌های ترکمن پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی است.

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش، اسپرم‌گیری و آماده‌سازی نمونه‌ها

در این پژوهش از چهار سر نریان بالغ ترکمن با میانگین سنی هشت تا ده سال برای اسپرم‌گیری استفاده شد، که از جیرهٔ غذایی یکسانی استفاده می‌کردند. منی به‌صورت دو بار در هفته و به مدت سه هفته با واژن مصنوعی مدل میسوری از نریان‌ها گردآوری شد. منی هر نریان پس از فیلتر کردن (ساخت شرکت IMV فرانسه) به‌طور جداگانه در لوله‌های آزمایش (فالکون) ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده و درون محفظهٔ عایقی که با آب ۳۲ تا ۳۵ درجه پر شده بود به آزمایشگاه انتقال داده شد. بی‌درنگ پس از رسیدن به آزمایشگاه همهٔ نمونه‌های گرفته‌شده ارزیابی و اسپرم‌هایی که جنبایی کل بالای ۶۰ درصد داشتند برای ادامهٔ آزمایش برگزیده شدند (Fayrer-Hosken *et al*., 2008). برای حذف پلاسمای منی، نمونه‌های برگزیده‌شده به نسبت ۱:۱ با رقیق‌کننده‌ای (INRA-82) که از قبل در حمام آب گرم قرار داده شده است، رقیق شده و با دور g× ۶۰۰ به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس حدود ۹۰درصد محلول رویی بیرون ریخته شده و اسپرم‌ها با هدف از میان برداشتن اثر فردی، با یکدیگر آمیخته شدند، پس از تعیین غلظت نمونه‌ها، غلظت نهایی حدود ۲۰۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر رقیق‌کننده در نظر گرفته شد. سپس اسپرم‌های به‌دست‌آمده به رقیق‌کنندهٔ حاوی

1. Fresh

تیمارهای پاداکسندگی (شاهد، CAT100، CAT150، CAT200 که به ترتیب شامل ۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ واحد کاتالاز بر میلی‌لیتر بودند و به‌صورت الایکوت‌هایی[1] در آب مقطر تهیه شده بودند) افزوده شدند. نسبت رقیق‌سازی در هر تکرار بر پایهٔ غلظت اسپرم در نمونهٔ نهایی تعیین شد. کاتالاز و اجزای تشکیل‌دهندهٔ رقیق‌کننده از شرکت سیگما (*SIGMA ALDRICH St. Louis, MO, USA. CAT Number: 9001-05-2*) خریداری شده بود. رقیق‌کنندهٔ استفاده‌شده برای انجماد اسپرم در این آزمایش به‌صورت دستی ساخته شده و با شمارهٔ ۸۶۵۶۰ در مرکز مالکیت معنوی سازمان ثبت اختراع کشور ثبت شده است.

سردسازی و انجماد نمونه‌ها

پس از رقیق‌سازی، برای تعویض گلیسرول با آب موجود در اسپرم و کاهش دمای آن به ۴ تا ۵ درجهٔ سلسیوس نمونه‌ها برای مدت ۱۵۰ دقیقه در یخچال قرار داده شدند. اسپرم‌ها پس از رقیق و سرد شدن، در سردخانه به نی‌های (استرا) ۰/۵ میلی‌لیتری کشیده شده و انتهای آن‌ها با پودر پلی‌وینیل الکل[2] بسته شد. سپس با استفاده از جعبهٔ استایروفوم[3] پایوت‌ها در فاصلهٔ ۴ سانتی‌متری از بخار نیتروژن قرار داده شده و پس از ده دقیقه درون نیتروژن مایع شناور شدند. در مرحلهٔ پایانی، نی‌ها (پایوت‌ها) به گوبلت‌های نشان‌دار منتقل شده و تا زمان ارزیابی فراسنجه‌های کیفی در نیتروژن مایع نگهداری شدند (Seifi-Jamadi *et al*., 2016).

یخ‌گشایی و ارزیابی فراسنجه‌های کیفی

یخ‌گشایی در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس و به مدت سی ثانیه صورت گرفته و پس‌ازآن جنبایی اسپرم با استفاده از سامانهٔ تجزیه‌وتحلیل یارانه‌ای اسپرم[4] (*VideoTesT®, Sperm 3.1, Russia*)، ارزیابی شد.

زنده‌مانی با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین اندازه‌گیری شد. برای این کار حدود ۱۰ میکرولیتر از نمونهٔ اسپرم را برداشته و روی لام قرار می‌دهیم سپس حدود ۲۰ میکرولیتر نیز از رنگ آماده‌شده ائوزین-نیگروزین روی نمونه ریخته و با سمپلر به‌آرامی نمونه را هم می‌زنیم تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از تهیهٔ گسترش و خشک شدن نمونه، لام را زیر میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ مشاهده و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های مرده (رنگ گرفته) و زنده (بی‌رنگ) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کم‌رنگ به خود گرفته بودند و یا تنها بخشی از آن‌ها رنگ گرفته بود به‌عنوان اسپرم زنده و اسپرم‌هایی که به‌کلی رنگ گرفته بودند به‌عنوان اسپرم مرده در نظر گرفته شدند (Evans *et al*., 1987).

یکپارچگی غشا با آزمون تورم هایپواسمتیک (HOS Test)[5] اندازه‌گیری شد. با توجه به اینکه اسمولاریتی محیطHOS حدود ۱۰۰ میلی‌اسمول و اسمولاریتهٔ موردنیاز برای اسپرم اسب حدود ۳۲۵ تا ۳۶۰ میلی‌اسمول است، بنابراین اسپرم‌های سالم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به‌سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. برای این کار۱۰ میکرولیتر از منی با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت سی دقیقه نگهداری (انکوبه) شدند. پس از گذشت این زمان نمونه‌های نگهداری‌شده با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰۰، ارزیابی و در هر گروه تیماری دست‌کم، دویست اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های سالم (دم گره‌خورده) نسبت به اسپرم‌های مرده محاسبه شد (Revell & Mrode, 1994).

ناهنجاری‌های کل اسپرم با استفاده از آزمون هانکوک ارزیابی شد (Copeland-Fitzpatrick & Tebay, 1998). در این روش برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی نیز، حدود ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محلول هانکوک افزوده شد. پس از تهیهٔ اسلاید، با شمارش دست‌کم دویست اسپرماتوزوئید زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی (اختلال‌های آکروزوم و سر، سر جداشده،

1. Aliquots
2. Poly Vinyl Alcohol
3. Styrofoam Box
4. Computer Assisted Sperm Analyzer
5. Hypo Osmotic Swilling Test

قطعهٔ میانی غیرطبیعی و ناهنجاری دم) محاسبه شد. میزان پراکسیداسیون لیپید با استفاده از اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدهید (MDA)[1] تولیدی ارزیابی شد (Salmani *et al*., 2013).

تجزیه‌وتحلیل آماری

در این طرح هر نمونه‌گیری به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شده است. با توجه به اینکه تنها عامل تصادفی در این طرح اثر تیمار بود بنابراین داده‌های به‌دست‌آمده در این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با شش تکرار توسط رویهٔ GLM نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه شد. مدل آماری استفاده شده به شکل زیر است:

$$Y_{ij}=\mu+A_i + e_{ij}$$

نتایج

نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که افزودن ۲۰۰ واحد بر میلی‌لیتر کاتالاز به رقیق‌کنندهٔ اسپرم اسب‌های ترکمن، سبب بهبود جنبایی کل و پیش‌رونده نسبت به گروه شاهد و دیگر گروه‌های تیماری شده است (P<۰/۰۵). همچنین افزودن ۱۵۰ واحد بر میلی‌لیتر کاتالاز سبب بهبود جنبایی کل و میانگین شتاب در مسیر مستقیم (VAP) نسبت به گروه شاهد شده (P<۰/۰۵)، اما بر دیگر فراسنجه‌های حرکتی اثر مثبتی نسبت به گروه شاهد نداشت (P>۰/۰۵). افزودن ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر کاتالاز نیز به‌جز فراسنجه حرکت در مسیر مستقیم (LIN) تأثیر مثبتی روی هیچ‌کدام از فراسنجه‌های حرکتی اسپرم نسبت به گروه شاهد نداشت (P>۰/۰۵). (جدول ۱).

یافته‌ها نشان می‌دهند که افزودن میزان ۲۰۰ واحد در میلی‌لیتر کاتالاز به رقیق‌کنندهٔ اسپرم اسب‌های ترکمن سبب بهبود در زنده‌مانی و یکپارچگی غشایی آن-ها پس از فرآیند یخ‌زدن-یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد شده است (P<۰/۰۵). همچنین سطح ۱۵۰ واحد بر میلی‌لیتر کاتالاز سبب بهبود زنده‌مانی و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). ازنظر ریخت‌شناسی و میزان اسپرم‌های نابهنجار سطوح مختلف کاتالاز تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نشان ندادند (P>۰/۰۵). نتایج نشان می‌دهد غلظت MDA که شاخصی از میزان پراکسیداسیون لیپیدهای دیوارهٔ اسپرم است در تیمار ۲۰۰ واحد بر میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد و دیگر گروه‌های تیماری کمتر بود (P<۰/۰۱، جدول ۲).

جدول ۱. تأثیر سطوح مختلف کاتالاز بر شاخص‌های حرکتی اسپرم (ارزیابی با نرم‌افزار CASA) اسب‌های ترکمن پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی (LSMeans±SEM)

Table 1. The effect of different levels of catalase on motion characteristics (CASA) of *Turkman* stallion's sperm after freeze-thawing process (Lsmeans ± SEM)

Treat/Parameter	CAT (100)	CAT (150)	CAT (200)	Control	SEM
TM (%)	42.83^{c}	48.50^{b}	57.83^{a}	41.83^{c}	1.22
PM (%)	28.50^{b}	30.34^{b}	37.67^{a}	28.00^{b}	1.42
VSL (µm/s)	60.24^{b}	59.60^{b}	71.69^{a}	58.79^{b}	3.14
VCL (µm/s)	92.88^{b}	112.02^{a}	112.92^{a}	113.33^{a}	6.16
VAP(µm/s)	77.32^{b}	81.55^{a}	84.77^{a}	77.90^{b}	5.13
LIN (%)	67.20^{a}	53.94^{bc}	64.30^{ab}	51.93^{c}	4.31
ALH(µm)	5.19^{b}	5.84^{b}	5.92^{a}	5.74^{b}	0.32
WOB (%)	0.47	0.47	0.48	0.49	0.01
STR (%)	64.58	72.06	71.99	72.82	3.51
BCF (Hz)	8.79^{b}	10.84^{a}	12.03^{a}	10.32^{a}	1.01
MAD (°)	52.87	55.15	54.66	54.82	2.17

a، b، c: میانگین‌های هر ردیف با حروف ناهمسان اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

VCL: سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی‌شده، VSL: سرعت اسپرم در خط مستقیم، VAP: میانگین سرعت در مسیر مستقیم، LIN: معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد است، STR: معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد، WOB: متوسط زاویهٔ چرخش بر حسب درجه، ALH: بیشترین دامنهٔ حرکت‌های جانبی بر حسب میکرومتر، MAD: متوسط زاویهٔ چرخش بر حسب درجه، BCF: فرکانس حرکت‌های جانبی بر حسب هرتز، CAT100: ۱۰۰ واحد بر میلی‌گرم کاتالاز، CAT150: ۱۵۰ واحد بر میلی‌گرم کاتالاز، CAT200: ۲۰۰ واحد بر میلی‌گرم کاتالاز، SEM: خطای استاندارد میانگین.

a, b, c: Means with different letters within a row are statistically significant (p<0.05).

Abbreviations: ALH, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; CASA, computer-assisted sperm analyzer; CAT (100), Catalase 100 IU/mL; CAT (150), Catalase 100 IU/mL; CAT (200), Catalase 200 IU/mL; LIN, linearity; MAD, mean angle degree; PM, progressive motility; SEM, standard error of Mean; STR, straightness; TM, total motility; VAP, average path velocity; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight line velocity. a,b,c Values with different superscripts within a row vary significantly (P < 0.05).

1. Malondialdehyde

جدول ۲. درصد زنده‌مانی، یکپارچگی غشای آکروزومی، ناهنجاری و میزان پراکسیداسیون لیپید اسپرم‌های تیمارشده با سطوح مختلف پاداکسندهٔ کاتالاز (LSMeans±SEM)

Table 2. Viability, membrane integrity, abnormality, and MDA concentration of post-thaw stallion's sperm (Lsmeans ± SEM)

Treat/Parameter	CAT (100)	CAT (150)	CAT (200)	Control	SEM
Viability (%)	48.43[c]	53.46[b]	62.08[a]	48.42[c]	1.22
Membrane Integrity (%)	39.59[c]	43.44[b]	51.46[a]	42.92[b]	1.14
Abnormal Morphology (%)	15.07	17.18	14.85	16.94	0.97
MDA (nM/mL)	2.07[c]	1.50[b]	1.05[a]	2.22[c]	0.10

a، b، c: میانگین‌های هر ردیف با حروف ناهمسان اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

MDA: مالون دی آلدهید، CAT100: ۱۰۰ واحد بر میلی‌گرم کاتالاز، CAT150: ۱۵۰ واحد بر میلی‌گرم کاتالاز، CAT200: ۲۰۰ واحد بر میلی‌گرم کاتالاز، SEM: خطای استاندارد میانگین.

a, b, c: Means with different letters within a row are statistically significant (p<0.05).
Abbreviations: CAT (100), Catalase 100 IU/mL; CAT (150), Catalase 100 IU/mL; CAT (200), Catalase 200 IU/mL; MDA, Malondialdehyde.

بحث

کاتالاز پاداکسندهٔ آنزیمی مؤثر در کاهش اثرگذاری‌های رادیکال‌های آزاد است که در بیشتر پژوهش‌های انجام‌شده اثر مثبتی در بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم از خود نشان داده است. رادیکال پراکسید هیدروژن سمی‌ترین رادیکال آزاد است، زیرا می‌تواند به‌آسانی از غشای یاخته عبور کرده و فعالیت پاداکسنده‌ها و کارکرد یاخته را مختل کند. کاتالاز می‌تواند رادیکال آزاد پراکسید هیدروژن را به اکسیژن و آب تبدیل کرده و زیان‌بخشی آن به یاخته را به‌طورکلی برطرف کند (Michael *et al*., 2007). از سوی دیگر مایع منی بسیاری از پستانداران (خرگوش، اسب سانان، گاو، گوسفند و بز) یا کاتالاز ندارند یا به میزان اندکی کاتالاز دارند (Holland *et al*., 1982). بنابراین به نظر می‌رسد افزودن کاتالاز به مایع منی این گونه‌ها سبب کاهش تأثیر تنش اکسایشی شده و در پایان منجر به بهبود باروری ناشی از استفاده از اسپرم‌های یخ‌زده در این گونه‌ها می‌شود. همچنین گزارش شده است که کاتالاز سبب کاهش اکسایش چربی‌ها در اسپرم گونه‌های مختلف شده است (Partyka *et al*., 2012).

در این پژوهش یافته‌ها نشان دادند که افزودن ۱۵۰ و ۲۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پاداکسندهٔ آنزیمی کاتالاز سبب بهبود در برخی فراسنجه‌های کیفی مانند جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده شد. همچنین تیمار ۲۰۰ واحد بر میلی‌لیتر کاتالاز سبب بهبود زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی شده و میزان پراکسیداسیون لیپیدهای دیوارهٔ یاخته‌ای اسپرم‌ها را نیز کاهش داد که این نتایج با نتایج بررسی پاتریکا و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی داشت. تنش اکسایشی باعث آغاز سلسله فرآیندهای آبشاری می‌شود که سبب مرگ یاخته می‌شود. دراین‌بین جنبایی و زنده‌مانی اسپرم مهم‌ترین فراسنجه‌هایی هستند که به‌آسانی تحت تأثیر قرار می‌گیرند و بنابراین اصلی‌ترین دلیل کاهش باروری پس از فرآیند یخ‌زدن و یخ‌گشایی کاهش زنده‌مانی و به دنبال آن کاهشی آشکار در جنبایی هستند (Li *et al*., 2010). همچنین در این پژوهش نشان داده شد که کاتالاز دیگر شاخص‌های حرکتی مانند میانگین شتاب در مسیر مستقیم (VAP)، شتاب اسپرم در خط مستقیم (VSL) و بیشینهٔ دامنهٔ حرکت‌های جانبی اسپرم (ALH) را نیز به‌طور مثبتی تحت تأثیر قرار داده است. اما در پژوهشی دیگر گزارش شد که فراسنجه‌های VSL، VAP و VCL با باروری اسپرم یخ‌گشایی‌شده همبستگی بالایی نداشته و فراسنجه‌هایی مانند ALH و VAP نیز اصلاً همبستگی ندارند اما یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم همبستگی بسیار بالایی (r=۰/۹۸) با جنبایی کل اسپرم دارد (Love *et al*., 2003). با توجه به اینکه تیمار ۲۰۰ واحد بر میلی‌لیتر کاتالاز توانسته است زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم را بهبود بخشد، بنابراین می‌توان گفت استفاده از این پاداکسنده در انجمادپذیری اسپرم، می‌تواند جنبایی و به دنبال آن باروری را به‌طور مثبتی تحت تأثیر قرار دهد. در گزارشی دیگر اشاره شده که افزودن کاتالاز به رقیق‌کنندهٔ اسپرم سگ‌سانان سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی آن پس از فرآیند یخ‌زدن و

یخ‌گشایی شده است (Michael *et al*., 2007). سازوکار اثر کاتالاز هنوز به‌خوبی شناخته نشده است. به نظر می‌رسد که غشای پلاسمایی و غشای میتوکندریایی حساسیت زیادی به عبور رادیکال‌های آزاد داشته و عمل انتقال آن‌ها به‌سرعت انجام می‌شود. رادیکال هیدروژن پراکسید پس از عبور از غشا و اتصال آن به DNA یاخته، سبب مرگ یاخته می‌شود. اما افزودن کاتالاز به محیط با تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن سبب کاهش این آسیب‌ها شده و اسپرم را از تأثیر نابهنجار رادیکال پراکسید هیدروژن در امان نگه می‌دارد (Li *et al*., 2010). بنابراین به نظر می‌رسد نتایج مثبتی که ما در این پژوهش به دست آوردیم نیز به دلیل همین سازوکار پیشنهادی باشد. بیشتر پژوهشگرانی که روی تأثیر کاتالاز در بهبود انجمادپذیری و فراسنجه‌های کیفی اسپرم بررسی‌هایی انجام داده‌اند، بر این باورند افزودن کاتالاز به‌تنهایی و یا به همراه دیگر پاداکسنده‌ها تولید پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها را کاهش می‌دهد (Asadpour *et al*., 2012; Partyka *et al*., 2012). بر پایهٔ همین یافته‌ها پیشنهاد می‌شود که این ترکیب به رقیق‌کننده‌های تجاری نیز افزوده شود.

گزارش‌های بسیار اندکی در مورد اثر منفی کاتالاز بر فراسنجه‌های اسپرم وجود دارد. در پژوهشی تأثیر پاداکسندهٔ کاتالاز روی فراسنجه‌های اسپرم انسان، پس از فرآیند یخ‌زدن-یخ‌گشایی بررسی شده و این نتیجه به دست آمد که کاتالاز تأثیر مثبتی روی جنبایی و دیگر فراسنجه‌های کیفی اسپرم انسان نداشت (Rossi *et al*., 2001). همچنین گزارش شده است که افزودن کاتالاز به اسپرم گاو اثری روی زنده‌مانی پس از یخ‌گشایی ندارد (Asadpour *et al*., 2012).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن ۲۰۰ واحد بر میلی‌لیتر کاتالاز به رقیق‌کننده سبب بهبود انجمادپذیری اسپرم اسب‌های ترکمن می‌شود.

سپاسگزاری

این پژوهش با همکاری مؤسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و گروه علوم دامی دانشگاه تهران انجام شد، بدین‌وسیله از مسئولان مربوط، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Agarwal, A. & Sekhon, L.H. (2010). The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human Fertility*, 13, 217-225.
2. Agarwal, A., Sharma, R.K., Sharma, R., Assidi, M., Abuzenadah, A.M., Alshahrani, S., Durairajanayagam, D. & Sabanegh, E. (2014). Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12, 33.
3. Aitken, R.J., Jones, K.T. & Robertson, S.A. (2012). Reactive oxygen species and sperm function In sickness and in health. *Journal of Andrology* 33, 1096-1106.
4. Alvarenga, M.A., Papa, F.O., Carmo, M.T., Kievitsbosch, T., Castro Chaves, M.M.B. & Ramires Neto, C. (2012). Methods of Concentrating Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32, 424-429.
5. Asadpour, R., Jafari, R. & Tayefi-Nasrabadi, H. (2012). Effect of various levels of catalase antioxidant in semen extenders on lipid peroxidation and semen quality after the freeze-thawing bull semen. *Veterinary Research Forum*, pp. 218-221.
6. Ball, B.A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107, 257-267.
7. Baumber, J., Ball, B.A. & Linfor, J.J. (2005). Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research*, 66, 772-779.
8. Bouayed, J. & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3, 228-237.
9. Copeland-Fitzpatrick, J. & Tebay, J. (1998). Hippotherapy and therapeutic riding: An international review. *Companion Animals in Human Health*, 41-58.
10. Cristanelli, M., Amann, R., Squires, E. & Pickett, B. (1985). Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 24, 681-686.

11. Da Silva, F., Marques, A. & Chaveiro, A. (2010). Reactive oxygen species: a double-edged sword in reproduction. *Open Veterinary Science Journal*, 4, 127-133.
12. Evans, G. & Maxwell, W.C. (1987). Salamons' artificial insemination of sheep and goats. (No. Ed. 2). Butterworths.
13. Fayrer-Hosken, R., Abreu-Barbosa, C., Heusner, G. & Jones, L. (2008). Cryopreservation of stallion spermatozoa with INRA96 and glycerol. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28, 672-676.
14. Fernández-Santos, M.R., Martínez-Pastor, F., García-Macías, V., Esteso, M.C., Soler, A.J., Paz, P., Anel, L. & Garde, J.J. (2007). Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (Cervus elaphus hispanicus) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants. *Journal of Andrology*, 28, 294-305.
15. Gibb, Z., Butler, T., Morris, L., Maxwell, W. & Grupen, C. (2013). Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. *Theriogenology*, 79(6), 1001-1009.
16. Holland, M.K., Alvarez, J.G. & Storey, B.T. (1982). Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 27, 1109-1118.
17. Holt, W. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 3-22.
18. Kefer, J.C., Agarwal, A. & Sabanegh, E. (2009). Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology*, 16, 449-457.
19. Kirk, E., Squires, E. & Graham, J. (2005). Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 64, 1422-1439.
20. Kmenta, I., Strohmayer, C., Müller-Schlösser, F. & Schäfer-Somi, S. (2011). Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. *Theriogenology*, 75, 1095-1103.
21. Li, Z., Lin, Q., Liu, R., Xiao, W. & Liu, W. (2010). Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. *Journal of Andrology*, 31, 437-444.
22. Loomis, P.R. & Squires, E.L. (2005). Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*, 64, 480-491.
23. Love, C., Thompson, J., Brinsko, S., Rigby, S., Blanchard, T., Lowry, V. & Varner, D. (2003). Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology*, 60, 1127-1138.
24. Luo, S.-M., Schatten, H. & Sun, Q. Y. (2013). Sperm mitochondria in reproduction: good or bad and where do they go? *Journal of Genetics and Genomics*, 40, 549-556.
25. Michael, A., Alexopoulos, C., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Saratsis, P. & Boscos, C. (2007). Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 68, 204-212.
26. Partyka, A., Łukaszewicz, E. & Niżański, W. (2012). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in avian semen. *Animal Reproduction Science*, 134, 184-190.
27. Revell, S.G. & Mrode, R.A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science, 36(1), 77-86.
28. Rossi, T., Mazzilli, F., Delfino, M. & Dondero, F. (2001). Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. *Cell and Tissue Banking*, 2, 9-13.
29. Salazar Jr, J., Teague, S., Love, C., Brinsko, S., Blanchard, T. & Varner, D. (2011). Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology*, 76, 409-418.
30. Sanocka, D. & Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2, 1-7.
31. Seifi-Jamadi, A., Kohram, H., Zareh-Shahne, A., Dehghanizadeh, P. & Ahmad, E. (2016). Effect of various concentrations of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on freezing capacity of Turkman stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, 170, 108-13.
32. Seifried, H. E., Anderson, D. E., Milner, J. A. & Greenwald, P. (2006). Reactive oxygen species and dietary antioxidants: double-edged swords. New developments in antioxidant research. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers Inc, 1-25.
33. Sikka, S.C., Rajasekaran, M. & Hellstrom, W.J. (1995). Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology*, 16, 464-468.
34. Squires, E. (2005). Integration of future biotechnologies into the equine industry. *Animal Reproduction Science*, 89, 187-198.

Iranian Journal of Animal Science, Vol. 47, No. 2, Summer 2016

The potential of catalase as an enzymatic antioxidant to improve freezability of Turkmen stallions sperm

Afshin Seifi-Jamadi[1], Ahmad Zare Shahneh[2*], Hamid Kohram[3], Abolfazl Akbari[4], Mohsen Zamen[5] and Abolfazl Vakhideh[6]

1, 2. Ph.D. Student and Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Assistant Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran and Assistant Professor of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

4, 5, 6. Assistant Professor, Medical Laboratory Expert and Veterinary Expert, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

(Received: Jan. 28, 2015 - Accepted: Feb. 22, 2016)

ABSTRACT

Four mature stallions were used to study the effect of enzymatic antioxidant catalase on freezability of Turkmen stallion's sperm. Collected semen from stallions were processed and pooled before being divided treatments (200×10^6 sperm/ml) and diluted with extenders supplemented with different levels of catalase [0 (control), 100 U/ml (CAT100), 150U/ml (CAT150) and 200U/ml (CAT200)]. Extended and supplemented semen's were frozen according to a standard protocol. After thawing, motility, viability, membrane integrity, total abnormality and lipid peroxidation were assessed. Results showed that addition of 200U/ml catalase could improve progressive and total motility, viability, membrane integrity and decreased lipid peroxidation compared to control and other levels of catalase ($p<0.05$). In addition, 150 U/ml catalase improved total motility, viability and decreased MDA concentration ($p<0.05$). However, the addition of 100 U/ml catalase had no significant effect on sperm quality ($p>0.05$). The results showed that different levels of catalase could not decreased total abnormality ($p>0.05$). We concluded that addition of 200U/ml catalase could improve freezability of Turkmen stallion’s sperm.

Keywords: Catalase, free radicals, horse semen freezing, lipid peroxidation, Turkmen horse.

* Corresponding author E-mail: azareh@ut.ac.ir Tel: +98 26 32248082