مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۶۲، شماره ۳، ۸۴-۳۷۷
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2017.15946.1704

تأثیر سطوح مختلف آنتی اکسیدان‌های گلوتاتیون احیا شده و سوپراکسید دیسموتاز بر روی برخی از ویژگی‌های اسپرم پس از انجماد منی گاو

حسین دقیق‌کیا* رستگار الفتی‌کرجی
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

(دریافت مقاله: ۳۰ دی ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۲۷ اسفند ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: فرآیند انجماد منی با افزایش سطح انواع اکسیژن فعال نقش تعیین کننده‌ای بر روی اندامک‌های (غشاء سلولی، میتوکندری‌ها و DNA) سلولی اسپرم دارد. **هدف:** هدف از این مطالعه تعیین تأثیر افزودن سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون احیا شده (GSH) پیش از انجماد بر روی پارامترهای تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و پاسخ مثبت به محلول هیپواسموتیک (HOST) پس از انجماد اسپرم گاو بود. **روش کار:** در این مطالعه ۴ راس گاو نر با سن ۵-۴ سال استفاده شده و ۲۰ مرتبه اسپرم گیری (۵ مرتبه برای هر راس گاو نر) انجام گرفت. آنتی اکسیدان‌های SOD بمیزان (IU/ml ۱۰۰ و ۱۵۰) و GSH بمیزان (mM ۷/۵ و ۵) به رقیق کننده تریس-زرده تخم مرغ افزوده شدند. نمونه‌های منی رقیق شده همراه با آنتی اکسیدان‌های اضافه شده و یا بدون آن، بصورت دستی در پایوت‌ها پر شده و انتهای آزاد آن‌ها توسط دستگاه بسته شدند. سپس با استفاده از ازت مایع و توسط دستگاه نیمه اتوماتیک انجماد منی، نمونه‌های منی منجمد شدند. پس از یخ‌گشائی نمونه‌ها، پارامترهای تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زندمانی و پاسخ مثبت به تست HOST در ساعات صفر و ۲ انکوباسیون تعیین شدند. **نتایج:** افزودن سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان‌های SOD و GSH تفاوت معنی‌داری در هیچکدام از پارامترهای اسپرم بین تیمارها در ساعت اولیه انکوباسیون پس از یخ‌گشائی نشان نداد. در ساعت ۲ انکوباسیون پس از یخ‌گشائی، نمونه‌های منی حاوی IU/ml ۱۰۰، SOD، تحرک کل، زنده‌مانی و صلابت غشاء اسپرم بطور معنی‌داری بهبود یافت ($p<0/05$). همچنین در نمونه حاوی SOD (IU/ml ۱۵۰) صلابت غشاء اسپرم حفظ گردید ($p<0/05$). در نمونه‌های منی حاوی mM ۵ آنتی‌اکسیدان GSH، تحرک کل و صلابت غشاء اسپرم پس از یخ‌گشائی بطور قابل ملاحظه‌ای بهبود یافت ($p<0/05$). **نتیجه گیری نهایی:** این مطالعه نشان داد که با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های SOD و GSH در رقیق‌کننده منی می‌توان کیفیت منی گاو را پس از یخ‌گشائی آن حفظ نمود.

واژه‌های کلیدی: انجماد منی، گلوتاتیون احیا شده، سوپر اکسید دیسموتاز، پارامترهای اسپرم

مقدمه

با وجود بهبود تکنیک‌های فرآوری و انجماد منی، فرآیند انجماد آسیب‌های جدی در اسپرم ایجاد می‌کند. فرآیند انجماد با تأثیر بر غشاء پلاسمایی، اسکلت سلولی، خصوصیات دینامیکی، هسته و متابولیسم سلول اسپرم، باروری آن را متأثر می‌سازد. در جریان انجماد منی دو اتفاق مهم بوقوع می‌پیوندد: ۱) تولید انواع اکسیژن واکنش‌زا (ROS) (۵،۹) که می‌تواند باعث تغییراتی در بخش‌های عملکردی و ساختاری اسپرم شود؛ ۲) تغییر در سیستم آنتی‌اکسیدانی از جمله کاهش ۷۵٪ سطح GSH و ۵۰٪ فعالیت SOD (۵،۱۴).

مطالعات نشان می‌دهند در طول فرآیند انجماد-یخ‌گشائی، با افزایش سطح ROS یا بعبارت دیگر استرس اکسیداتیوی، اسیدهای چرب غیراشباع غشاء پلاسمایی اسپرم گاو مستعد پراکسیدسیون شده و ترکیبات سمی حاصل از این فرآیند (مالونیل دآلدئید) می‌تواند در ساختمان و عملکرد اندامک‌های مهمی همچون غشاء، میتوکندری و DNA اختلال ایجاد کرده و در نتیجه تحرک، زنده‌مانی و نهایتا باروری اسپرم‌ها را کاهش دهد (۳). افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط انجماد، باعث بهبود صفات تحرک، زنده‌مانی و باروری اسپرم‌های منجمد-یخ گشائی شده می‌گردد (۴،۱۰،۱۱،۱۳،۲۱،۲۲،۲۵).

نتایج تحقیقات اخیر نشان داده اند که افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط انجماد گونه‌های مختلف، باعث بهبود صفات تحرک، زنده‌مانی و باروری اسپرم‌های منجمد-یخ گشائی شده می‌گردد (۴،۱۳،۲۱،۲۲،۲۵).

گلوتاتیون احیا شده (GSH) تری پپتیدی متشکل از اسیدهای آمینه L-سیستئین، L-γ-گلوتامین و L-گلایسین بوده و یکی از فراوانترین آنتی‌اکسیدان‌های موجود در بدن پستانداران بشمار می‌رود. این ترکیب نقش مهمی در حفاظت از چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک سلول، بازی می‌کند. گلوتاتیون همراه با سلنیوم و ویتامین E در ترکیب آنزیم GPX وجود داشته و بدین ترتیب نقش آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کند (۱). Bilodeau و همکاران در سال ۲۰۰۱ اشاره کردند که افزودن ترکیبات تیول‌دار به رقیق کننده انجماد می‌تواند باعث بهبود ویژگی‌های حرکتی اسپرم‌ها شود (۴). در این راستا، Bucak و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که غنی نمودن رقیق کننده انجماد با ترکیبات تیول‌دار مانند GSH و سیستئین بترتیب سبب بهبود سیستم آنزیمی و حرکتی اسپرم پس از یخ‌گشائی نمونه‌های منی قوچ در رقیق کننده انجماد می‌گردد (۶).

سوپراکسید دیسموتاز (SOD) متالوپروتئینی (عمدتاً حاوی عناصر مس

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۳۳۹۲۰۶۲-۰۴۱۱ نمابر: ۳۳۵۶۰۰۴-۰۴۱۱ Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

و روی)، یون سوپراکسید را به اکسیژن و پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند. بنابر این نقش آنتی‌اکسیدانی بارزی در سیستم دفاعی داخل سلولی بازی می‌کند (۲۷). تحقیقات پیشین نشان داده اند که استفاده از SOD در رقیق کننده، منی اسب و خوک سبب حفظ ویژگی‌های حرکتی و عملکردی سلول‌های اسپرم و نهایتاً بهبود باروری می‌گردد (۱۰،۲۵).

هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر افزودن سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان‌های SOD و GSH پیش از انجماد بر روی پارامترهای تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و پاسخ مثبت به تست HOST پس از یخ گشایی اسپرم گاو منجمد شده بود.

مواد و روش‌کار

این تحقیق در مرکز اصلاح نژاد شمالغرب و غرب کشور در استان آذربایجان شرقی و با استفاده از منی چهار گاو هلشتاین سالم و بارور ۵- ۴ ساله، با شرایط پرورش یکسان انجام شد. نمونه‌های منی دو بار در هفته و با کمک مهبل مصنوعی جمع آوری شدند. در هر انزال، نمونه‌های منی با غلظت بیش از 5×10^8 اسپرم در میلی لیتر، تحرک بیش از ۷۰٪ و ناهنجاری کل کمتر از ۱۲٪ اسپرم غیرطبیعی بعنوان منی نرمال در نظر گرفته شدند؛ در غیر اینصورت منی جمع‌آوری شده از دام مورد نظر حذف گردید. در هر تکرار آزمایش بمنظور حذف اثرات فردی نمونه‌های منی دام‌ها در مقادیر مساوی با هم مخلوط شدند.

رقیق‌سازی منی با استفاده از رقیق‌کننده تریس-زرده تخم مرغ (۶۰ mM اسید سیتریک، ۶۹ mM فروکتوز، ۰/۲۵ M تریس، ۲۰٪ زرده تخم مرغ، ۷٪ گلیسرول، ۲۵۰ mg/l جنتامایسین، ۱۵۰ mg/l لینکومایسین، ۳۰۰ mg/l اسپکتینومایسین و ۵۰ mg/l تایلوزین با pH=۶/۸) به روش دو مرحله‌ای انجام شد. به نحوی که در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم مرغ ۳٪ گلیسرول در مرحله اول و در دمای ۳۷°C (رقیق کننده A) و باقیمانده گلیسرول (۱۱٪) در دمای ۵°C (رقیق کننده B) به مایع منی افزوده شد (نوع A و B هردو به مقدار یکسان مورد استفاده قرار گرفتند). پس از افزودن رقیق کننده B، آنتی اکسیدان‌های GSH در دو سطح (۷/۵ mM و ۵) و SOD در دو سطح (۱۵۰ IU/ml و ۱۰۰) به فالکون‌های مخصوص هر تیمار افزوده گردید و بعد از سپری شدن دو ساعت، نمونه‌ها (بعلت حجم کم) با سرنگ بصورت دستی پر و توسط دستگاه فیلینگ-سیلینگ (IMV, Franc) در پایوت‌های ۰/۵ ml با تعداد 30×10^6 اسپرم بسته‌بندی شدند. در این مطالعه GSH با سطوح ۷/۵ mM و ۵ و SOD با سطوح ۱۵۰ IU/ml و ۱۰۰ (سیگما-آلدریچ، آمریکا)، تریس، فروکتوز، اسید سیتریک و سیترات (مرک، آلمان)، جنتامایسین، لینکوپکت (لینکومایسین+اسپکتوکایسین) و تایلوزین (داروسازی دکتر عبیدی) مورد استفاده قرار گرفتند.

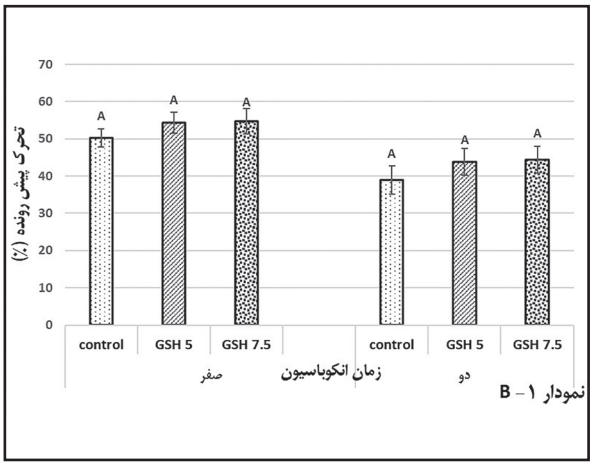
ارزیابی‌های پس از انجماد: نمونه‌ها در داخل حمام آب گرم ۳۷°C بمدت ۴۵ ثانیه یخ‌گشائی شده و سپس در ساعات صفر و ۲ بعد از یخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. قبل از ارزیابی در ساعت صفر، جهت تطابق‌پذیری و بازگشت آب درون سلولی، نمونه‌ها بمدت ۱۰-۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفتند.

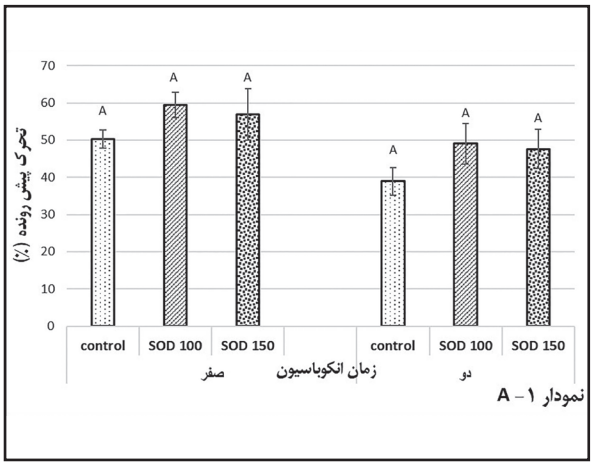
ویژگی‌های تحرک کل و پیش‌رونده تمام تیمارهای آزمایشی با کمک آنالیزگر کامپیوتری تشخیص اسپرم (CASA) مجهز به میکروسکوپ فازکنتراست (Nikon,Japan) با بزرگنمایی × ۱۰۰، دوربین (SAMSONG, Korea) و صفحه گرم (هات استیج) در ساعات صفر و ۲ انکوباسیون پس از یخ‌گشائی ارزیابی شدند. روش کار بدین صورت بود که ۵ µl از نمونه را روی لام از پیش گرم شده چکانده و بر روی صفحه گرم میکروسکوپ قرار داده شد. از هر نمونه عکسبرداری شده و توسط نرم افزار سیستم CASA مورد آنالیز قرار گرفت. برای هر نمونه، این روش بر روی سه لام (حداقل ۱۰ فیلد به تعداد ۲۰۰ اسپرم) تکرار شد و میانگین سه تکرار بعنوان داده واحد محاسبه شد.

درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها به کمک روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین ارزیابی شد؛ بدین ترتیب که گسترشی از یک قطره نمونه اسپرم و دو قطره رنگ روی یک لام گرم تهیه کرده و زنده‌مانی تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر لام (میانگین سه مشاهده یا لام بعنوان یک داده واحد در نظر گرفته شد)، توسط میکروسکوپ فاز کنتراست (OLYMPUS,Japan) با روغن امرسیون با بزرگنمایی × ۱۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌هایی که بطور جزئی یا کامل رنگ بنفش را نشان دادند مرده و اسپرم‌هایی که از ورود رنگ بداخل خود ممانعت کرده بودند بعنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شدند.

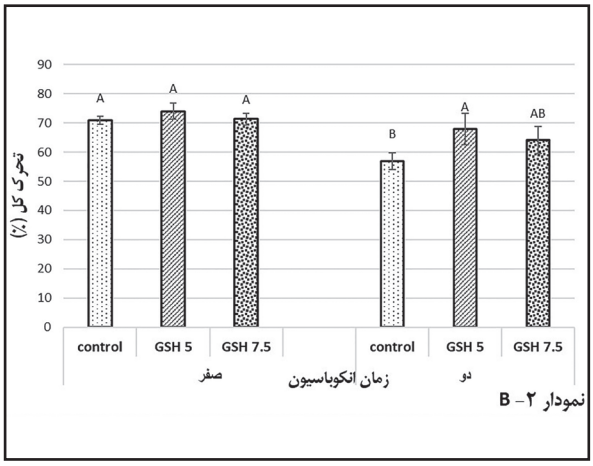
یکپارچگی غشای پلاسمایی به کمک میزان پاسخ مثبت به محلول HOST (۹ g فروکتوز، ۴/۹ g سیترات سدیم در یک لیتر آب مقطر دوبل تقطیر با اسموزیته ۱۰۰ mOm/kg) تعیین شد. برای انجام این تست ۵۰ µl از هر نمونه اسپرم یخ‌گشائی شده به ۵۰۰ µl محلول هیپواسموتیک اضافه شده و بمدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شد. سپس نمونه با ملایمت مخلوط شده و یک قطره (۵ µl) از سوسپانسیون عملآوری شده را روی اسلاید گرم قرار داده و با لام پوشانده و زیر میکروسکوپ (×۴۰۰) بررسی شد. ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید شمارش شده (میانگین سه مشاهده (لام) بعنوان یک داده واحد در نظر گرفته شد) و درصد اسپرم‌های با دم تابخورده و متورم تعیین گردیدند.

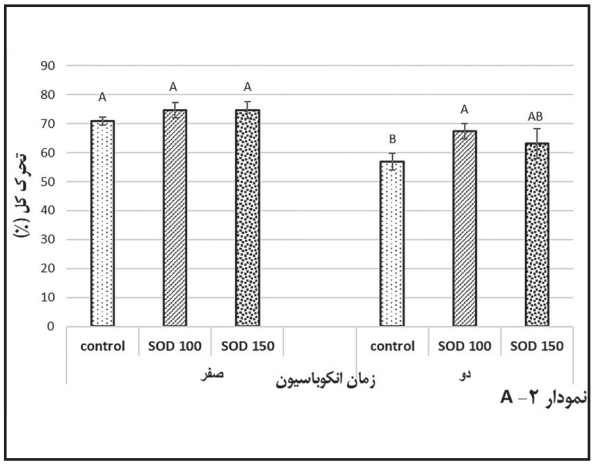
آنالیز آماری: داده‌های بدست آمده برای صفات درصد تحرک پیش‌رونده، درصد تحرک کل، درصد اسپرم‌های زنده و نرخ پاسخ به محلول HOST ابتدا بصورت Arcsin تبدیل شده سپس تجزیه واریانس (ANOVA) آن‌ها توسط رویه mixed نرم افزار SAS (۹/۱/۳) انجام گرفت، بطوریکه در مدل، اثرات تیمار و زمان ارزیابی برای تمام صفات بعنوان اثر ثابت در نظر گرفته شدند. برای مقایسه میانگین این صفات از آزمون مقایسه Tukey-Kramer استفاده شد. حداقل سطح معنی‌داری کمتر از ۵ ٪ نظر گرفته شد.





نمودار ۱. مقایسه میانگین‌های صفت تحرک پیش رونده اسپرم ساعات صفر و ۲ انکوباسیون پس از یخ گشائی نمونه‌های منی حاوی سطوح مختلف آنتی اکسیدان GSH و SOD ($p<۰/۰۵$).





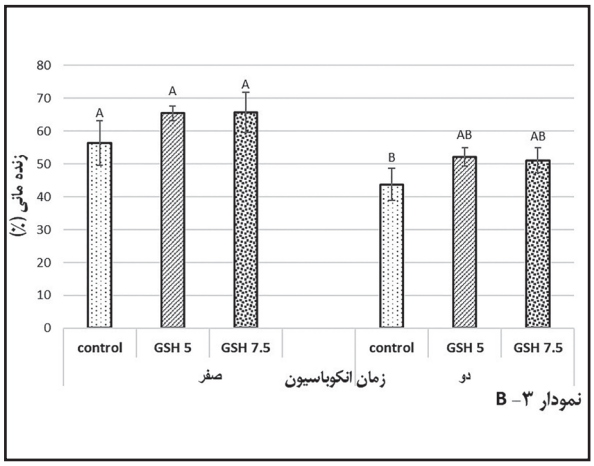
نمودار ۲. مقایسه میانگین‌های صفت تحرک کل اسپرم ساعات صفر و ۲ انکوباسیون پس از یخ‌گشائی نمونه‌های منی حاوی سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان GSH و SOD. ستون‌های با حروف متفاوت در هر یک از زمان‌های ارزیابی، اختلاف معنی‌داری با هم دارند ($p<۰/۰۵$).

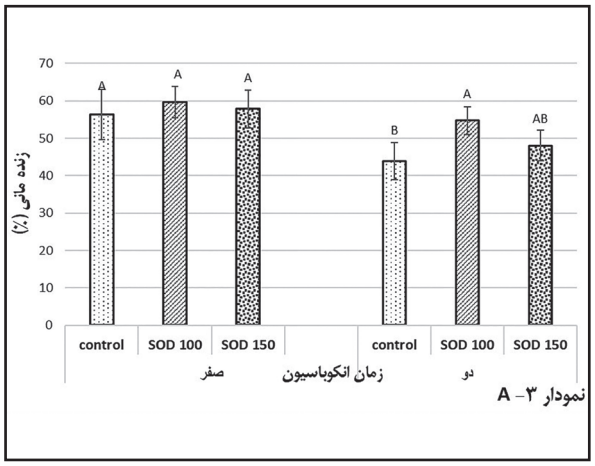
نتایج

تحـرک پیش‌رونده: نتایج حاصل از تأثیر افزودن غلظت‌های مختلف SOD در رقیق‌کننده منی گاو هلشتاین برای صفت تحرک‌پیش‌رونده در دو زمان صفر و ۲ ساعت پس از یخ‌گشائی در نمودار ۱ آمده است. نتایج حاصل حاکـی از بهبود این صفت در هر دو زمان برای تیمار SOD با غلظت IU/ ۱۰۰ ml نسبت به تیمار شاهد بود، اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p=۰/۰۸۳$؛ $p=۰/۰۹۳$)؛ بعلاوه نمونه‌های رقیق‌شده دریافت کننده هر دو سطح GSH (۷/۵ mM و ۵) در زمان اولیه و ۲ ساعت پس از یخ‌گشائی، تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد نداشتند (نمودار ۱).

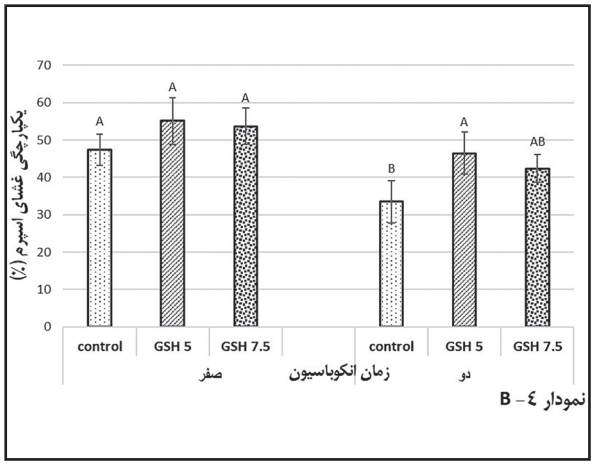
تحرک کل: نتایج بدسـت آمده برای صفت تحرک کل نشـان داد که هر دو غلظت SOD بکار برده شـده در این آزمایش در سـاعت اولیه پس از یخ‌گشـائی باعث بهبود معنی‌دار صفت تحرک‌کل اسپرم‌ها در مقایسه با گروه کنترل نشدند، درحالیکه با گذشت ۲ ساعت از انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۳۷°C، تیمـار SOD با غلظت نهایی ۱۰۰ IU/ml در رقیق کننده، توانست کیفیت این صفت را نسبت به گروه شاهد ارتقاء بخشد ($p<۰/۰۱$) (نمودار ۲). همچنین در رقیق‌کننده با دو سطح GSH، در اوایل انکوباسیون (ساعت صفر) تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد، اما در ساعت دوم نمونه‌های حاوی GSH با غلظت نهایی ۵ mM نسـبت به تیمار شاهد به مراتب عملکرد بهتری داشتند ($p<۰/۰۵$)، در صورتیکه برای ۷/۵ mM با وجود بالا بودن درصد تحرک‌کل در مقایسه با تیمار شاهد، تغییر معنی‌داری مشاهده نشد.

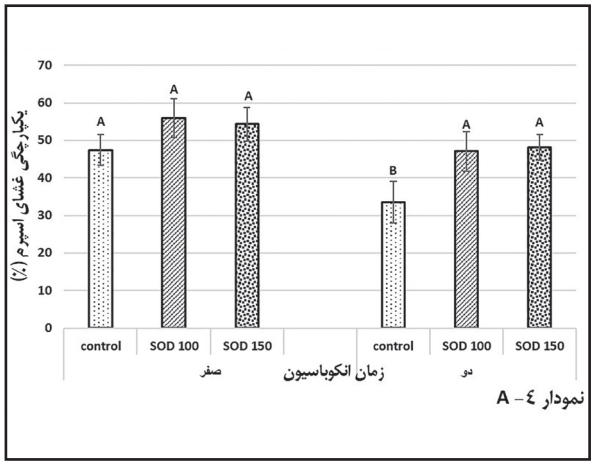
زنـده مانی: نتایج رنگ‌آمیـزی ائوزین-نیگروزیـن نمونه‌های هر دو سـطح آنزیم SOD بیانگر عدم تأثیر معنی‌دار در سـاعت اولیه پس از یخ گشـائی اسـت (نمودار ۳)؛ اما رنگ‌آمیزی نمونه‌ها در سـاعت دوم ارزیابی بیانگر افزایش معنی‌داری درصد اسـپرم‌های زنده در نمونه‌های دارای این آنزیم با غلظت ۱۰۰ IU/ml در مقایسـه با گروه شـاهد اسـت. بین تیمار ۱۵۰ SOD IU/ml با تیمار شاهد و سطح دیگر این آنزیم برای ساعت دوم انکوباسیون تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. مقایسه میانگین تیمارها برای صفت درصد اسپرم‌های زنده تحت تأثیر هر دو سطح GSH در ساعات صفر و ۲ انکوباسیون بیانگر عدم تأثیر معنی‌دار تیمارهای اعمال شده می‌باشد، با اینحال هر دو مقدار آنتی‌اکسیدان GSH مورد استفاده بویژه سطح ۵ mM





نمودار ۳. مقایسه میانگین‌های صفت زنده‌مانی اسپرم ساعات صفر و ۲ انکوباسیون پس از یخ‌گشائی نمونه‌های منی حاوی سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان GSH و SOD. ستون‌های با حروف متفاوت در هر یک از زمان‌های ارزیابی ، اختلاف معنی‌داری با هم دارند (p<۰/۰۵).





نمودار ۴. مقایسه میانگین‌های میزان صلابت غشاء اسپرم (آزمون Host) نمونه‌های منی حاوی سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان GSH و SOD در ساعات صفر و ۲ انکوباسیون پس از یخ‌گشائی. ستون‌های با حروف متفاوت در هر یک از زمان‌های ارزیابی، اختلاف معنی‌داری با هم دارند (p<۰/۰۵).

(p=۰/۰۵۵) در ساعت ۲ انکوباسیون، نسبت به گروه شاهد درصد بالاتری از اسپرم‌های زنده را نشان دادند.

صلابت غشاء اسپرم‌ها (آزمون HOST): نتایج حاکی از پاسخ مثبت نمونه‌های تیماری به تست HOST در ۲ انکوباسیون است، بطوریکه هر دو سطح اعمال شده، غشاء اسپرم‌ها را در برابر صدمات ناشی از انجماد منی بخوبی محافظت کردند، بطوریکه تیمار SOD با غلظت ۱۰۰ IU/ml در ساعت دوم (p<۰/۰۵) و تیمار SOD با غلظت ۱۵۰ IU/ml درساعت ۲ انکوباسیون (p<۰/۰۵) بخوبی توانایی خود را در حفظ صلابت غشا اسپرم‌ها در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند (نمودار ۴). درصد یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم نمونه‌های حاوی هر دو سطح GSH با وجود بالابودن توانایی هر دو سطح آنتی اکسیدان، در زمان اولیه پس از یخ گشائی، تفاوت معنی‌داری بین هیچ یک از تیمارها نشان نداد. در ساعت ۲ انکوباسیون، شمارش اسپرم‌های با دم پیچ خورده و متورم در نمونه رقیق‌کننده غنی شده با ۵ mM از GSH توانایی خود را در حفظ صلابت غشاء پلاسمایی نسبت به تیمار شاهد بخوبی نشان دادند (p<۰/۰۵)؛ این درحالیست که با وجود افزایش درصد یکپارچگی در غشاء پلاسمایی سلول‌های اسپرم تیمار رقیق‌کننده غنی شده با ۷/۵ mM از GSH تغییر محسوسی مشاهده نشد (نمودار ۴).

بحث

در این مطالعه اثر متقابل تیمار×زمان انکوباسیون معنی‌دار نبود در حالیکه هریک از اثرات تیمار و زمان به استثنای صفت زنده‌مانی برای آنتی‌اکسیدان SOD معنی‌دار بود؛ این نتایج با نتایج Shoae و Zamiri در سال ۲۰۰۸ و نیز Roca و همکاران در سال ۲۰۰۵ همخوانی داشت (۲۲،۲۶).

در مورد عدم تأثیر معنی‌دار هر دو سطح SOD و GSH بر روی صفت تحرک‌پیش‌رونده این مطالعه، می‌توان اشاره کرد که دوزهای بکار رفته SOD هماهنگی مطلوبی در مکانیسم‌های خنثی‌سازی عوامل اکسیدانی سلول اسپرم جهت بهبود این صفت را بوجود نیاورد. این نتایج بدست آمده از تأثیر هر دو سطح SOD با مطالعات Gadea و همکاران در سال ۲۰۱۱ و Roca و همکاران در سال ۲۰۰۵ مطابقت داشته، اما با نتایج Cocchia و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطابقت نداشت، علت آن

احتمالاً به گونه حیوان، نوع رقیق کننده، تفاوت در دمای نگهداری (۵°C) و دوز مصرفی باشد (۱۰،۱۳،۲۲). همچنین نتایج بدست آمده این مطالعه درخصوص تأثیر افزودن هر دو سطح GSH در رقیق‌کننده انجماد بر روی صفت تحرک‌پیش‌رونده، با نتایج مطالعات Gadea و همکاران در سال ۲۰۰۷، Perumal و همکاران در سال ۲۰۱۱ و Bucak و همکاران در سال ۲۰۰۸ موافق بوده ولی با نتایج Gadea و همکاران در سال ۲۰۱۱ مغایرت دارد (۶،۱۲،۱۳،۲۱). احتمالاً دلیل این عدم همخوانی با نتایج Gadea و همکاران در سال ۲۰۱۱ ویژگی‌های محیط نگهداری، گونه، پروسه انجماد و دوز مورد استفاده در آن تحقیق با پژوهش ما باشد (۱۳). در خصوص همبستگی این صفت با باروری اسپرم، تناقضات زیادی وجود دارد. Jeyendran و همکاران در سال ۱۹۸۴؛ Bailey و همکاران در سال ۱۹۹۴ و Giritharan و همکاران در سال ۲۰۰۵ در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که تحرک پیش‌رونده شاخص مناسبی برای ارزیابی منی نمی‌باشد؛ در حالیکه Rodriguez-Martinez و همکاران در سال ۲۰۱۱؛ Muller در سال ۲۰۰۰ و Saacke و همکاران در سال ۲۰۰۰ نظر مخالفی در این مورد دارند (۲،۱۵،۱۶،۲۰،۲۳،۲۴).

با توجه به اینکه در این پژوهش فرضیه ما برای افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق کننده نمونه‌های منی، در دمای ۵°C قبل از انجماد استوار بود (مدت زمان تماس آنتی اکسیدان با اسپرم‌ها برای ارزیابی در ساعت صفر انکوباسیون نسبت به ساعت بعدی ارزیابی کمتر بود) بنابر این واضح است که در ساعت اولیه ارزیابی تغییر معنی‌داری برخی از صفات ازجمله تحرک کل اتفاق نمی‌افتد. همچنین نتایج ما تائید کننده این تفسیر می‌باشد که با گذشت زمان تماس آنتی‌اکسیدان در ساعت دوم، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای GSH وSOD بترتیب با غلظت نهایی ۵ mM و IU/ml ۱۰۰ با تیمار شاهد بوجود آمده است. بعلاوه پارامترهای دینامیکی اسپرم با فعالیت مناسب میتوکندری اسپرم ارتباط دارد چراکه میتوکندری بعنوان موتور سلول نقش نیرو محرکه اسپرم را از طریق تولید ATP ایفا می‌کند. از طرفی سیستم رودکس در غشاء این اندامک سلولی به شدت تحت تأثیر فرایند انجماد و سطح آنتی اکسیدان‌های داخل سلولی قرار دارد، بنابر این هر عاملی که به فعالیت سیستم ردوکس میتوکندریایی آسیب برساند به همان شدت در پارامترهای حرکتی اسپرم اختلال ایجاد می‌کند. بنظر می‌رسد که تامین محیط نگهداری اسپرم در فرایند انجماد با سطوح ۵ mM و IU/ml ۱۰۰ بترتیب GSH و SOD با حذف یا ممانعت از تولید عوامل اکسیدکننده مانند H_2O_2 و O_2^- سبب تسهیل فعالیت میتوکندریایی شده که در نتیجه آن تغییرات قابل ملاحظه‌ای در پارامترهای صفات دینامیکی اسپرم نسبت به تیمار فاقد افزودنی مشاهده شد. نتایج ما با یافته‌های Maxwell و Stojanov در سال ۱۹۹۶ درمورد بهبود تحرک اسپرم با افزودن SOD به رقیق کننده منی قوچ و Cocchia و همکاران در سال۲۰۱۱ همخوانی داشت (۱۰،۱۷). مطالعه Gadea و همکاران در سال ۲۰۱۱، Perumal و همکاران در سال۲۰۱۱ و Bucak و همکاران در سال ۲۰۰۸ با نتایج ما در مورد تأثیر افزودن GSH به رقیق‌کننده انجماد بر تحرک کل مغایر بوده ولی با گزارشات Uysal و همکاران در سال ۲۰۰۷، Foot و همکاران در سال ۲۰۰۲ و Bucak و Tekin در سال ۲۰۰۷ همخوانی دارد (۶،۷،۱۱،۱۳،۲۱،۲۸). علت متفاوت بودن نتایج ما با برخی مطالعات احتمالاً به گونه، نوع رقیق کننده، دوز مصرفی و پروتوکل نگهداری منی بصورت سرد (۵°C) یا منجمد می‌باشد. باتوجه به اینکه افزایش سطح رادیکال‌های آزاد در سلول اسپرم که توانایی محدودی در حذف آن‌ها دارد و علاوه بر آن در طول فرایند انجماد-یخ گشایی در اثر شوک دمایی سطح عوامل اکسیداتیوی افزایش می‌یابد و از آنجائیکه این عوامل اکسیداتیوی به ارگان‌های حیاتی از جمله غشاءهای داخل سلولی و پلاسمایی، میتوکندری، DNA و غیره بشدت آسیب وارد می‌نماید؛ بنابر این بالا رفتن سطح این عوامل رادیکالی منجر به افزایش نرخ مرگ و میر اسپرم‌ها پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی خواهد شد که در این راستا مطالعات قبلی حاکی از آن است که افزودن مکمل‌های آنتی اکسیدانی به محیط انجماد اسپرم به دلیل مقابله با افزایش عوامل اکسیداتیوی ناشی از شوک دمایی میزان مرگ میر پس از یخ‌گشایی را بطور معنی-داری کاهش می‌دهد که این امر احتمالا به دلایل فوق الذکر در نمونه حاوی آنزیم SOD با غلظت IU/ml ۱۰۰منجر به افزایش معنی‌دار زنده‌مانی اسپرم در ساعت دوم انکوباسیون شد. در این مورد نتایج ما با تحقیقات Roca و همکاران در سال ۲۰۰۵، Foot و همکاران در سال ۲۰۰۲ و Cocchia و همکاران در سال۲۰۱۱ همخوانی داشت (۱۰،۱۱،۲۲). آنتی‌اکسیدان GSH در ساعت اول و دوم تغییر چشمگیری بر روی صفت زنده‌مانی نداشت اما تأثیر سطح ۵ mM در ساعت دوم انکوباسیون به سطح احتمال معنی‌دار نزدیک بود، این نتایج با مطالعات Gadea و همکاران در سال ۲۰۰۷ مغایر بوده اما با تحقیقات Gadea و همکاران در سال ۲۰۱۱، Bucak و Tekin در سال ۲۰۰۷ و Bucak و همکاران در سال ۲۰۰۸ منطبق می‌باشد (۶،۷،۱۲،۱۳). دلیل مغایر بودن این آزمایش احتمالاً با زمان یا مرحله افزودن آنتی‌اکسیدان به رقیق کننده و ساعت ارزیابی نمونه‌ها ارتباط دارد. بعبارت دیگر می‌توان گفت که برای تعیین تأثیر تیمار اعمال شده، احتمالا زمان بیشتری لازم است، اما متاسفانه همانطوریکه در بالا ذکر شد، فرضیه پژوهش ما بر روی ارزیابی نمونه‌ها تنها در ساعت اولیه پس از یخ‌گشائی و ساعت ۲ انکوباسیون استوار بود.

تست HOST یک تست دو زمانه است، بطوریکه نه تنها سالم بودن غشاء پلاسمایی را تائید می‌کند بلکه معیاری از زنده بودن اسپرم بوده و می‌تواند وجود یا عدم وجود این اختلالات را برای ما روشن سازد. متاسفانه برای مقایسه تیمارهای این تحقیق برای صفت سلامت غشاء پلاسمایی اطلاعات قبلی وجود نداشت، اما آنچه که می‌توان در مورد این صفت تحلیل و بررسی کرد این است که محققین به برهم خوردن تعادل بین پروتئین-چربی غشاء در طول انجماد-یخ‌گشائی سلول اشاره دارند که باعث می‌شود

پروتئین‌ها عملکرد مؤثرخود را در ارتباط با ساختمان آنزیم‌ها، رسپتورها و کانال‌های یونی غشاء از دست بدهند (۱۸). بنابر این پس از انجماد-یخ گشایی ممکن است که به دلیل شوک ناشی از تغییرات دمایی در فرایند انجماد-یخ گشایی و همچنین در اثر تجمع بالای رادیکال‌های آزاد به دلیل تخریب یا برهم زدن باندهای بین ملکول‌های پروتئین‌ها، چربی‌ها و پروتئین-چربی و همچنین فعالیت کانال‌های یونی موجود که عامل مهمی در اختلال عملکرد غشاء سلول اسپرم محسوب می‌گردد؛ یکپارچگی و سلامت ساختاری و عملکردی غشاء از دست برود. همانطوریکه تحقیق حاضر نشان می‌دهد استفاده از هر دو سطح آنزیم SOD و غلظت ۵ mM از GSH بکاربرده شده در رقیق‌کننده انجماد گاو در ساعت دوم انکوباسیون بر روی غشاء پلاسمایی تأثیر نسبتاً مطلوبی بر روی کاهش عوامل تخریب کننده غشاء و ترکیبات فرا ساختمانی اسپرم از خود نشان داده‌اند بطوریکه در این نمونه‌ها میزان سلامت و یکپارچگی غشاء نسبت به سایر گروه فاقد افزودنی به رقیق‌کننده انجماد، تأثیر بسیار مثبت و معنی‌داری در سیستم دفاعی داخل سلولی از خود نشان دادند. بالا بودن میزان سلامت غشاء یک شاخص بسیار ارزنده برای سلول اسپرم محسوب می‌شود چراکه باعث می‌گردد که محل ورود منابع انرژی از محیط خارج سلولی عملکرد مناسب خود را حفظ نموده و در نهایت با افزایش ماندگاری و بالارفتن شانس رسیدن سلول اسپرم به محل لقاح، سبب به ثمر نشستن یک لقاح موفق گردد. نتایج ما درمورد افزودن GSH با مطالعات Uysal و همکاران در سال ۲۰۰۷، Bucak و Tekin در سال ۲۰۰۷ و Bucak و همکاران در سال ۲۰۰۸ مغایر بوده ولی با نتایج Michael و همکاران در سال۲۰۰۷ موافق است (۶،۷،۱۹،۲۸). دلیل همخوان نبودن داده‌های آزمایش حاضر با برخی از مطالعات احتمالا به زمان ارزیابی، رقیق کننده مورد استفاده و گونه مورد مطالعه باشد.

نتیجه‌گیری کلی: تحقیق حاضر نشان داد که تأثیر آنتی‌اکسیدان‌های بکار گرفته شده در رقیق‌کننده انجماد بمدت زمان تماس با اسپرم بستگی دارد. نتیجه دیگر آنکه غلظت‌های مورد استفاده آنتی‌اکسیدان‌ها می‌بایست بگونه‌ای انتخاب شود که بتواند یک نظم و یکپارچگی عملکرد را در سیستم دفاع داخل سلولی در برابر اکسیدان‌هایی نظیر ROS را ایجاد نماید، تا نهایتاً سلول اسپرم بتواند، ویژگی‌های لازمه برای رسیدن به محل لقاح و نهایتا حصول یک لقاح موفق را بدست آورد. باتوجه به نتایج بدست آمده، اعتقاد بر آن است که استفاده از آنتی اکسیدان‌های GSH (بویژه سطح mM۵) و SOD (IU/ml۱۰۰) می‌تواند میزان تحرک و ماندگاری اسپرم گاو پس از یخ‌گشائی را بهبود ببخشد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با همکاری مرکز اصلاح دام غرب و شمال غرب کشور انجام شد فلذا نویسندگان از تمام پرسنل آن مرکز بویژه آقایان مهندس ایرج غفاری و حسن علیخانی کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

References

1. Agarwal, A., Prabakaran, S.A., Said, T.M. (2005) Prevention of oxidative stress injury to sperm. J Androl. 26: 654-660.
2. Bailey, J.L., Robertson, L., Buhr, M.M. (1994) Calcium regulation, computerized motility parameters and the fertility of bovine spermatozoa. Can. J Anim Sci. 74: 53-58.
3. Bansal, A.K., Bilaspuri, G.S. (2011) Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. Vet Med Int. 201: 1-7.
4. Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Gangnon, C., Sirard, M.A. (2001) Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology. 56: 275-286.
5. Bilodeau, J.F., Chatterjee, S., Sirard, M.A., Gagnon, C. (2000) Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Mol Reprod Dev. 55: 282-288.
6. Bucak, M.N., Ahin, A.A., Y¨uce, A. (2008) Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. Small Rum Res. 75: 128-134.
7. Bucak, M.N., Tekin N. (2007) Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. Small Rum Res. 73: 103-108.
8. Celeghini, E.C.C., de Arruda, R.P., de Andrade, A.F.C., Nascimento, J., Raphael, C.F., Rodrigues, P.H.M. (2008) Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. Anim Reprod Sci. 104: 119-131.
9. Chatterjee, S., de- Lamirande, E., Gagnon, C. (2001) Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. Mol Reprod Dev. 60: 498-506.
10. Cocchia, N., Pasolini, M.P., Mancini, R., Petrazzuolo, O., Cristofaro, I., Rosapane, I., Sica, A., Tortora, G., Lorizio, R., Paraggio, G., Mancini, A. (2011) Effect of SOD (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK

(extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. Theriogenology. 75: 1201- 1210.

11. Foote, R.H., Brockett, C.C., Kaproth, M.T. (2002) Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. Anim Reprod Sci. 71: 13-23.
12. Gadea, J., Gumbao, D., Ca´ novas, S., Garcı´a-Va´ zquez, F.A., Grullo´ n, L.A., Gardo´ n, J. C. (2007) Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. Int J Androl. 31: 40-49.
13. Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M.A., Garcia-Vazquez, F.A., Gardon, J.C. (2011) Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. Cryobiology. 62: 40-46.
14. Gadea, J., Selles, E., Marco, M.A., Coy, P., Matas, C., Romar, R., Ruiz, S. (2004) Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. Theriogenology. 62: 690- 697.
15. Giritharan, G., Ramakrishnappa, N., Balendran, A., Cheng, K.M., Rajamahendran, R. (2005) Development of in vitro tests to predict fertility of bulls. Can J Anim Sci. 85: 47-52.
16. Jeyendran, R.S., Vander-Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zanevld, L.J.D. (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characters. Reprod Fertil. 70: 219-228.
17. Maxwell, W.M., Stojanov, T. (1996) Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. Reprod Fertil Dev. 8: 1013-1020.
18. Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveria, A.T.D., Rodrigues, J.L. (2002) Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology. 57: 327-44.
19. 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.
20. Muller, C.H. (2000) Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. J Androl. 21: 10-30.
21. Perumal, P., Selvaraju, S., Selvakumar, S., Barik, A.K., Mohanty, D.N., Das, S., Das, R.K., Mishra, P.C. (2011) Effect of Pre-freeze Addition of Cysteine Hydrochloride and Reduced Glutathione in Semen of Crossbred Jersey Bulls on Sperm Parameters and Conception Rates. Reprod Domest Anim. 46: 636-641.
22. Roca, J., Rodri´Guez, M.J., Gil, M.A., Carvajal, G., Garcia, E.M., Cuello, C., Vazquez, J.M., Martinez, E.A. (2005) Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. J Androl. 26: 15-24.
23. Rodriguez-Martinez, H., Wallgren, M. (2011) Advances in Boar Semen Cryopreservation Review article. Vet Med Int. 201: 1-5.
24. Saacke, R.G., Dalton, J.C., Nadir, S., Nebel, R.L., Bame, J.H. (2000) Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. Anim Reprod Sci. 60: 663-677.
25. Shahbazi, M., Mohit, A., Mohammadi, M. (2011) Effect of different levels of vitamins E and C on quality of diluted sperm of Taleshi ram during storage at 5°C. J Vet Res. 66: 161-164.
26. Shoae, A., Zamiri, M.J. (2008) Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. Anim Reprod Sci. 104: 414-418.
27. Sikka, S.C. (1996) Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front Biosci. 1: 78-86.
28. Uysal, O., Bucak, M.N., Yavas, I., Varisl, O. (2007) Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. Anim Veter Adva. 6: 1362-1366.

Effect of reduced glutathione and superoxide dismutase antioxidant levels on some of the characteristics of sperm after freezing bull semen

Daghigh Kia, H.*, Olfati Karaji, R.

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
(Received 19 January 2017, Accepted 17 March 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Semen cryopreservation process with increased reactive oxygen species levels (ROS) plays a decisive role on the sperm cellular organelles (cell membrane, mitochondria and DNA). **OBJECTIVES:** The aim of this study was to determine the effects of adding different levels of superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione (GSH) antioxidants before freezing on motility, total progressive motility, viability and positive response to hypo-osmotic swelling test (HOST) parameters after Bull semen was frozen. **METHODS:** In this study, four bulls aged 4-5 years were used and 20 times the semen collection (5 ejaculates per bull) was performed. SOD (100 and 150 IU/ml) and GSH (5 and 7.5 mM) antioxidants were added to Tris - egg yolk extender. Diluted semen samples with or without additives were manually filled with straw and the free end of the straws were sealed by sealing machines; then, semen were frozen by semi-automatic freezing machine, using liquid nitrogen. After thawing the samples, the total and progressive motility, sperm viability and positive response to the HOST parameters were determined at zero and 2 h of incubation. **RESULTS:** Adding SOD and GSH antioxidant levels did not reveal significant differences between treatments in any of the semen parameters in the initial hour of incubation after thawing. Two hours incubation of post-thawed semen samples containing SOD (100 IU/ml) significantly improved total motility, viability and membrane integrity of the sperm ($p<0.05$). Also, in samples containing SOD (150 IU/ml), sperm membrane integrity was maintained ($p<0.05$). In the semen samples with antioxidant GSH (5 mM), total motility and membrane integrity of the sperm are considerably improved after thawing ($p<0.05$). **CONCLUSIONS:** This study showed that using SOD and GSH antioxidants as freezing semen extender additives can improve post-thawed bull semen quality.

Keyword: semen cryopreservation, reduced glutathione, superoxide dismutase, sperm parameters

Figure Legends and Table Captions

Graph 1. The comparison of sperm progressive motility means after thawing the semen samples containing different levels of GSH and SOD antioxidants at zero and 2 hours of incubation (mean± SD). Columns with no common letters differ significantly ($p<0.05$).

Graph 2. The comparison of sperm total motility means after thawing the semen samples containing different levels of GSH and SOD antioxidants at zero and 2 hours of incubation (mean± SD). Columns with no common letters differ significantly ($p<0.05$).

Graph 3. The comparison of sperm survival means after thawing the semen samples containing different levels of GSH and SOD antioxidants at zero and 2 hours of incubation (mean± SD). Columns with no common letters differ significantly ($p<0.05$).

Graph 4. The comparison of sperm membrane integrity (HOST test) means after thawing the semen samples containing different levels of GSH and SOD antioxidants at zero and 2 hours of incubation (mean± SD). Columns with no common letters differ significantly ($p<0.05$).

***Corresponding author's email: daghighkia@tabrizu.ac.ir, Tel: 0411-3392062, Fax: 0411-3356004**