مجله
تحقیقات دام و طیور
جلد۱- شماره ۴- زمستان ۱۳۹۱- ص ص ۱-۷

تاریخچه مقاله:
دریافت:۹۱/۱۱/۲۱
پذیرش: ۹۲/۰۲/۲۴

تأثیر سطوح مختلف گلوتاتیون و سوپراکسید دیسموتاز بر برخی از ویژگی‌های اسپرم گاو پس از انجماد

رستگار الفتی کرجی[۱]، حسین دقیق کیا*[۲]، غلامعلی مقدم[۳]، علی حسین خانی[۴]، صادق علیجانی[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۲- دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۳- استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۴- استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

چکیده

هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی تأثیر افزودن سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون احیا شده (GSH) قبل از انجماد بر ویژگی‌های حیاتی اسپرم پس از یخ گشایی گاو بود. در این مطالعه ۴ راس گاو هلشتاین با سن ۵-۴ سال استفاده شد. از هر گاو در ۵ نوبت و در مجموع ۲۰ مرتبه اسپرم گیری بعمل آمد. پس از افزودن آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دسموتاز به میزان (۱۰۰ IU/ml و ۱۵۰) و GSH به میزان (۵ mM و ۷/۵) به رقیق کننده تریس-زرده تخم مرغ نمونه‌ها منجمد شدند. بدنبال یخ‌گشائی نمونه‌های منی، پارامترهای تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی در ساعات صفر و ۲ انکوباسیون تعیین شدند. افزودن سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دسموتاز و GSH تاثیری بر پارامترهای اندازه گیری شده در ساعت اولیه انکوباسیون پس از یخ‌گشائی نداشتند. ۲ ساعت پس از انکوباسیون، تحرک کل، زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء اسپرم در نمونه‌های منی حاوی سوپراکسید دسموتاز به میزان (۱۰۰ IU/ml)، بطور معنی‌داری بهبود یافت ($P <$ ۰/۰۵). افزودن سوپراکسید دیسموتاز به محلول رقیق کننده منی به میزان (۱۵۰ IU/ml) باعث حفظ یکپارچگی غشاء اسپرم گردید ($P <$ ۰/۰۵). در نمونه‌های منی با آنتی‌اکسیدان GSH (۵ mM)، تحرک کل و یکپارچگی غشاء اسپرم، بهبود قابل ملاحظه‌ای را پس از یخ‌گشائی نشان داد ($P<$۰/۰۵). بطور کلی نتایج این آزمایش نشان دهنده آن است که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دسموتاز و GSH در رقیق‌کننده می‌تواند کیفیت منی گاو را پس از یخ‌گشائی حفظ نماید.

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

نگارنده پاسخگو: حسین دقیق‌کیا. آدرس: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، تلفن: ۳۳۹۲۰۶۲-۰۴۱۱
پست الکترونیک: daghighkia@tabrizu.ac.ir

مقدمه

یکی از بزرگترین چالش‌های موجودر در مسیر توسعه تکنیک‌های تولید مثلی از قبیل تلقیح مصنوعی، آسیب‌های وارده بر اسپرم در طی فرایند انجماد منی می‌باشد. 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 به وقوع می‌پیوندد: ۱) تولید انواع اکسیژن واکنش‌زا[1] (ROS) (بیلودا و همکاران، ۲۰۰۰؛ چاترجی و همکاران، ۲۰۰۱) 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 سوپراکسید دسموتاز (بیلودا و همکاران، ۲۰۰۰؛ گیدا و همکاران، ۲۰۰۴).

مطالعات نشان می‌دهد در طول فرآیند انجماد-یخ‌گشائی، با افزایش سطح ROS یا به عبارت دیگر استرس اکسیداتیوی، اسیدهای چرب غیراشباع غشاء پلاسمایی اسپرم گاو مستعد پراکسیدسیون است، بعلاوه ترکیبات سمی حاصل از این فرآیند (مالونیل دآلدئید) می‌تواند در ساختمان و عملکرد اندامک‌های مهمی مانند غشاء پلاسمایی، میتوکندری و DNA اختلال ایجاد کند، در نتیجه این تغییرات تحرک، زنده‌مانی و نهایتاً باروری اسپرم را کاهش می‌دهد (بنسال و بیلسپوری، ۲۰۱۱).

در تحقیقات اخیر محققین نشان دادند که افزودن آنتی اکسیدان‌ها به محیط انجماد گونه‌های مختلف، باعث بهبود صفات تحرک، زنده‌مانی و باروری اسپرم‌های منجمد-یخ گشائی می‌شود (شهبازی و همکاران، ۱۳۹۱؛ بیلودا و همکاران، ۲۰۰۱؛ روکا و همکاران، ۲۰۰۵؛گیدا و همکاران؛ ۲۰۱۱، کاکیا و همکاران، ۲۰۱۱؛ پرومال و همکاران، ۲۰۱۱).

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 را در حافظت از چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک سلول، ایفا می‌کند. گلوتاتیون همراه با سلنیوم و ویتامین E بعنوان کوفاکتور آنزیم GPX نقش آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کند (آگروال و همکاران، ۲۰۰۵). بیلودا و همکاران، (۲۰۰۱) اشاره کردند که از افزودن ترکیبات تیول دار بدلیل تأثیر مثبت بر ویژگی‌های حرکتی اسپرم به رقیق کننده انجماد می‌توان بهره برد. در این راستا، بوکاک و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که غنی نمودن رقیق کننده انجماد با ترکیبات تیول‌دار مانند GSH و سیستئین به ترتیب سبب بهبود سیستم آنزیمی و حرکتی اسپرم پس از یخ گشائی نمونه‌های منی قوچ در رقیق کننده انجماد می‌گردد.

متالوپروتئین سوپراکسید دسموتاز (حاوی عناصر مس و روی)، یون سوپراکسید را به اکسیژن و پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند. بنابر این نقش آنتی‌اکسیدانی بارزی در سیستم دفاعی داخل سلولی ایفا می‌کند (سیکا، ۱۹۹۶).

تحقیقات پیشین نشان داد که استفاده از سوپراکسید دسموتاز در رقیق کننده نگهداری کوتاه مدت اسپرم اسب و انجماد منی خوک سبب حفظ ویژگی‌های حرکتی و عملکردی سلول‌های اسپرم و نهایتاً بهبود باروری می‌گردد (روکا و همکاران، ۲۰۰۵؛ کاکیا و همکاران، ۲۰۱۱).

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر افزودن سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دسموتاز 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 روش‌ها

این تحقیق در مرکز اصلاح نژاد شمال غرب و غرب کشور در استان آذربایجان شرقی و با استفاده از 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 10^8 × ۵ اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک بیش از ۷۰٪ و ناهنجاری کل کمتر از ۱۲٪ اسپرم غیرطبیعی، به عنوان منی نرمال در نظر گرفته شدند؛ در غیر اینصورت منی جمع‌آوری شده از دام مورد نظر حذف گردید. در هر تکرار آزمایش، به منظور 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 فرکتوز، ۰/۲۵ M تریس، ۲۰٪ زرده تخم مرغ، ۷٪ گلیسرول، ۲۵۰ mg/l جنتامایسین، ۱۵۰ mg/l لینکومایسین، ۳۰۰ mg/l اسپکتینومایسین و ۵۰mg/l تایلوزین با pH ۶/۸) (بیلودا و همکاران، ۲۰۰۲) به روش دو مرحله‌ای انجام شد. به نحوی که

1 - Reactive Oxygen Species (ROS)

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 گرفت). پس از افزودن رقیق کننده B، آنتی اکسیدان‌های GSH (سیگما- آلدریچ، کانادا) در دو سطح (۵ mM و ۷/۵) و سوپراکسید دسموتاز (سیگما- آلدریچ، کانادا) در دو سطح (۱۰۰IU/ml و ۱۵۰) به فالکون‌های مخصوص هر تیمار افزوده شد 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 میلی‌لیتر با غلظت ۵۰×۱۰^{۶} اسپرم در هر میلی‌لیتر بسته‌بندی شده سپس نمونه‌ها توسط دستگاه نیمه اتو ماتیک انجماد (Mini tube, Germany) با شیب انجماد ۱۵- درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه از دمای ۵+ درجه سانتی‌گراد به ۱۵۰- درجه سانتی‌گراد کاهش داده شد و پس از آن نمونه‌ها را در ازت مایع غوطه‌ور شده و تا زمان یخ‌گشایی نگهداری شد.

ارزیابی‌های پس از انجماد

نمونه‌ها در داخل حمام آب گرم ۳۷°C بمدت ۳۰ ثانیه یخ‌گشائی شدند و سپس در ساعات صفر و ۲ بعد از یخ‌گشایی ارزیابی شدند. قبل از ارزیابی در ساعت صفر، جهت تطابق‌پذیری یا احیاء سلول، نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفتند.

ویژگی‌های حرکت‌پیشرونده و تحرک کل تمام تیمارهای آزمایشی با سیستم اتوماتیک آنالیز اسپرم [1] (CASA) مجهز به به میکروسکوپ فازکنتراست (Nikon, Japan) با بزرگ نمایی 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. سپس از هر نمونه عکسبرداری شده و توسط نرم افزار سیستم CASA مورد آنالیز قرار گرفت. برای هر نمونه، این روش بر روی سه لام (۲۰۰ اسپرم در هر لام) تکرار شد و میانگین سه تکرار بعنوان داده واحد محاسبه شد.

درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها به کمک روش رنگ‌آمیزی ائوزین- نکروزین بر اساس روش بالستری و همکاران، (۲۰۰۷) ارزیابی شد. بدین ترتیب که گسترشی از یک قطره نمونه اسپرم و دو قطره رنگ روی یک لام گرم تهیه گردید 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 سر آنها بطور جزئی یا کامل رنگ بنفش را نشان دادند مرده و تنها اسپرم‌هایی که از ورود رنگ به داخل قسمت سر ممانعت کرده بودند بعنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شدند.

یکپارچگی غشای پلاسمایی به کمک میزان پاسخ مثبت به محلول HOST (۹ g فرکتوز، ۴/۹ g سیترات سدیم در یک لیتر آب مقطر دوبار تقطیر با اسموزیته ۱۰۰ mOm/kg) بر اساس روش بوکت و همکاران (۱۹۹۷) تعیین شد. برای انجام این تست ۵۰ µl از هر نمونه اسپرم یخ‌گشائی شده به ۵۰۰µl به محلول هیپواسموتیک اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شد. سپس نمونه به آرامی مخلوط شد و یک قطره (حدود ۵µl) از سوسپانسیون عمل‌آوری شده روی اسلاید گرم قرار داده و با لام پوشانده و زیر میکروسکوپ (۴۰۰×) بررسی شد. از ۴۰۰ اسپرم که در هر تکرار شمارش شد، درصد اسپرم‌های با دم تاب‌خورده و متورم تعیین گردید.

آنالیز آماری

داده‌های بدست آمده برای صفات درصد تحرک‌پیش‌رونده، درصد تحرک‌کل، 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 (9.1.3) آنالیز شدند، بطوریکه در مدل، اثرات تیمار و زمان ارزیابی برای تمام صفات بعنوان اثر ثابت در نظر گرفته شد. برای مقایسه میانگین این صفات از آزمون مقایسه Tukey-Kramer استفاده شد. حداقل سطح معنی‌داری کمتر از ۵ درصد نظر گرفته شد.

نتایج

تحرک پیشرونده

نتایج حاصل از تأثیر افزودن غلظت‌های مختلف سوپراکسید دسموتاز در رقیق‌کننده منی گاو هلشتاین برای صفت تحرک-پیش‌رونده در دو زمان صفر و ۲ ساعت پس از یخ‌گشائی در جدول ۱ آمده است. در نتایج آنالیز واریانس این صفت تغییر

1 - Computer assay sperm analysis

محسوسی مشاهده نشد. همچنین بین هیچ یک از تیمارها در هر دو زمان ارزیابی پس از یخ‌گشائی، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین‌های (SD ±) صفت تحرک پیشرونده اسپرم نمونه‌های منی در ساعات صفر و ۲ انکوباسیون پس از یخ‌گشائی.

آنتی اکسیدان‌ها	سطوح	تحرک پیشرونده (٪)	
		ساعت صفر انکوباسیون	ساعت ۲ انکوباسیون
گلوتاتیون احیاء شده	۵mM	۵۴/۴۲±۲/۸۳	۴۳/۸۳±۳/۵۴
	۷/۵ mM	۵۴/۷۳±۳/۳۸	۴۴/۳۹±۳/۶۰
سوپر اکسیددیسموتاز	۱۰۰ IU	۵۹/۳۷±۳/۳۸	۴۹/۰۱±۵/۳۹
	۱۵۰ IU	۵۶/۸۷±۶/۹۱	۴۷/۶۲±۵/۳۰
شاهد	-	۵۰/۲۹±۲/۴۷	۳۸/۹۵±۳/۷۲

تحرک کل

نتایج بدست آمده برای صفت تحرک کل نشان داد که غلظت‌های مختلف سوپراکسید دسموتاز و GSH بکار برده شده در این آزمایش در ساعت اولیه پس از یخ‌گشائی باعث بهبود معنی‌دار صفت تحرک‌کل اسپرم‌ها در مقایسه با گروه شاهد نشدند، در حالیکه با گذشت ۲ ساعت از انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۳۷°C، تیمار سوپراکسید دسموتاز با غلظت نهایی ۱۰۰ IU/ml در رقیق کننده، توانست کیفیت این صفت را نسبت به گروه شاهد ارتقاء بخشد (P<۰/۰۱). همچنین در ساعت دوم ارزیابی نمونه‌های حاوی GSH با غلظت نهایی ۵ mM نسبت به تیمار شاهد به مراتب عملکرد بهتری نشان داد (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های صفت تحرک کل اسپرم نمونه‌های منی در ساعات صفر و ۲ انکوباسیون پس از یخ‌گشائی.

آنتی اکسیدان‌ها	سطوح	تحرک کل (٪)	
		ساعت صفر انکوباسیون	ساعت ۲ انکوباسیون
گلوتاتیون احیاء شده	۵ mM	۷۴/۰۳±۲/۷۴	۶۷/۸۷±۵/۳۴[a]
	۷/۵ mM	۷۱/۳۲±۲/۰۵	۶۴/۰۹±۴/۶۹[ab]
سوپر اکسیددیسموتاز	۱۰۰ IU	۷۴/۶۴±۲/۵۷	۶۷/۳۰±۲/۶۰[a]
	۱۵۰ IU	۷۴/۶۶±۲/۹۲	۶۳/۲۳±۵/۱۳[ab]
شاهد	-	۷۰/۹۸±۱/۳۷	۵۶/۹۸±۲/۸۸[b]

* حروف متفاوت در هر ستون، اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

زنده مانی

نتایج رنگ‌آمیزی ائوزین- نکروزین نمونه‌های هر دو سطح آنزیم سوپراکسید دسموتاز بیانگر عدم تاثیر معنی‌دار در ساعت اولیه پس از یخ گشائی است؛ اما رنگ‌آمیزی نمونه‌ها در ساعت دوم ارزیابی بیانگر افزایش معنی‌داری درصد اسپرم‌های زنده در نمونه‌های دارای این آنزیم با غلظت ۱۰۰ IU/ml در مقایسه با گروه شاهد است. اما مقایسه میانگین تیمارها برای صفت درصد اسپرم‌های زنده تحت تاثیر هر دو سطح GSH در ۲ انکوباسیون بیانگر عدم تأثیر معنی‌داری تیمارهای اعمال شده می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های(SD ±) صفت زنده‌مانی اسپرم نمونه‌های منی در ساعات صفر و ۲ انکوباسیون پس از یخ‌گشائی.

آنتی اکسیدان‌ها	سطوح	زنده‌مانی (٪)	
		ساعت صفر انکوباسیون	ساعت ۲ انکوباسیون
گلوتاتیون احیاء شده	۵ mM	۶۵/۴۳±۲/۲۷	۵۲/۲۳±۲/۸۱[ab]
	۷/۵ mM	۶۵/۷۲±۶/۱۰	۵۱/۱۵±۳/۸۲[ab]
سوپر اکسیددیسموتاز	۱۰۰ IU	۵۹/۶۴±۴/۱۱	۵۴/۶۸±۳/۷۰[a]
	۱۵۰ IU	۵۷/۸۲±۵/۱۰	۴۸/۰۵±۴/۱۸[ab]
شاهد	۰۰۰۰	۵۶/۳۹±۶/۷۵	۴۳/۸۲±۴/۹۳[b]

* حروف متفاوت در هر ستون، اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

یکپارچگی غشاء اسپرم‌ها

ارزیابی‌های ساعت اولیه در رقیق کننده‌های حاوی سطوح مختلف GSH و سوپراکسید دسموتاز تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد. در حالی که، نتایج این تحقیق حاکی از پاسخ مثبت نمونه‌های تیماری به تست HOST در ساعت ۲ انکوباسیون بود، بطوری که تیمار سوپراکسید دسموتاز با غلظت ۱۰۰ IU/ml (P<۰/۰۵) و تیمار سوپراکسید دسموتاز با غلظت ۰ ۱۵ IU/ml (P<۰/۰۵) و ۵ mM از GSH (P<۰/۰۵) درساعت ۲ انکوباسیون به خوبی توانایی خود را در حفظ یکپارچگی غشا اسپرم‌ها در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند، (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های (SD ±) میزان یکپارچگی غشاء اسپرم نمونه های منی در ساعات صفر و ۲ انکوباسیون پس از یخ-گشائی.

آنتی اکسیدان‌ها	سطوح	یکپارچگی غشاء (٪)	
		ساعت صفر انکوباسیون	ساعت ۲ انکوباسیون
گلوتاتیون احیاء شده	۵ mM	۵۵/۰۹±۶/۳۱	۴۶/۴۷±۵/۶۵ [a]
	۷/۵ mM	۵۳/۶۸±۴/۸۴	۴۲/۴۱±۳/۶۷[ab]
سوپر اکسیددیسموتاز	۱۰۰ IU	۵۵/۹۸±۵/۱۹	۴۷/۰۸±۵/۱۳ [a]
	۱۵۰ IU	۵۴/۳۲±۴/۴۴	۴۸/۰۶±۳/۴۲ [a]
شاهد	۰۰۰۰	۴۷/۴۱±۴/۱۳	۳۳/۵۲±۵/۶۲ [b]

* حروف متفاوت در هر ستون، اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵)

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، در تمامی تست‌های ارزیابی اسپرم، در مرحله اول ارزیابی (ساعت صفر) تفاوتی بین تیمارهای آزمایشی و غلظت‌های مختلف آنتی اکسیدان‌ها مشاهده نشد. احتمالاً محدودیت زمان مجاورت آنتی اکسیدان با سلول‌های اسپرم دلیل اصلی این عدم تغییر باشد (گیدا و همکاران، ۲۰۰۸).

مطالعات پیشین نشان داد که ویژگی‌های حرکتی اسپرم رابطه مستقیمی با عملکرد باروری دارد (جان سکواز و همکاران ، ۲۰۰۳) بطوری که اسپرم‌هایی با سرعت حرکتی بیشتر شانس بیشتری را برای رسیدن به محل لقاح دارند؛ این در حالی است که به سبب آسیب‌های وارده به اسپرم در طول انجماد از میزان تحرک این سلول‌ها پس از انجماد بطور محسوس کاسته می‌شود؛ بنابراین افت باروری گله با به کاربردن اسپرم منجمد شده اجتناب ناپذیر است. محقیق در این زمینه اشاره نموده‌اند که ویژگی‌های حرکتی اسپرم با میزان فعالیت میتوکندری‌ها بعنوان موتور تأمین کننده انرژی حرکت اسپرم ارتباط نزدیکی وجود دارد (رزپسینی و همکاران، ۲۰۰۱). غلظت‌های بالای گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌تواند برای سلامت سلول‌ها و فعالیت میتوکندری مخاطره آمیز باشد. در عین حال آنتی اکسیدان‌هایی نظیر سوپراکسید دسموتاز و GSH نقش غیر قابل انکاری در پاک سازی گونه‌های آزاد اکسیژنی ایفا می‌کنند. لذا افزودن آنتی اکسیدان‌ها به منی، با بهبود شرایط محیطی برای اسپرم و افزایش زنده مانی، تحرک بیشتر اسپرم‌ها را نیز به همراه خواهد داشت.

نتایج به دست آمده در ارتباط با بهبود پارامتر تحرک کل اسپرم در تیمارهای GSH و سوپراکسید دسموتاز به ترتیب با غلظت نهایی ۵ mM و ۱۰۰ IU/ml در مقایسه با تیمار شاهد در این مطالعه تأیید کننده فرضیه فوق می‌باشد. نتایج ما با یافته‌های ماکسول و استوژانف، (۱۹۹۶) و کاکیا و همکاران، (۲۰۱۱) تطابق داشت. نتایج حاصل از مطالعات گیدا و همکاران، (۲۰۱۱)، پرومال و همکاران، (۲۰۱۱) و بوکاک و همکاران، (۲۰۰۸) با نتایج بدست آمده در این آزمایش در خصوص تأثیر افزودن GSH به رقیق‌کننده انجماد بر تحرک کل مغایرت داشت.

در مورد عدم تأثیر معنی‌دار سطوح مختلف سوپراکسید دسموتاز و GSH بر تحرک‌پیش‌رونده اسپرم در آزمایش حاضر، می‌توان گفت که دوزهای بکار رفته سوپراکسید دسموتاز نتوانسته است آنگونه که انتظار می‌رفت اثرات مطلوبی بر مکانیسم‌های خنثی‌سازی عوامل اکسیدانی سلول اسپرم بوجود آورد. نتایج بدست آمده از تأثیر سطوح سوپراکسید دسموتاز در آزمایش حاضر، همسو با مطالعات گیدا و همکاران، (۲۰۱۱) و روکا و همکاران، (۲۰۰۵) بوده، اما با نتایج کاکیا و همکاران، (۲۰۱۱) مطابقت نداشت. اثر افزودن سطوح GSH در رقیق-کننده انجماد بر صفت تحرک‌پیش‌رونده، با نتایج گیدا و همکاران، (۲۰۰۷)، پرومال و همکاران، (۲۰۱۱) و بوکاک و همکاران، (۲۰۰۸) مشابه بوده ولی با نتایج گیدا و همکاران، (۲۰۱۱) مغایرت داشت. احتمالاً دلیل عدم همخوانی با نتایج گیدا و همکاران، (۲۰۱۱) ویژگی‌های محیط نگهداری، گونه، پروسه انجماد و دوز مورد استفاده در آن تحقیق با پژوهش ما باشد.

در خصوص همبستگی این صفت با باروری اسپرم، تناقضات زیادی وجود دارد. ژیندران و همکاران، (۱۹۸۴)، بیلی و همکاران، (۱۹۹۴) و گریتران و همکاران، (۲۰۰۵) در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که تحرک پیش‌رونده شاخص مناسبی برای ارزیابی منی نمی‌باشد؛ در حالیکه رودریگرز و همکاران، (۲۰۱۱)، مولر، (۲۰۰۰) و ساکه و همکاران، (۲۰۰۰) نظر مخالفی در این مورد دارند.

نتایج پیشین نشان داد که بهبود نرخ باروری اسپرم با بالا بودن نسبت اسپرم‌های زنده به مرده رابطه‌ی نزدیکی دارد. (گیدا و همکاران، ۲۰۱۱). کاهش نرخ زنده‌مانی پس از انجماد ارتباط نزدیکی با افزایش نرخ پراکسیده شدن چربی غشاءها اسپرم به دنبال افزایش میزان بیش از حد ROS داخل سلولی دارد (گودری و ولک، ۲۰۱۲). به عبارت دیگر تخریب بخشی از ساختمان غشاء به دنبال انجماد منی آثار نامطلوبی بر سایر ارگان‌های داخل سلولی دارد که نهایتاً حیات سلول را به خطر می‌اندازد. هیچ یک از سطوح GSH در ساعت دوم انکوباسیون تأثیر معنی‌داری بر حفظ نرخ زنده‌مانی اسپرم نداشتند، این نتایج با مطالعات گیدا و همکاران، (۲۰۱۱)، بوکاک و تیکن، (۲۰۰۷) و بوکاک و همکاران، (۲۰۰۸) منطبق، اما با تحقیقات گیدا و همکاران، (۲۰۰۷) مغایر می‌باشد. در مقابل افزودن سوپراکسید دسموتاز (۱۰۰ IU/ml) به رقیق کننده انجماد صفت زنده‌مانی اسپرم این آزمایش را بهبود بخشید. این نتایج نشان می‌دهد که سوپراکسید دسموتاز با غلظت ۱۰۰ IU/ml تأثیر بیشتری نسبت به سایر تیمارها در ایجاد تعادل بین نرخ تولید و پاک سازی ROS دارد.

تست HOST یک تست دو زمانه است، بطوریکه نه تنها سالم بودن غشاء پلاسمایی را تأیید می‌کند بلکه معیاری از زنده

بودن اسپرم بوده و می‌تواند وجود یا عدم وجود این اختلالات را برای ما روشن سازد. آنچه که می‌توان در مورد این صفت تحلیل و بررسی کرد این است که محققین به برهم خوردن تعادل بین پروتئین– چربی در طول انجماد- یخ‌گشائی سلول اشاره دارند که باعث می‌شود پروتئین‌ها عملکرد موثر خود را در ارتباط با ساختمان آنزیم‌ها، گیرنده‌ها و کانال‌های یونی غشاء از دست بدهند (مدیروز و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین پس از انجماد ممکن است که یکپارچگی ساختاری و عملکردی غشاء از دست برود. هر دو سطح آنزیم سوپراکسید دسموتاز و سطح GSH ۵ mM بکاربرده شده در رقیق‌کننده انجماد گاو بر روی غشاء پلاسمایی تأثیر نسبتا مطلوبی از خود نشان دادند، به طوری که از ایجاد آسیب به غشاء پلاسمایی و سایر اندامک‌های سلولی ممانعت به عمل آورده است. نتایج ما درمورد افزودن دو سطح GSH با مطالعات یوسال و همکاران (۲۰۰۷)، بوکاک و تیکن (۲۰۰۷) و بوکاک و همکاران (۲۰۰۸) مغایر، اما با نتایج میشل و همکاران، (۲۰۰۷) موافق بود. می‌توان این نتایج را به بهبود عملکرد سلول اسپرم در استفاده از منابع انرژی که ناشی از حفظ سلامت و یکپارچگی غشاء آن پس از انجماد می‌باشد، نسبت داد. نتیجه این فرآیند بهبود ماندگاری اسپرم و افزایش احتمال رسیدن سلول اسپرم به محل لقاح و نهایتاً یک لقاح موفق خواهد بود.

تحقیق حاضر نشان داد که مدت زمان تماس آنتی اکسیدان مورد استفاده با اسپرم می‌تواند عملکرد آن را بطور قابل توجهی تحت تأثیر قرار دهد. همچنین غلظت آنتی‌اکسیدان‌های مورد استفاده می‌بایست بگونه‌ای انتخاب شود که بتواند یک نظم و یکپارچگی عملکرد را در سیستم دفاع داخل سلولی در برابر عوامل اکسیدکننده نظیر ROS ایجاد نماید، تا نهایتاً سلول اسپرم بتواند ویژگی‌های لازم برای رسیدن به محل لقاح و نهایتاً حصول یک لقاح موفق را بدست آورد.

باتوجه به نتایج بدست آمده، به نظر می‌رسد که استفاده از آنتی اکسیدان‌های GSH (۵ mM) و سوپراکسید دسموتاز (۱۰۰IU/ml) می‌تواند باعث بهبود برخی از ویژگی‌های کیفی اسپرم گاو پس از یخ‌گشائی شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند تا از همکاری صمیمانه کلیه پرسنل مرکز اصلاح نژاد دام غرب و شمال غرب کشور بویژه آقایان مهندس علیخانی و مهندس غفاری که امکان اجرای این پژوهش را فراهم کردند کمال تشکر و قدردانی را بنمایند.

منابع

شهبازی اردشیر محیط، م.، محیط، ا. محمدی، م.، ۱۳۹۰. اثر سطوح مختلف ویتامین‌های E و C بر کیفیت اسپرم رقیق شده قوچ تالشی در ذخیره سازی دمای ۵ درجه سانتی گراد. مجله تحقیقات دامپزشکی. شماره ۲، صفحات ۱۶۴-۱۶۱.

Agarwal, A., Prabakaran, S. A. and Said, T.M., 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm. Journal of Andrology. 26: 654-660.

Bailey, J.L., Robertson, L. and Buhr, M.M., 1994. Calcium regulation, computerized motility parameters and the fertility of bovine spermatozoa. Canadian Journal of Animal Science. 74: 53-58.

Balestri, F., Giannecchini, M., Sgarrella, F., Carta, M.C., Tozzi, M.G. and Camici, M., 2007. Purine and pyrimidine nucleosides preserve human astrocytoma cell adenylate energy charge under ischemic conditions. Neurochemistry International. 50: 517-523.

Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S., 2011. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. Veterinarian Medicine International. 2011:1-7.

Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Cormier, N. and Sirard, M.A., 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. Theriogenology. 57: 1105-1122.

Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Gangnon, C. and Sirard, M.A., 2001. Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology. 56: 275-286.

Bilodeau, J.F., Chatterjee, S., Sirard, M.A. and Gagnon, C., 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Journal of Molecular Reproduction Development. 55: 282-288.

Bucak, M.N. and Tekin N., 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. Small Ruminant Research. 73: 103-108.

Bucak, M.N., Ahin, A.A. and Y¨uce, A., 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after

the freeze–thawing process. Small Ruminant Research. 75: 128–134.
Buckett, W.M., Luckas, M.J., Aird, I.A., Farquharson, R.G., Kingsland, C.R. and Lewis-Jones, D.I., 1997. The hypo-osmotic swelling test in recurrent miscarriage. Fertility and Sterility 68: 506-509.
Chatterjee, S, de- Lamirande, E. and Gagnon, C., 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. Journal Molecular Reproduction Development. 60: 498-506.
Cocchia, N., Pasolini, M.P., Mancini, R., Petrazzuolo, O., Cristofaro, I., Rosapane, I., Sica, A., Tortora, G., Lorizio, R., Paraggio, G. and 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.
Gadea, J., Gumbao, D., Ca´ novas, S., Garcı´a-Va´ zquez, F.A., Grullo´ n, L.A. and 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. International Journal of Andrology. 31: 40-49.
Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M.A., Garcia-Vazquez, F.A. and 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.
Gadea, J., Selles, E., Marco, M.A., Coy, P., Matas, C., Romar, R. and 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.
Giritharan, G., Ramakrishnappa, N., Balendran, A., Cheng, K.M. and Rajamahendran, R., 2005. Development of in vitro tests to predict fertility of bulls. Canadian Journal of Animal Science. 85: 47-52.
Guthrie, H. and Welch, G., 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. Theriogenology.
Januskauskas, A., Johannisson, A. and Rodriguez-Martinez, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. Theriogenology. 60: 743-758.
Jeyendran, R.S., Vander-Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G. and 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. Journal of Reproduction Fertility. 70: 219-228.
Maxwell, W.M. and Stojanov, T., 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. Reproduction Fertility Development. 8: 1013-1020.
Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveria, A.T.D. and Rodrigues, J.L., 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology. 57: 327-44.
Michael, A., Alexopoulos, C., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Saratsis, P. and Boscos, C., 2007. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. Theriogenology. 68: 204-212.
Muller, C.H., 2000. Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. Journal of Andrology. 21: 10-30.
Perumal, P., Selvaraju, S., Selvakumar, S., Barik, A.K., Mohanty, D.N., Das, S., Das, R.K. and 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. Journal Reproduction Domestics Animal. 46: 636-641.
Roca, J., Rodri´Guez, M.J., Gil, M.A., Carvajal, G., Garcia, E.M., Cuello, C., Vazquez, J.M. and Martinez, E.A., 2005. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. Journal of Andrology. 26: 15-24.
Rodriguez-Martinez, H. and Wallgren, M., 2011. Advances in Boar Semen Cryopreservation Review article. Veterinarian Medicine International. 2011:1-5.
Ruiz-Pesini, E., Alvarez, E., Enriquez, J.A. and López-Pérez, M.J., 2001. Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. International Journal of Andrology. 24: 335-340.
Saacke, R.G., Dalton, J.C., Nadir, S., Nebel, R.L. and Bame, J.H., 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. Animal Reproduction Science. 60: 663-677.
Sikka, S.C., 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Journal Frontiers in Bioscience. 1: 78-86.
Uysal, O., Bucak, M.N., Yavas, I. and Varisl, O., 2007. Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. Journal of Animal and Veterinaian Advances. 6 : 1362-1366.