اثرات افزودن گلوتامین بر روی برخی از فاکتورهای میکروسکوپیک اسپرم گاومیش بعد از یخ گشایی

رحیم بهشتی[۱*]، مجید یوسفی‌اصل[۲]، جمشید قیاسی[۲]

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات افزودن گلوتامین در سطوح مختلف به رقیق کننده منی گاومیش(تریس- زرده تخم مرغ) بر روی برخی از فاکتورهای میکروسکوپیک اسپرم بعد از یخ گشایی بود. پنج رأس گاومیش بالغ (۳ تا ٤ ساله) در مرکز تحقیقات و پرورش گاومیش شمال غرب کشور کشور در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند، از این گاومیش‌ها ۲۰ انزال به کمک مهبل مصنوعی گرفته شد. پس از ارزیابی اولیه نمونه‌ها، رقیق‌سازی تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در پنج تیمار صورت گرفت: ۱) رقیق کننده فاقد آنتی اکسیدان (شاهد)، ۲) رقیق کننده حاوی ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مول گلوتامین. منی رقیق شده در نی‌های ۰/۵ میلی‌لیتری بسته بندی شده و در نیتروژن مایع منجمد شد. یک ماه پس از انجماد نمونه‌ها در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه رفع انجماد شد. از نظر تحرک پیشرونده تیمار حاوی ۲۵ میلی‌مول گلوتامین (۰/۱٦ ± ٦۳/۹۷) بهترین نتیجه را نسبت به گروه‌های دیگر داشتند. از نظر درصد سلامت آکروزم تفاوت معنی‌دار مابین تیمارهای مورد آزمایش ملاحظه نشد. درصد حیات اسپرم‌ها در تیمار حاوی ۲۵ میلی‌مول گلوتامین (۰/۳۷ ± ۷۹/۰۳) نسبت به گروه کنترل (۰/٤۰ ± ۵۲/۱۳) بالاتر بود. مابین تیمارهای آزمایشی، پایین‌ترین درصد حیات در تیمار حاوی ۱۰۰ میلی‌مول گلوتامین (۰/٤۰ ± ٥٤/۱۳) بود. در کل می‌توان نتیجه گرفت استفاده از مقادیر مناسب گلوتامین در رقیق کننده منی گاومیش، میتواند به بهبود کیفیت اسپرم منجمد گاومیش گردد.

واژگان کلیدی: *اسپرم، گاومیش، گلوتامین، انجماد منی*

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۱۰

مقدمه

گاومیش دومین تولیدکننده‌ی عمده‌ی شیر در جهان بوده و بیش از یک سوم شیر آسیا را تولید می‌کند (۵). گوشت گاومیش نیز ارزش غذایی بالایی داشته و در مقایسه با گوشت گاو و خوک اسیدهای چرب اشباع کمتری دارد. پرورش گاومیش به دلیل حساسیت ذاتی این حیوان به تنش‌های محیطی که باعث بروز خفیف فحلی، افزایش فاصله گوساله‌زایی در آن می‌شوند، دشوار است و این امر خسارت‌های سنگینی بر صنعت دامپروری وارد می‌کند (۱۲). اهمیت فزآینده گاومیش باعث شده است که فن‌آوری تلقیح مصنوعی به عنوان نیازی برای افزایش بهره‌وری این گونه‌ی جانوری مطرح گردد. در طول فرآیندهای انجماد و رفع انجماد در اثر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشای پلاسمایی، مولکول‌های فعال و رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد می‌شوند که تحرک بعد از یخ‌گشایی، قابلیت زنده‌مانی، فعالیت آنزیمی درون‌سلولی، باروری و عملکرد اسپرم را مختل می‌کند(۲۱و۲).

اسپرم و پلاسمای منی پستانداران به‌صورت طبیعی دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از قبیل تائورین، گلوتاتیون، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و هیپوتائورین می‌باشند که به عنوان مکانیسمی در برابر صدمه‌های پراکسیداسیون بوده و برای جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو هستند. این توانایی آنتی-اکسیدانی در سلول‌های اسپرم به دلیل کم بودن اجزای سیتوپلاسمی محدود است و این آنتی‌اکسیدان‌ها برای نگهداری طولانی مدت کافی نیستند. بنابراین، اسپرم پستانداران قابلیت و توانایی کامل برای مقابله با پراکسیداسیون در طول فرآیند انجماد و رفع انجماد را ندارد (۱۵و ۳، ۱).

مکانیسم‌های خاصی برای استفاده از آمینواسیدها برای ایجاد مقاومت در برابر تنش سرمایی وجود دارد. آمینواسیدها (به‌عنوان مثال گلوتامین و سیستئین) نقش مهمی در جلوگیری از رسوب پروتیین‌های غشاء در طول ذخیره‌ی اسپرم به‌صورت منجمد و همچنین در افزایش پتانسیل محافظت اسپرم در برابر شوک سرمایی اسپرم بز دارند (۱۷و ١٤). آمینواسیدها در سطح بیرونی

۱*- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، گروه دامپزشکی، شبستر، ایران. Rahimbeheshti@gmail.com.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، گروه علوم دامی، شبستر، ایران.

غشای سلول اسپرم باعث افزایش تحرک آن، انسجام غشای آکروزوم و افزایش پتانسیل باروری در اسب، میمون و انسان بعد از انجماد منی و رفع انجماد آن می‌شوند (۱۶و ۱۳). اسیدآمینه گلوتامین در طول غشای اسپرم پخش می‌شود و با فسفولیپیدها در غشای پلاسمایی اسپرم ترکیب شده و پراکسیداسیون لیپید غشاء را متوقف کرده و سیالیت غشاء را افزایش می‌دهد که منجر به مقاومت بیش‌تر اسپرم در برابر آسیب‌های انجماد و رفع انجماد می‌شود (۱۱).

هدف از این تحقیق، بررسی اثرات حضور گلوتامین در رقیق کننده بر خصوصیات اسپرم گاومیش پس از رفع انجماد بود.

مواد و روش کار

جمع‌آوری و ارزیابی اولیه‌ی منی: جمع‌آوری نمونه‌های منی (۲۰ انزال) از پنج راس گاومیش نر (۲-٤ ساله) در مرکز تحقیقات و پرورش گاومیش شمال غرب کشور با استفاده از مهبل مصنوعی انجام شد. بلافاصله بعد از جمع‌آوری، منی به آزمایشگاه منتقل گردید، تا ارزیابی اولیه‌ی منی از لحاظ تراکم اسپرم و تحرک آن صورت گرفت و نمونه‌هایی با تحرک اسپرم بالای ۷۰ درصد و غلظت بیش از $۱۰^{۹} \times ۲/۵$ اسپرم در میلی‌لیتر جمع‌آوری شدند. منی جمع‌آوری شده به ٦ قسمت مساوی تقسیم شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به ترتیب با رقیق کننده‌ی پایه (تیمار شاهد) و ۵ سطح آنتی‌اکسیدان گلوتامین (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مول) مخلوط گردید. نمونه‌های منی رقیق شده در پایوت‌های نیم میلی‌لیتری بسته‌بندی شده و با پودر الکل پلی‌وینیل مهر و موم گردیده و جهت تعادل به صورت افقی قرار گرفتند. سپس از دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به یخچال با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند تا پایوت‌ها خنک شده و ٤ ساعت در آن دما برای رسیدن به دمای تعادل نگهداری شدند. پایوت‌ها داخل راک‌های انجماد (در ٤ سانتی متری بالای نیتروژن مایع) به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و بعد از آن به صورت غوطه‌ور در نیتروژن مایع ذخیره شدند. یک ماه بعد از انجماد، از هر گروه ۵ پایوت به صورت تصادفی انتخاب شده و برای رفع انجماد در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه قرار داده شدند.

تحرک اسپرم پس از یخ‌گشایی

یک قطره اسپرم ذوب شده، روی یک لام قبلا گرم شده گذاشته و با یک لامل پوشانده شد. درصد تحرک و دیگر خصوصیات اسپرم زیر میکروسکوپ (×٤۰) تعیین شد. میانگین سه مشاهده به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شد.

درصد حیات اسپرم (Sperm viability)

۲۰ میکرو لیتر از منی منجمد-ذوب شده روی یک اسلایدی که قبلا گرم شده قرار داده شد و با ۱۰۰ میکرولیتر ترکیب رنگ‌آمیزی سوپراویتال (ائوزین B- نیگروزین) مخلوط شده و یک گسترش از آن تهیه شد. بعداز خشک شدن در هوا، نمونه اسلاید زیر میکروسکوپ (×۱۰۰) مشاهده و ۲۰۰ اسپرماتوزوآ شمارش شد. رنگ‌گرفتگی سر اسپرم (به طور کامل یا جزئی) به معنی مرگ اسپرماتوزوآ است.

یکپارچگی آکروزوم (Acrosomal integrity)

۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه منجمد-ذوب شده در ۵۰ میکرولیتر سیترات فرمالدئید ۱٪ در ۲/۹ ٪ (W/V) سیترات تری ـ سدیم دی‌هیدرات فیکس شد. ۲۰۰ اسپرماتوزوآ زیر میکروسکوپ (×۱۰۰) برای کلاهک سر اسپرم (آکروزوم) نرمال آن‌ها شمارش شد. ناهنجاری‌هایی شبیه نبود آکروزوم، آکروزوم موج‌دار و یا آکروزوم متورم شمارش شد.

آنالیز آماری

داده‌های حاصله ابتدا وارد نرم افزار اکسل شدند و تجزیه تحلیل آماری آن‌ها نیز به روش تجزیه واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ١٦ انجام شد. جهت مقایسه‌ی میانگین بین تیمارهای آزمایش و شاهد از آزمون دانکن و برای بررسی همبستگی بین مقادیر فراسنجه‌های مورد مطالعه از روش پیرسون استفاده گردید. داده‌ها در سطح

احتمال ۵ درصد (P≤۰/۰۵) معنی دار تلقی شده و تمامی نتایج نیز به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

نتایج

درصد تحرک پیشرونده اسپرم‌ها در تیمارها پس از رفع انجماد در جدول ۱ خلاصه شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود درصد تحرک پیشرونده اسپرم‌ها در تیمار حاوی ۲۵ میلی‌مول گلوتامین نسبت به گروه‌های آزمایش و شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد (P≤۰/۰۵).

نتایج بیانگر این نکته می‌باشند که افزایش مقادیر آنتی‌اکسیدان‌ها بیش از ۲۵ میلی‌مول گلوتامین تأثیر کمتری بر درصد تحرک اسپرم دارد (P≤ ۰/۰۵). از طرفی مابین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد از نظر درصد سلامت آکروزوم تفاوت معنی‌دار ملاحظه نشد.

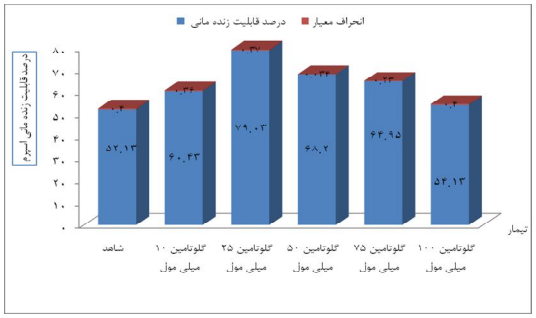
جدول ۱- درصد تحرک پیشرونده و سلامت آکروزومی اسپرم بر اساس سطوح تیمار آنتی‌اکسیدان گلوتامین

تیمار	تعداد نمونه	درصد تحرک اسپرم (انحراف معیار ± میانگین)	درصد سلامت آکروزوم (انحراف معیار ± میانگین)
شاهد	٤	٤٥/٠٨ ± ٠/١١^{f}	٦٨/٦٣ ± ٠/٠٩
گلوتامین ۱۰ میلی‌مول	٤	٥٤/٣٢ ± ٠/٣٧^{d}	٦٨/٥٧ ± ٠/١٤
گلوتامین ۲۵ میلی‌مول	٤	٦٣/٩٧ ± ٠/١٦^{a}	٦٨/٤٨ ± ٠/٣٠
گلوتامین ۵۰ میلی‌مول	٤	٦٢/٦٨ ± ٠/١٧^{b}	٦٨/٥٣ ± ٠/٣٠
گلوتامین ۷۵ میلی‌مول	٤	٥٨/٦٢ ± ٠/٢٥^{c}	٦٨/٦٣ ± ٠/٢١
گلوتامین ۱۰۰ میلی‌مول	٤	٤٨/٢٨ ± ٠/١١^{e}	٦٨/٥٧ ± ٠/٨٦
P		٠/٠٥	٠/٩^{ns}

a-f تفاوت مابین ردیف‌ها در هر ستون معنی‌دار می‌باشد (P≤۰/۰۵).

ns اختلاف معنی‌دارر وجود ندارد (P>۰/۰۵).

همان‌طور که در نمودار ۱ ملاحظه می‌شود تیمار حاوی ۲۵ میلی‌مول گلوتامین بالاترین درصد زنده‌مانی اسپرم پس از رفع انجماد را نسبت به گروه کنترل و گروه‌های آزمایشی دیگرنشان داد (P ≤ ۰/۰۵). مابین تیمارهای آزمایشی نیز رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول گلوتامین پایین‌ترین میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها را نشان داد (P ≤ ۰/۰۵).



نمودار ۱- درصد حیات اسپرم‌ها براساس سطوح مختلف گلوتامین

بحث

در مطالعه حاضر، افزودن سطوح مناسب اسیدآمینه گلوتامین به رقیق کننده‌ی تریس- زرده تخم مرغ قبل از انجماد، موجب بهبود قابل توجه در ویژگی‌های کیفیت اسپرم مانند حرکت رو به جلو و درصد حیات اسپرم نسبت به گروه شاهد گردید اما تفاوت معنی‌دار در درصد سلامت آکروزوم اسپرم بین تیمارهای آزمایش با گروه شاهد مشاهده نگردید. فرآیندهای انجماد و رفع انجماد در اثر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشای پلاسمایی، موجب ایجاد مولکول‌های فعال و رادیکال-های آزاد اکسیژن می‌شوند که تحرک بعد از رفع انجماد، قابلیت زنده‌مانی، فعالیت آنزیمی درون‌سلولی، باروری و عملکرد اسپرم را مختل می‌کند (۲۱و ۲).

اسیدآمینه گلوتامین در طول غشای اسپرم پخش شده و با فسفولیپیدهای موجود در غشای پلاسمایی ترکیب می‌شود که در نهایت منجر به مقاومت بیش‌تر اسپرم در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد و رفع انجماد می‌شود (۱۱). نتایج حاصل از این تحقیق در خصوص افزایش درصد تحرک اسپرم‌ها پس از رفع انجماد با دیگر نتایج گزارش شده در مورد تأثیر مواد آنتی-اکسیدان مختلف بر اسپرم گوسفند، خرگوش و گراز همخوانی و تطابق دارد (۷و ٦، ٤). مشاهده شده است که افزودن آمینواسید سولفونیک به رقیق‌کننده منی قبل از انجماد، باعث توقف پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم‌ها شده و کیفیت فراسنجه‌های منی را بعد از رفع انجماد بهبود می‌بخشد (۱۰). افزودن آنتی‌اکسیدان‌هایی از قبیل تائورین، هیپوتائورین، گلوتامین، سیستئین، آلبومین سرم گاوی، تره‌هالوز و هیالورونان به رقیق کننده قبل از انجماد باعث تاثیر مثبت بر درصد تحرک اسپرم، مورفولوژی اسپرم، درصد قابلیت زنده‌مانی اسپرم و محافظت فراسنجه‌های منی پس از رفع انجماد می‌گردد (۲۰).

در مطالعه Chen و همکاران (۱۹۹۳) ملاحظه شد، افزودن اسیدهای آمینه انتخابی (گلوتامین، گلایسین، آلانین و سیستئن) به رقیق کننده (تریس، سیترات، فروکتوز و گلیسرول) منی گاومیش قبل از انجماد، باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی منی گاومیش بعد از رفع انجماد می‌گردد (۹). تحرک اسپرم با افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده، بطور چشمگیری افزایش می‌یابد (۲۲و ۱۹، ۱۸، ۸)، البته نتایج مطالعه حاضر در مورد وضعیت آکروزوم مغایر نتایج مطالعات ذکر شده بود که می‌تواند به‌دلیل تفاوت در نوع رقیق‌کننده باشد.

در کل می‌توان نتیجه گرفت که افزودن مقادیر مناسب گلوتامین به رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ سبب بهبود برخی از شاخص‌های کیفی اسپرم گاومیش می‌گردد.

REFERENCES

1. Agarwal, A., Saleh, R. A. (2002): Role of Antioxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urol. Clin. North Am. 29(4):817–827.
2. Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J. P., Milne, P., Jennigs, Z., Irvine, D. S. (1998): Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol. Reprod. 59(2): 1037–1046.
3. Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J. P., Milne, P., Jennigs, Z., Irvine, D. S. (1998): Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol. Reprod. 59(2):1037–1046.
4. Alvarez, J. G., Storey, B.T. (2005): Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. Mol. Reprod. Dev. 42(3): 334–346.
5. Atessahin, A., Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Kızıl, M. (2008): Effects of anti-oxidantadditives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze–thawing process. Small Rum. Res. 77(1): 38–44.
6. Bandyopadhyay, A.K., Ray, P.R., Ghatak, P.K. (2003): Effective utilization of buffalo milf for manufacturing dairy products, 4th Asian Buffalo congress Lead Papers; 191.

7. Bucak, M.N., Atessahin, A., Varıslı, O., Yuce, A., Tekin, N., Akcay, A. (2007): The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after the freeze–thawing process. Theriogenology. 67(5): 1060–1067.
8. Bucak, M.N., Atessahin, A., Yuce, A. (2008): Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process, Small Rum. Res. 75(2): 128–134.
9. Chen, Y., Foote, R.H., Brockett, C.C. (1993): Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. Cryobiology. 30(4): 423–431.
10. El-Sheshtawy, R.I., El-Sisy, G.A., El-Nattat, W.S. (2008): Use of selected amino acide to improve buffalo bull semen cryopreservation. Global Veterinaria. 2(4):146-150.
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(1-2): 13–23.
12. Gadella, B.M., Gadella, N.G., Miller, B., Colenbrander, L.M., Golde, V., Harrison, R.A. (1999): Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. Mol. Reprod. Dev. 53(3): 108–125.
13. Ingawale, M.V., Dhoble, R.L. (2004): Buffalo Reproduction in India: an Overview. Buffalo Bulletin. 23(1): 4-9.
14. Khlifaoui, M., Battut, I., Bruyas, J. F., Chatagnon, G., Trimeche, A., Tainturier, D. (2005): Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. Theriogenology. 63(1): 138–149.
15. Kundu, C. N., Das, K., Majumder, G.C. (2001): Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. Cryobiology. 42(1): 21–27.
16. Lapointe, J., Bilodeau, J. F. (2003): Antioxidants defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. Biol. Reprod. 68(4):1157–1164.
17. Li, Y., Si, X.W., Zhang, A., Dinnyes, A., Ji, W. (2003): Effect of amino acids on cryopreservation of cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) sperm. Am. J. Primatol. 59(4): 159–165.
18. Noguchi, S., Matsumoto, J.J. (1971): Studies on the control of the denaturation of the fish muscle proteins during frozen storage. II. Preventing effect of amino acids and related compounds. Bull Jpn. Soc. Sci. Fish. 37(2): 1115–1122.
19. Pena, A.I., Barrio, F., Quintela, L.A., Herradon, P.G. (1998): Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. Reprod. Domest. Anim. 33(1): 5–9.
20. Sanchez, P.L.G., Setchell, B.P., Maxwell, W.M.C. (1997): Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen semen of ram spermatozoa. Reprod. Fertil. Dev. 9(7): 689–696.
21. Uysal, O., Bucak, M.N., Yavas, I., Varıslı, O. (2007): Effect of various antioxidants on the quality of frozen–thawed bull semen. J. Anim. Vet. Adv. 6(2): 1362–1366.
22. Zhao, Y., Buhr, M.M. (1995): Cryopreservation extenders affect calcium flux in bovine spermatozoa during a temperature challenge. J. Androl. 16(3): 278–285.