فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۲۰، جلد ۶، شماره ۱، زمستان ۹۱، صفحه ۱۹ تا ۲۸

ارزیابی اثر آنتی اکسیدان نفوذ پذیر سلولی در محیط رقیق سازی سیمن بر روی پارامترهای تحرک و یکپارچگی غشائ سلولی اسپرم بز در حالت ذخیره مایع

عبداله ابید[۱]، محسن فروزانفر[۲]، سید مرتضی حسینی[۳]، مهدی حاجیان[۳]، **محمد حسین نصر اصفهانی [۳]**

۱–دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، کارشناس ارشد گروه زیست شناسی، فارس. ایران.

۲–دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرودشت، استادیارگروه زیست شناسی، مرودشت. ایران.

۳–پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران.

mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

تاریخ دریافت:۹۱/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش:۹۱/۱۲/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: این تحقیق به منظور ارزیابی اثرات غنی سازی محیط نگه‌دارنده سیمن با آنتی اکسیدان MnTE بر روی تحرک و یکپارچگی غشائ سلولی اسپرم بز در حالت ذخیره مایع صورت پذیرفت.

روش کار: نمونه‌های سیمن با استفاده از واژن مصنوعی از ۳ رأس بزبالغ جمع‌آوری گردید. رقیق سازی با محیط نگه‌دارنده فاقد (کنترل) و گروه‌های تیماری دارنده غلظت های ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میکرو مول از آنتی‌اکسیدان MnTE انجام شد. نمونه‌های سیمن تا دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سرد شدند و سپس پارامترهای تحرک و یکپارچگی غشائ سلولی اسپرم در طول دوره‌های زمانی ۰، ۱۲، ۲٤، ۳٦، ٤۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد.

یافته ها: به طور کلی با افزایش زمان نگه‌داری اسپرم رقیق‌سازی شده از ساعت صفر تا ساعت ۷۲ ، میانگین درصد تحرک و یکپارچگی ساختاری غشائ سلولی اسپرم بز یک روند نزولی را در تمام گروه‌های غنی سازی شده با آنتی‌اکسیدان و گروه کنترل نشان داد. به نظر می‌رسد که غنی سازی محیط نگه‌داری سیمن با غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۱ میکرو مول از MnTE، در تمام ساعات نتایج بهتری را به دنبال داشته در حالی که غنی‌سازی با غلظت ۱ میکرومول از MnTE موجب کاهش معنی‌دار درصد تحرک اسپرم و کاهش غیر معنی‌دار درصد یکپارچگی غشائ سلولی اسپرم در مقایسه با گروه کنترل در تمام ساعات شده است.

نتیجه گیری: محیط نگه‌دارنده سیمن بز که با MnTE غنی سازی شده، می تواند اثر استرس اکسیداتیو را کاهش دهد. با این حال غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۱ میکرو مول MnTE می‌توانند تحرک و یکپارچگی ساختاری غشائ سلولی اسپرم بز را در طی یک دوره زمانی حد اکثر تا ۷۲ ساعت بهتر حفاظت نمایند. به نظر می‌رسد غلظت ۱ میکرو مولMnTE نه تنها اثرات مثبتی را بر پارامترهای اسپرمی به دنبال نداشت بلکه منجر به کاهش تحرک و یکپارچگی ساختار غشای پلاسمایی اسپرم در تمام ساعات بررسی شده گردید.

واژه های کلیدی: اسپرم بز، آنتی اکسیدان، MnTE، رادیکال آزاد، گونه‌های واکنش‌دار اکسیژن.

مقدمه

فناوری تلقیح مصنوعی به دلیل توانایی در پراکنش ژن‌های نرهای انتخابی و برتر، به عنوان موثرترین روش جهت بهبود ژنتیکی و گسترش حیوانات مزرعه ای مورد توجه می‌باشد(۱۸،۱۷). این تکنیک امروزه به طور معمول در تمام گاوداری‌های صنعتی و در بعضی از گاوداری-های نیمه صنعتی در کشورمان با استفاده از اسپرم‌های منجمد شده داخلی و یا خارجی انجام می‌شود. با این حال در کشور ما، تلقیح مصنوعی در بز به عنوان یک گونه با ارزش به ویژه از نظر تولید شیر و تا حدی تولید گوشت، در دامداری‌ها مرسوم نبوده که از دلایل آن می‌توان به عدم دسترسی به اسپرم، رایج نبودن این تکنیک به واسطه کمبود متخصص و عدم تمایل دامداران اشاره نمود. اولین مرحله در استفاده از تکنیک تلقیح مصنوعی انتخاب نرهای باخصوصیات ژنتیکی برتر و جمع‌آوری اسپرم آن‌ها می‌باشد. پس از جمع آوری نمونه های سیمن از نرهای با خصوصیات ژنتیکی برتر، مرحله بعد، نگه-

داری این سیمن با ارزش به منظور تلقیح مصنوعی در شرایط خاص است(۲۶، ۱۸). عموماً روش‌های نگه‌داری اسپرم را می توان به دو دسته تقسیم نمود:

روش اول شامل نگه‌داری سیمن در حالت مایع (liquid storage) می‌باشد. طی این روش دمای سیمن رقیق سازی شده با محیط های خاص، به منظور کاهش متابولیسم اسپرم تا دمای یک الی ۵ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد.

روش دوم یا حفظ انجمادی(cryopreservartion) می‌باشد که طی آن به منظور توقف کامل متابولیسم اسپرم، دمای سیمن رقیق سازی شده با محیط‌های انجماد، تا دمای زیر نقطه انجماد و عموماً در ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد)کاهش داده می‌شود(۳۱). بدیهی است که در روش حفظ انجمادی سیمن، مدت زمان بسیار طولانی می‌توان سیمن منجمد را نگه‌داری کرد و پس از خارج کردن آن از ازت مایع طی فرآیند ذوب سیمن (thawing) و برگشت به حالت طبیعی می‌توان از اسپرم استفاده نمود. با این حال فرآیندهای انجماد- ذوب با اعمال آسیب های فیزیکی و بیوشیمیایی و عملکردی به اسپرم، موجب کاهش تحرک، یکپارچگی غشائ سلولی و زنده‌مانی شده که در نهایت منجر به مرگ اسپرم و یا کاهش توانایی لقاح اسپرم در جمعیت‌هایی که زنده مانده‌اند می‌گردد. این آسیب‌ها که اصولاً غشاهای اسپرم، اسکلت سلولی، ارگانل‌ها و هسته را تحت تاثیر قرار می‌دهند هنوز به عنوان مانع اصلی به کارگیری تکنیک حفظ انجمادی سیمن محسوب می‌شوند(۱۵، ۱۳، ۹، ۳). بنابراین در مواقعی که نیاز باشد سیمن فقط به مدت کوتاهی (۲ تا ۴ روز) نگه‌داری و استفاده شود، می توان روش نگه‌داری در حالت مایع که آسیب‌های کمتری را به ساختار اسپرم وارد می سازد را جایگزین روش حفظ انجمادی نمود (۳۱، ۹). علی رغم این‌که فرآیندهای حفظ انجمادی اسپرم و نگه‌داری در حالت مایع در پیشبرد فناوری تلقیح مصنوعی روشی ارزشمند محسوب می‌شوند، با این حال در خلال این فرآیند ها صدماتی ایجاد می‌شود که بر ساختار و عملکرد سلول‌ها تأثیرات منفی بر جای می‌گذارند و بهینه سازی این روش‌ها می‌تواند گام مهمی در جهت استفاده از فناوری تلقیح مصنوعی در حیوانات مزرعه‌ای شود(۳۴، ۳). عموماً اسپرمی که به منظور نگه‌داری کوتاه مدت در دمای ۴ تا ۵ سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شود به شدت تحت تاثیر محیطی که برای رقیق سازی سیمن استفاده شده قرار می‌گیرد و با گذشت زمان یک کاهش تدریجی در تحرک، یکپارچگی غشای سلولی اسپرم و در نهایت در توان باروری اسپرم رخ می دهد(۳۴، ۲۶، ۱۶). یکی ازعوامل آسیب‌رسان به اسپرم در خلال فرآیندهای نگه‌داری سیمن در حالت مایع، تولید گونه‌های واکنش‌دار اکسیژن (ROS) بوده که توسط اکسیژن و اکسیدان‌های ناشی از اکسیژن القا شده و باعث افزایش میزان صدمات سلولی و استرس اکسیداتیو می‌شوند(۳۵، ۲۷، ۲). ROS که محصول طبیعی متابولیسم سلول ها در شرایط هوازی می‌باشند، مولکول‌های فعال شیمیایی دارای اکسیژن بوده که به علت وجود الکترون‌های جفت نشده بسیار واکنش پذیر می‌باشند و به دلیل واکنش‌پذیری بسیار بالا، به راحتی می‌تواند با دیگر مولکول‌ها واکنش یابد. زمانی که این ترکیبات الکترون منفرد خود را به ساختارهای سلولی مجاور انتقال می‌دهند موجب اکسیداسیون لیپیدهای غشائ سلولی، اسیدهای آمینه پروتئین‌ها یا اسیدهای نوکلئیک می‌شوند که در نهایت منجر به کاهش قدرت زنده‌مانی، کاهش تحرک و درنتیجه کاهش توان باروری اسپرم در اثر ایجاد استرس اکسیداتیو دراسپرم شوند(۳۵، ۱۴). در واقع استرس اکسیداتیو شرایطی است که در نتیجه‌عدم تعادل بین تولید ROS و ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول ایجاد می‌شود و منجر به تولید انواع رادیکال‌های آزاد شامل آنیون سوپراکسید، رادیکال-

هیدروکسیل و مشتقات غیر رادیکالی از اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن می‌شود (۲۷، ۲). در شرایط استرس اکسیداتیو تغییرات ساختاری و عملکردی به اسپرم ایجاد شده و نهایتاً کاهش توان باروری و یا مرگ اسپرم را به دنبال خواهد داشت(۲۳، ۲۲، ۱۳، ۱۰). هر چند که سلول-های سوماتیک در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی بدن عموماً مجهز به سیستم آنتی‌اکسیدانی کافی جهت مقابله با اکسیدان‌ها از جمله ROS می‌باشند، این وضعیت در اسپرم به علت ناچیز بودن نسبت سیتوپلاسم به هسته، متعادل نبوده و تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌آکسیدان‌ها وجود ندارد و در نتیجه مستعد آسیب های گوناگون می-گردد(۲۳، ۲۲). به عبارت دیگر هر چند اسپرم مجهز به سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل آنتی اکسیدان‌های آنزیمی نظیر گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی نظیر ویتامین C و D می‌باشد و مایع سیمن نیز محتوی بعضی از آنتی‌اکسیدان‌ها نظیر ویتامین C و D، اسید اوریک، آلبومین و سایر پروتئین‌ها، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون و سایر ترکیبات تیولی، تورین و هیپوتورین می‌باشد (۲۳، ۲۲، ۱۳، ۱۰)، اما رقیق سازی سیمن با رقیق کننده‌ها که در گونه های مختلف با نسبت‌های متفاوتی انجام می‌شود، موجب کاهش غلظت آنتی‌اکسیدان‌های موجود در پلاسما در واحد حجم می-شود. هم‌چنین ثابت شده که پردازش سیمن به منظور آماده سازی با هدف تلقیح مصنوعی و لقاح در شرایط آزمایشگاهی، از جمله قرار گرفتن در معرض اکسیژن هوا، سانتریفوژ وغیره موجب افزایش میزان ROS می-گردد(۲۷). بنابراین اسپرم با کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها در طی نگه‌داری در حالت مایع مواجه است (۱۹). بنابراین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم و سمینال پلاسما در طی فرآیند نگه‌داری در حالت مایع سیمن برای محافظت از اسپرم در برابر آسیب‌های ایجاد شده توسط رادیکال-های آزاد کافی نمی‌باشد و مرگ سلول اسپرم و از دست دادن عملکرد سلولی در شرایط نگه‌داری سیمن در وضعیت منجمد نشده تا حدودی می‌تواند در نتیجه اثرات استرس اکسیداتیو باشد. روش‌های جدید بهینه سازی محلول‌های نگه‌داری سیمن شامل افزودن آنتی اکسیدان-ها به این محیط‌ها، به عنوان یکی از راهکارهای کاهش استرس اکسیداتیو در طی فرآیند نگه‌داری در حالت مایع سیمن در گونه‌های مختلف مطرح است (۳۵، ۲۷، ۱). به همین علت جهت بالا بردن سطوح حفاظتی اسپرم تلاش-هایی انجام شده است تا مواد نگه‌دارنده اسپرم را با افزودن آنتی‌اکسیدان های مناسب تعدیل و تقویت کنند و استرس‌های اکسیداتیوی ایجاد شده را در خلال فرآیند نگه‌داری در حالت مایع و حفظ انجمادی کاهش دهند. در حال حاضر شمار متعددی از آنتی‌اکسیدان‌ها در محیط های نگه‌دارنده سیمن برخی از گونه‌های اهلی (قوچ، گاو، بز، اسب، گراز، سگ، انسان) آزمایش شده تا صدمات حاصل از فرآیندهای ناشی از استرس اکسیداتیو را به حداقل برسانند (۲۱،۲۴،۸،۲۰،۶،۷). متالوپورفیرین‌ها ترکیباتی هستند که دارای یک حلقه پورفیرین در ساختار شیمیایی خود می‌باشند. (MnTE) Manganese (III) tetrakis(N- methylpyridinium 4-yl) porphyrin نوعی متالوپورفیرین حاوی فلز منگنز می‌باشد. این آنتی-اکسیدان به راحتی به سلول‌های زنده نفوذ کرده و با زنجیره انتقال الکترون احیا می‌گردد و به طور بالقوه به عنوان از بین برنده ROS عمل می‌نماید(۳۰، ۲۹، ۲۸، ۱۲). بنابراین می‌تواند زنجیره اکسیداسیون را در غشائ با مصرف رادیکال‌های آزاد مانند پروکسی نیتریت، سوپر اکسید و کربنات بشکند و عملی مشابه با سوپر اکسید دیسموتاز را تقلید نماید. ثابت شده که این آنتی‌اکسیدان ۱۶ بار در کاهش دادن استرس اکسیداتیو در مقایسه با دیگر پورفیرین های منگنز مانند Manganese (III) meso-tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP) مستعدتر است(۲۱،۴). با توجه به

خصوصیات منحصر به فرد این ترکیب به عنوان یک آنتی‌اکسیدان نفوذپذیر سلولی، احتمالاً افزودن این آنتی-اکسیدان در غلظت بهینه به محیط نگه‌داری اسپرم بتواند تا حد قابل ملاحظه ای در نگه‌داری بهتر اسپرم در حالت مایع مؤثر واقع گردد.

این تحقیق برای اولین بار با هدف ارزیابی توانایی آنتی‌اکسیدانی MnTE در محیط تجاری BIOXcell در جهت کاهش اثرات استرس اکسیداتیو، بر روی پارامترهای تحرک و یکپارچگی غشائ پلاسمایی اسپرم بز در حالت نگهداری در حالت مایع در طول دوره زمانی صفر، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

رقیق کننده

در تحقیق حاضر از رقیق کننده تجاری BIOXcell (Bioxcell, IMV, Aigle France, Code:016218) که به عنوان محیط انجماد سیمن نیز در بعضی از گونه‌های پستانداران به کار برده شده است، استفاده شد. به منظور کاهش اثرات استرس اکسیداتیو در طی دوره نگه‌داری سیمن در حالت مایع، غلظت های یک صدم، یک دهم و یک میکرومول از آنتی‌اکسیدان MnTE به محیط رقیق کننده اضافه گردید و با محیط فاقد آنتی اکسیدان(گروه کنترل) مقایسه شد(جهت اختصار به ترتیب به صورت MnTE 0.01 µM ، MnTE0.1µM و MnTE1µM نشان داده شده است).

جمع آوری سیمن

نمونه های سیمن از ۳ رأس بز بالغ (۲تا ۳ سال) به صورت هفته‌ای دو بار، با استفاده از واژن مصنوعی در طی فصل تولید مثل جمع آوری شد.

پردازش سیمن

بلافاصله پس از انزال، لوله های حاوی سیمن هر بز به طور جداگانه در ظرف محتوی۱۰۰ سی سی آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در زمان کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. در صورت دارا بودن معیارهایی از جمله حجم بین ۰/۷۵–۱/۵ میلی لیتر، غلظت ۲×۱۰^{۹} اسپرم در هر میلی لیتر، تحرک بیش از ۷۵ درصد و مورفولوژی کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیر طبیعی در هر انزال به عنوان سیمن نرمال در نظر گرفته شد و در غیر این صورت سیمن جمع آوری شده حذف گردید. به منظور حذف اثرات فردی، نمونه های سیمن به نسبت مساوی با یک‌دیگر مخلوط شدند و به ۴ قسمت مساوی (۳ گروه تیماری + گروه کنترل) تقسیم گردید. سپس رقیق سازی سیمن با محیط نگه‌دارنده فوق به نسبت ۱ حجم سیمن و ۲۰ حجم محیط انجماد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از رقیق سازی درصد تحرک و هم‌چنین درصد یکپارچگی ساختاری غشائ سلولی در گروه های تیماری و گروه کنترل ثبت گردید (زمان صفر). سپس ظروف محتوی سیمن در گروه های مختلف به تدریج تا دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سرد شدند و در فواصل زمان۰، ۱۲ ،۲۴، ۳۶ ، ۴۲ و ۷۲ ساعت، درصد تحرک و یکپارچگی غشائ سلولی در گروه های مختلف ثبت گردید.

ارزیابی تحرک اسپرم

درصد تحرک اسپرم بز در تمام گروه‌ها در طی دوره های زمانی فوق با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) مجهز به صفحه گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) ارزیابی گردید. بدین منظور حدود ۱۰ میکرولیتر از نمونه یکنواخت شده بر روی لام قرار داده شد و روی آن با لامل پوشانده شد. در هر لام با بررسی ۵ میدان دید مختلف، تحرک اسپرم ها تخمین زده شد.

ارزیابی یکپارچگی و سلامت غشائ پلاسمایی اسپرم – تست هاست (Hypo osmotic Swelling Test-HOST)

در این تحقیق به منظور ارزیابی یکپارچگی و سلامت غشائ پلاسمایی اسپرم بز از تست HOST بر اساس روش Revell و Marode استفاده شد (۲۵). این تست بر اساس

واکنش دم اسپرم پس از قرار گرفتن در محیط هیپواسموتیک (محلول ۱۰۰ میلی اسمولار در لیتر است شامل: ۸/۷۲ گرم در لیتر فروکتوز و ۴/۷۴ گرم در لیتر سیترات سدیم) انجام می‌شود. بدین صورت که اسپرم هایی با دم خمیده و یا حلقه شده بیان‌گر غشائ پلاسمایی سالم و اسپرم‌هایی با دم شمشیری، مواج یا شکسته بدون خمیدگی و حلقه شدگی بیان‌گر غشائ پلاسمایی تخریب شده در طی فرآیند نگه‌داری اسپرم می‌باشند. برای انجام این تست ۲۵ میکرولیتر از سیمن هر یک از گروه‌ها به ۲۰۰ میکرولیتر از محلول‌هاست اضافه شد. سپس سوسپانسیون اسپرمی یکنواخت و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق(۲۰ الی ۲۲ درجه سانتی‌گراد) به منظور انجام واکنش انکوبه شد. سپس یک قطره از سوسپانسیون اسپرم و محلول هیپواسموتیک را روی لام قرار داده و با یک لامل آن را پوشانده و توسط میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین عکاسی (Olympus DP 72 - Japan) حد اقل ۱۰ میدان دید میکروسکوپی عکاسی گردید. در عکس‌های هر یک از نمونه‌ها، حد اقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌هایی با دم خمیده و حلقه شده ثبت شد.

تجزیه و تحلیل آماری

مقایسه بین تیمارهای آنتی‌اکسیداتیو گروه کنترل بااستفاده ازآنالیزآماری one way ANOVA ونرم افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه درصد میانگین تیمارهای آنتی اکسیدانی با آزمون توکی انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از تاثیر غنی سازی محیط نگه‌داری سیمن با MnTE بر روی تحرک و یکپارچگی غشائ سلولی اسپرم بز در طی دوره زمانی ۰، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب در جدول ۱و ۲ نشان داده شده است. به طور کلی نگه‌داری سیمن در حالت مایع منجر به کاهش درصد تحرک و یکپارچگی غشائ سلولی اسپرم در تمام گروه ها به صورت وابسته به زمان می‌شود به طوری که با افزایش زمان نگه‌داری از ساعت صفر تا ساعت ۷۲، یک روند نزولی در پارامترهای فوق دیده شد. با این حال محیط رقیق سازی سیمن که با MnTE غنی سازی شده می‌تواند تا حدی منجر به حفظ تحرک و یکپارچگی غشائ سلول اسپرم بز در طی دوره زمانی آزمایش شده در تحقیق حاضر شود. از این دیدگاه درصد تحرک اسپرم در گروه‌های تیماری MnTE 0.1µM و MnTE 0.01µM در تمام ساعات در مقایسه با گروه کنترل بهتر حفظ شده که این تفاوت از نظر آماری معنی دار می‌باشد. با این حال در گروه تیماری MnTE1µM، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون کاهش معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. این در حالی است که از نظر یکپارچگی غشائ سلولی اسپرم، گروه تیماری MnTE 1µM در ساعات ۴۸و ۷۲ کاهش معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. هر چند در گروه‌های تیماری MnTE 0.1µM وMnTE0.01µM بهبود در صد یکپارچگی غشای از نظر آماری در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود.

بحث و نتیجه گیری

یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی که عملکرد اسپرم را پس از انزال در شرایط نگهداری آزمایشگاهی تحت تاثیر قرار می‌دهد، محیط سوسپانسیون سیمن و دمایی است که در آن دما سیمن بعد از رقیق سازی نگه‌داری می‌شود، به نظر می‌رسد جهت نگه‌داری اسپرم باید متابولیسم آن را کاهش داد که یکی از بهترین راه‌ها، کاهش دمای سوسپانسیون اسپرم است. به طور کلی اسپرم گونه‌های مختلف پستانداران به شوک سرمایی(cold shock) بسیار حساس می‌باشند و یکی از دلایل کاهش پارامترهای مختلف اسپرم در شرایط نگه‌داری آزمایشگاهی، ایجاد

جدول۱- تاثیر غنی سازی محیط نگه‌داری سیمن با آنتی اکسیدان MnTE بر روی درصد تحرک اسپرم بز در طی دوره زمانی ۰، ۱۲، ۲٤، ۳٦، ٤۸ و ۷۲ ساعت در حالت ذخیره در شرایط مایع (دمای ۵ درجه سانتی‌گراد) . میانگین های دارای حروف متفاوت در هر ستون بیان‌گر اختلاف معنی دار در سطح p< ۰/۰۵ می باشد.

گروه	درصد تحرک اسپرم در ساعات انکوباسیون					
	۰	۱۲	۲٤	۳٦	٤۸	۷۲
کنترل	۷۸/۴۰ ±۰/۵۰	^{a}۵۴/۷۷±۱/۱۶	^{a}۳۷/۰۴±۰/۵۳	^{a}۳۵/۶۸±۰/۶۸	^{b}۳۱/۵۹±۰/۵۰	^{b}۲۹/۳۱±۰/۵۹
MnTE 0.01µM	۸۰/۲۱±۰/۳۸	^{b}۵۹/۱۳±۰/۴۰	^{c}۴۳/۲۶±۰/۸۰	^{b}۳۹/۷۸±۱/۰۱	^{c}۳۵/۸۶±۱/۰۲	^{c}۳۳/۹۱±۱/۴۰
Mn TE 0.1µM	۸۰/۰۰ ±۰/۳۸	^{b}۵۸/۳۳±۰/۵۷	^{bc}۴۲/۰۸±۰/۷۹	^{b}۳۹/۳۷±۱/۰۵	^{c}۳۶/۶۶±۰/۴۹	^{bc}۳۳/۱۲±۰/۵۰
MnTE 1µM	۷۸/۸۶±۰/۴۵	^{a}۵۴/۳۱±۰/۹۴	^{ab}۳۹/۰۹±۱/۰۲	^{ab}۳۶/۳۶±۱/۰۴	^{a}۲۲/۹۵±۰/۵۳	^{a}۴/۰۹±۱/۴۹

جدول۲- تاثیر غنی سازی محیط نگه‌داری سیمن با آنتی اکسیدان MnTE بر روی یکپارچگی غشائ سلولی اسپرم بز در طی دوره زمانی ۰، ۱۲، ۲٤، ۳٦، ٤۸ و ۷۲ ساعت در حالت ذخیره در شرایط مایع (دمای ۵ درجه سانتی‌گراد). میانگین های دارای حروف متفاوت در هر ستون بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح p< ۰/۰۵ می باشد.

گروه	درصد حفظ یکپارچگی غشائ سلولی اسپرم در ساعات انکوباسیون					
	۰	۱۲	۲٤	۳٦	٤۸	۷۲
کنترل	۵۳/۶۸±۰/۹۷	۳۷/۸۶±۲/۷۰	۳۴/۸۰ ±۰/۹۴	^{b}۳۰/۸۴±۱/۶۲	^{b}۳۰/۸۴±۱/۶۲	^{b}۳۰/۳۶±۱/۳۲
MnTE 0.01µM	۵۸/۲۹±۲/۶۳	۴۲/۷۸±۱/۲۶	۳۸/۶۹±۱/۴۰	^{b}۳۵/۱۱±۲/۳۴	^{b}۳۵/۱۱±۲/۳۴	^{b}۳۱/۴۴±۱/۵۰
Mn TE 0.1µM	۵۸/۵۱±۲/۴۷	۴۳/۵۱±۱/۷۸	۴۰/۲۰±۲/۲۲	^{b}۳۵/۷۶±۱/۲۴	^{b}۳۵/۷۶±۱/۲۴	^{b}۳۳/۳۸±۱/۹۷
MnTE 1µM	۵۴/۲۱±۲/۰۵	۳۹/۴۶±۲/۵۷	۳۶/۲۱±۱/۳۲	^{a}۲۲/۵۳±۱/۳۷	^{a}۲۲/۵۳±۱/۳۷	^{a}۵/۹۱±۱/۸۷

شوک سرمایی است و زمانی ایجاد می‌شود که دمای اسپرم پس از انزال، از دمای طبیعی بدن به سرعت به زیر دمای ۱۵ درجه سانتی گراد کاهش یابد(۳۱، ۹). نتایج تحقیقات در اسپرم گونه‌های مختلف نشان داد که شوک سرمایی ممکن است مربوط به ساختار لیپیدی غشائ سلولی باشد. از این نقطه نظر، هر یک از لیپیدهای غشایی دارای یک دمای مرحله گذر (transition phase) ویژه می‌باشند که در این دما از

حالت سیال به حالت جامد تغییر می‌کنند و عملکرد طبیعی خود را در غشائ سلولی از دست می‌دهند و یا به طور بهینه انجام نمی‌دهند، بنابراین در غشائ سلولی که متشکل از لیپیدهای مختلف است، مرحله گذر برای هر یک از لیپیدها در دماهای مختلفی صورت می‌گیرد. از آن‌جا که آرایش پروتئین‌های غشایی تا حدود زیادی وابسته به لیپیدهای غشایی احاطه کننده آن‌ها می‌باشد، بنابراین تغییر ساختار لیپیدی غشائ سلولی موجب می‌شود که پروتئین‌های غشایی به طور برگشت ناپذیر به صورت توده ای شده و عملکرد غشائ سلولی را تحت تاثیر قرار دهند و در نهایت منجر به مرگ و یا کاهش توانایی لقاح اسپرم نگه‌داری شده در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (۲۴، ۱۹، ۵). نشان داده شده که دمای سردسازی در محدوده کمتر از ۱۵ درجه سانتی-گراد بر پارامترهای اسپرم در طی حفظ انجمادی اثر می‌گذارد و موجب انتقال از فاز مایع به فاز ژل مانند می‌شود به طوری که زنده مانی اسپرم را به طور معنی داری کاهش می‌دهد(۱۳، ۹). یکی از دلایل کاهش درصد تحرک و یکپارچگی غشائ سلولی اسپرم بز در تحقیق حاضر که در تمام گروه‌های تیماری و کنترل مشاهده می‌شود، احتمالاً ناشی از فرآیند شوک سرمایی باشد. این میزان کاهش اجتناب ناپذیر بوده و معمولاً در تمام مطالعات مربوط به ذخیره اسپرم در حالت مایع دیده می‌شود. از طرف دیگر نشان داده شد که در طول فرآیند ذخیره سازی اسپرم در شرایط آزمایشگاهی، پراکسیداسیون لیپیدها ممکن است یکی از مکانیسم‌های مسئول تغییرات آسیب رسان فیزیکی یا شیمیایی در اسپرم باشد زیرا سلول‌های اسپرم سطح وسیعی از اسیدهای چرب غیر اشباع را در ساختار فسفولیپیدهای غشایی خود دارند که پراکسیداسیون آن‌ها در نهایت منجر به مرگ یا کاهش توانایی باروری اسپرم می-شود(۱۰، ۷، ۶). پراکسیداسیون لیپیدهای غشائ توسط ROS تشدید می‌گردد. هم‌چنین پردازش و آماده‌سازی سیمن به منظور تلقیح مصنوعی و یا لقاح آزمایشگاهی موجب افزایش میزان ROS می‌شود (۲۷). با توجه به این‌که حفاظت سلول‌های اسپرمی پستانداران در مقابل حملات اجتناب ناپذیر ROS به یک سیستم دفاعی شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی وابسته است، با این حال گزارش شده که در شرایط نگهداری اسپرم به حالت مایع سطوح آنتی‌اکسیدان سلول اسپرم کاهش می‌یابد که این امر مکانیسم دفاعی درون سلول اسپرم را در ارتباط با تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو ناکارآمد می‌کند(۶). این وضعیت را می توان به دو عامل ارتباط داد: ۱) سیتوپلاسم ناچیز اسپرم بالغ و در نتیجه کاهش آنتی‌اکسیدان‌های سیتوپلاسمی ۲) کاهش غلظت آنتی‌اکسیدان‌های موجود در مایع سیمن در اثر رقیق سازی(۱۱). از طرف دیگر پردازش سیمن به منظورآماده سازی برای تلقیح مصنوعی از جمله در معرض اکسیژن اتمسفر و نور محیط قرار گرفتن، سانتریفوژ و غیره موجب تولید ROS و ایجاد استرس اکسیداتیو در طی این فرآیند می‌شود(۲۷). این امکان وجود دارد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم و سمینال پلاسما برای محافظت از اسپرم در برابر آسیب-های ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد در شرایط نگه‌داری آزمایشگاهی کافی نباشد. گزارش شده که ROS می‌تواند روی غشائ اسپرم آسیب رسان باشد و موجب کاهش تحرک و بقاء اسپرم شده و به‌طور مستقیم به DNA اسپرم آسیب برساند و توان ادغام شدن غشائ اسپرم با اوسیت را از بین ببرد (۳۲). بنابراین غنی سازی محیط های نگه‌داری سیمن در حالت مایع با آنتی اکسیدان ها به عنوان یکی از راهکارهای کاهش استرس اکسیداتیو در طی فرآیند نگه‌داری سیمن به منظور انجام تلقیح مصنوعی، مطرح است (۳۵، ۲۷، ۱) و تحقیقات زیادی نیز در زمینه بهبود کیفیت محیط‌های

نگه‌داری در حالت مایع و هم‌چنین محیط های حفظ انجمادی سیمن، با افزودن آنتی‌اکسیدان‌های گوناگون انجام شده است (۸). برای مثال در یک مطالعه گزارش شد که تحرک و زنده مانی اسپرم اسب با افزودن ویتامین E به عنوان یک ماده آنتی اکسیدان به محیط نگه‌دارنده سیمن به هنگام سرد شدن، اثرات مثبتی را در بازه زمانی ۲۴ ساعت نشان می‌دهد(۱). گلوتاتیون مولکولی است که در سطوح میلی مولار در بعضی از سلول‌ها یافت شده است، این مولکول کوفاکتورگلوتاتیون پراکسیداز می‌باشد و قادر است هیدروژن پراکسیدهای سمی و دیگر پراکسیدازها را کاتالیز نماید. مطالعات نشان داد که این آنتی‌اکسیدان در غلظت ۵ میلی مولار دارای اثرات محافظ انجمادی بوده و منجر به افزایش حرکت، یکپارچگی ساختاری غشای پلاسمایی اسپرم قوچ می‌شود با این حال غلظت-های بالاتر از ۵ میلی مولار نه تنها اثرات مثبتی به دنبال نداشته بلکه بر عکس موجب کاهش پارامترهای اسپرمی نیز گردیده است(۲۱). در تحقیق حاضر نیز غلظت یک میکرو مول از MnTE موجب کاهش تحرک و یکپارچگی غشائ سلولی اسپرم گردید که منطبق با سایر تحقیقات در این زمینه است. در واقع نتایج بررسی‌های تحقیقاتی بر روی سیمن برخی از گونه‌ها نشان داده که افزودن غلظت‌های بهینه از آنتی-اکسیدان‌ها در محیط نگهدارنده سیمن، بر روی کیفیت اسپرم پس از فرآیند انجماد– ذوب تأثیرات مثبتی داشته و آن ها را بهبود بخشیده است. از طرف دیگر افزودن بعضی از آنتی‌اکسیدان‌ها نیز اثرات مثبتی را بر روی پارامترهای اسپرمی نشان نداده اند. در یک مطالعه ثابت شد که افزودن آسکوربیک اسید نمی‌تواند بقائ اسپرم-های اسب را در خلال ذخیره سازی در حالت مایع در بازه زمانی ۹۶ ساعت بهبود بخشد(۸). در مطالعه دیگری افزودن ویتامین E به محیط نگه‌دارنده اسپرم قوچ در شرایط نگه‌داری در دمای ۱۵ درجه سانتی-گراد، منجر به حفظ تحرک اسپرم در مقایسه با گروه کنترل نشد (۳۵). بنابراین به هنگام به کارگیری آنتی اکسیدان ها در طی فرآیند نگه‌داری سیمن در حالت مایع، صرف نظر از نوع آنتی اکسیدان، غلظت آنتی-اکسیدان مورد استفاده نیز باید طوری باشد که به ساختارهای سلولی اسپرم آسیب نرساند. MnTEمی تواند به راحتی به سلول های زنده نفوذ کند و به طور بالقوه به عنوان از بین برنده ROS عمل نماید. به همین علت قابلیت‌های منحصر به فرد این ترکیب می‌تواند دلیل انتخاب این آنتی اکسیدان در محیط نگه‌دارنده سیمن جهت حفظ سلول های اسپرمی درحالت مایع باشد(۳۰، ۲۹، ۲۸، ۱۲). نتایج حاصل از تحقیق حاضر به خوبی نشان داد که عملکرد افزودن MnTE به محیط نگه‌دارنده اسپرم به صورت وابسته به غلظت بوده و در غلظت بهینه می‌تواند منجر می‌تواند تا حد قابل ملاحظه ای منجر به حفظ تحرک، سلامت و یکپارچگی ساختاری غشای سلولی اسپرم بز در فواصل زمانی حد اکثر تا ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه فاقد آنتی اکسیدانی شود درحالی که غلظت های بالاتر از۱میکرومول MnTE اثرات مثبتی بر تحرک و یکپارچگی ساختاری غشای پلاسمایی نداشته و اثرات سمی روی سلول‌های اسپرم بر جای می‌گذارد. از این رو به نظر می‌آید که گروه‌های تیماری ۰/۰۱ و ۰/۱ میکرو مولMnTE، درصد بالاتری از تحرک و یکپارچگی ساختاری غشائ سلولی اسپرم را در طی فواصل زمانی صفر تا ۷۲ ساعت حفظ کرده و بنابراین برای لقاح آزمایشگاهی و یا تلقیح مصنوعی مناسب می باشد، هر چند که این نتایج به بررسی های بیشتری نیازمند است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با سپری شدن دوره های زمانی ذخیره سازی اسپرم بز در حالت مایع، یک سیر نزولی تدریجی در پارامترهای

کیفی سیمن از نظر تحرک و یکپارچگی ساختاری غشائ سلولی اسپرم رخ می‌دهد، با این حال غنی سازی محیط نگه‌دارنده سیمن باMnTE به عنوان یک آنتی اکسیدان بالقوه و از بین برنده گونه‌های واکنش دار اکسیژن، احتمالاً می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو، تا حد قابل قبولی منجر به حفظ پارامترهای کیفی اسپرم بز در طی فواصل ذخیره سازی به حالت مایع گردد. به نظر می‌رسد که غلظت های ۰/۰۱ و ۰/۱ میکرومولMnTE تحرک و یکپارچگی ساختاری غشائ سلولی اسپرم را در فواصل زمانی صفر تا ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه فاقد آنتی اکسیدان بهتر محافظت می‌نماید. اما غنی سازی محیط نگه‌دارنده اسپرم با غلظت بالاتر از این آنتی اکسیدان (۱ میکرو مول) نه تنها اثرات مثبتی را در جهت حفظ پارامترهای اسپرمی به دنبال نداشت بلکه منجر به کاهش تحرک و یکپارچگی ساختاری غشائ سلول اسپرم در طی فواصل زمانی صفر تا ۷۲ساعت گردید.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان مقاله از مدیریت محترم پژوهشگاه رویان که تجهیزات مورد نیاز و هزینه های مادی این طرح را فراهم کردند سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

1.Aguero, A., Miragaya, M. H., Mora, N. G., Chaves, M. G., Beconi, M. T. (1995). Effect of vitamin E addition on equine sperm preservation. Comun. Biol., 13; 343-356.

2.Aitken, R. J., Clarkson, J. S. (1987). Cellular basis of defective sperm functionand its association with the genesis of reactive oxygen species by humanspermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility, 81; 459–469.

3.Amann, R. P., Pickett, B. W. (1987). Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J. Equine. Vet. Sci., 7; 145-173.

4.Batinic-Haberle, I., Benov, L., Spasojevic, I., Fridovich, I. (1998). The ortho effect makes manganese (III) meso-tetrakis (N-methylpyridinium-2-yl) porphyrin (MnTM-2-PyP 51) a powerful and potentially useful superoxide dismutase mimic. J Biol Chem, 273; 24521- 24528.

5.Bucak, M. N., Atessahin, A., Varis, li O., Yuce, A., Tekin, N., Akcay, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamineand hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Theriogenology, 67(5); 1060-1067.

6.Bucak, M. N., Sari ozkan, S., Tuncer, P. B. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircusancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. Small Ruminant Research, 89(1); 24-30.

7.Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sari ozkan, S., Ulutas, P. A. (2009). Comparison of the effects of glutamine and an aminoacid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. Small Ruminant Research, 81(1); 13-17.

8.Bucak, M. N., Tekin, N. (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid
storage of ram semen. Small Ruminant Research, 73(1); 103-108.

9.De Leeuw, F. E., Chen, H. C., Colenbrander, B., Verkleij, A. J. (1990). Cold-inducedultrastructural changes in bull aboar sperm plasma membranes. Cryobiology, 27; 171-183.

10. Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J Androl, 11;73-88.

11. Huszar, G., Sbracia, M., Vigue, L., Miller, D. J., Shur, B. D. (1997). Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyl transferase, cytoplasmic creatine phosphokinase isoform ratios. Biol Reprod, 56; 1020.

12. Jaramillo, M. C., Frye, J. B., Crapo, J. D. (2009). Increased manganese superoxide dismutase expression or treatment with manganese porphyrin potentiates dexamethasone-induced apoptosis in lymphoma cells. Cancer Res, 69; 13.

13. Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., Maxwell, W. M. (2000). Storage of boar semen. AnimReprodSci, 62;143-172.

14. Katila, T., Combes, G. B., Varner, D. D., Blanchard, T. L. (1997). Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. Theriogenol, 48; 1085-1092.
15. Kheradmand, A., Babaei, H., Abshenas, J. (2006). Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled- stored ram semen. Iranian Journal of Veterinary Research, 4(17).
16. LessardC, Parent S, Leclerc P,Bailey JL, Sullivan R.(2000). Cryopreservation Alters the Levels of the Bull Sperm Surface Protein P25b. J Androl. 21;700-707.
17. de Lamirande, E., Gagnon, C. (1995). Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. Hum Reprod, 10 (1); 15-21.
18. Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. AnimReprodSci, 62;113-141.
19. Marti, J. I., Marti, E., Cebrian- perez, J. E., Muino-blanco, T. (2003). Survival rate of antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. Theriogenology, 60; 1013-1020.
20. Michael, A, Alexopoulos, C., Pontiki, E. (2007). Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. Theriogenology, 68; 204-212.
21. Pollard, J. M., Reboucas, J. S., Durazo, A., Kos, I., Fike, F., Pannig, M. (2009). Radio protective effects of manganese-containing superoxide dismutase mimics on ataxia–telangiectasia cells. Free Radic Biol Med, 47(8); 1234.
22. Pomares, C. C., Stojanov, T., Eppleston, J., Maxwell, W. M. (1994). Effect of glutathione peroxidase on thesurvival of goat and ram spermatozoa during liquid storage. Spermatology, 9: 24.
23. Pomares, C. C, Stojanov, T., Maxwell, W. M. (1995). The effect of antioxidants on the fertilising capacity of chilled-stored buck spermatozoa. Reprod. Biol. Ann., 27; 52.
24. Reddy, N. S. S., Mohanarao, G. J., Atreja, S. K. (2010). Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (Bubaluabubalis) sperm quality following cryopreservation," Animal Reproduction Science, 183-190.
25. Revell, G., Marode, R. A. (1994). An osmotic resistance test for bovinesemen. Anim Reprod Sci, 36; 77-86.
26. Gil, J., Rodiguez–Irazoqui, M., Lundeheim, N., Soderquist, L., Roderiguez-Martinez, H. (2003). Fertility of ram semen frozen in Bioxcell and used for cervical artificial insemination.Theriogenology, 59; 1157-1170.
27. Sarıozkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Tas, U., Kinet, H., Ulutas, P. A. (2010). Effects of different extenders and centrifugation/washing on post thaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. Theriogenology, 73; 316-323.
28. Spasojevic, I., Chen, Y., Noel, T. J., Fan, P., Zhang, L., Rebouças, J.S. (2008). Pharmacokinetics of the potent redox-modulating manganese porphyrin, MnTE-2-PyP^{5+}, in plasma and major organs of B6C3F1 mice. Free RadicBiol Med, 45; 943-949.
29. Spasojevic, I., Chen, Y., Noel, T. J., Yu, Y., Cole, M. P., Zhang, L. (2007). Mnporphyrin-based superoxide dismutase (SOD) mimic, MnIIITE-2-PyP^{5+}, targets mouse heart mitochondria.Free Radic Biol Med, 42; 1193-1200.
30. Szabo, C. I., Schiropoulos, H., Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. Nature Publishing Group, (6); 662.
31. Triwulanningsih, E., Situmorang, P., Sugiarti, T., Sianturi, R. G., Kusumaningrum, D. A. (2008). The effect of glutathione addition in sperm diluents on the quality of bovine chilled semen. Journal of Agriculture, 1(1); 64-69.
32. Tremellen, K. (2008). Oxidative steress and male infertility aclinicalperspective. Hum reprod, 14(3); 243-258.
33. Upreti, G. C., Jenson, K., Oliver, J. E., Duganzich, D. M., Munday, R., Smith, J. F. (1997). Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically defined diluent containing antioxidants. Anim Reprod Sci, 48; 269-278.
34. Watson, P. F. (1990). AI and the preservation of semen. In: Lamming, GE (ed.) Marshall's Physiology of Reproduction, Male Reproduction. Churchill Livingstone London, 747-869.
35. Zini, A., de Lamirande, E., Gagnon, C. (1993). Reactive oxygen species in semen of fertile patient: levels of superoxide dismutase and catalase like activities in seminal plasma and spermatozoa.