فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۲، بهار ۱۴۰۱ ص. ۲۲-۱۷

مقاله پژوهشی

بررسی اثر استرس گرمایی بر پارامترهای اسپرمی و نسبت جنسی اسپرم‌های حاوی کروموزوم X یا Y پس از انجماد – ذوب سیمن بز

محسن مصباح[۱و۲]، محسن فروزانفر [۲*]، شاهین اقبال سعید[۳]، محمد امین عدالت منش[۲]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

[۳] گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان، اصفهان، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): mforozanfar@yahoo.com

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۰

چکیده

انتخاب جنسیت قبل از لقاح فرآیندی است که طی آن از اسپرمهای تعیین جنسیت شده حاوی کروموزوم X یا Y استفاده میشود تا جنسیت دلخواه در زاده‌ها تولید شود. اعتقاد بر این است که اسپرم‌های حاوی کروموزوم X در مقایسه با اسپرم‌های حاوی Y دارای طول عمر بیشتر بوده و در شرایط اسیدی، تغییرات دمایی و حتی استرس اکسیداتیو مقاوم‌تر می‌باشند. هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی اثر استرس گرمایی بر پارامترهای اسپرمی و نسبت جنسی اسپرم‌های حاوی کروموزوم X یا Y پس از انجماد - ذوب سیمن بز بود. سیمن رقیق شده گروه استرس گرمایی، ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $43\ ^{\circ}C$ قرار داده شد و سپس همانند گروه کنترل منجمد-ذوب شدند. نتایج نشان داد که استرس گرمایی منجر به کاهش معنی‌دار پارامتر تحرک کلی اسپرم، زنده‌مانی و یکپارچگی غشا سلولی اسپرم در مقایسه با گروه کنترل شد. همچنین در گروه استرس گرمایی میانگین نسبت Y به X به میزان ۹۴/۴ درصد بود که در مقایسه با میانگین Y به X به میزان ۱ مورد انتظار، تفاوت معنی‌داری ($p< /001$) نشان داد. اعمال استرس گرمایی به اسپرم در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند منجر به کاهش معنی‌دار پارامترهای اسپرمی شود به علاوه کاهش تعداد اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y در مقایسه با X در جمعیت زنده مانده پس از انجماد-ذوب، می‌تواند نشان دهنده حساس‌تر و شکننده‌تر بودن اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y در مقایسه با اسپرم‌های حاوی X در گونه بز باشند.

کلیدواژه‌ها: تعیین جنسیت، حفظ انجمادی، استرس گرمایی، اسپرم بز.

مقدمه

انتخاب جنسیت با استفاده از اسپرم‌های تعیین جنسیت شده به عنوان یک فرآیند قابل توجیه اخلاقی، یکی از روش های رو به رشد و عملی در طول فرآیند تلقیح مصنوعی در حیوانات مزرعه‌ای است. [۱]. هر نمونه سیمن در گونه‌های مختلف پستانداران شامل ۵۰% اسپرم‌های حاوی کروموزوم X و ۵۰%

اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y می‌باشد [۲]. جدا کردن اسپرم‌ها در یک نمونه سیمن شامل روش‌هایی است که بر روی جداسازی اسپرم با جنسیت دلخواه در یک نمونه تمرکز دارند. در این روش‌ها اسپرم‌های حاوی کروموزوم X و اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y در نمونه سیمن فرد در شرایط آزمایشگاهی و با تکنیک‌های مختلف تا حدودی از یکدیگر جدا می‌شوند[۳ و ۴]. انتخاب جنسیت قبل از لقاح فرآیندی است که طی آن اسپرمهای تعیین جنسیت شده حاوی کروموزوم X یا Y ، تخمک را بارور می کنند تا به جای نسبت برابر نر – ماده زاده ها ، جنسیت دلخواه تولید شوند . مزیت این روش‌ها در این است که لقاح می‌تواند با استفاده از اسپرم‌های تعیین جنسیت شده به دنبال تلقیح مصنوعی (در مورد حیوانات مزرعه‌ای) یا تزریق درون رحمی (در مورد انسان) انجام شود [۵-۷].

از سوی دیگر، تکنیک تعیین جنسیت اسپرم با تکنیک حفظ انجمادی سیمن در هم تنیده شده است. کاربرد تکنیک حفظ انجمادی سیمن در مورد اسپرم‌های تعیین جنسیت شده یکی از راه‌های رو به گسترش و کاربردی در تولید زاده‌ها با جنسیت دلخواه به ویژه در مورد حیوانات مزرعه‌ای است. از این رو تلاش‌های بسیار زیادی در جهت کنترل جنسیت زاده‌های حیوانات مزرعه‌ای با استفاده از اسپرم‌های تعیین جنسیت شده از یک طرف و بهبود فرایند انجماد -ذوب سیمن از طرف دیگر در حال انجام است. تلقیح مصنوعی با اسپرم منجمد شده و تعیین جنسیت شده در برنامه‌های انتخاب و اصلاح نژاد ضروری است [۸]. هرچند تفاوت های فیزیولوژیکی مختلفی بین اسپرم‌های دارای کروموزوم X و Y وجود دارد. با این حال، از نظر محتوای ژنومی نیز با یکدیگر متفاوت بوده به طوری که اسپرم‌های حامل Y به علت کوچک بودن کروموزوم Y در مقایسه با کروموزوم X ، سبک‌تر هستند و سریع‌تر از اسپرم‌های حامل X حرکت می‌کنند. علاوه بر این، اعتقاد بر این است که اسپرم‌های حاوی کروموزوم X در مقایسه با اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y دارای طول عمر بیشتر بوده و در شرایط اسیدی، تغییرات دمایی و حتی استرس اکسیداتیو مقاوم‌تر می‌باشند و در مقابل اسپرم حاوی کروموزوم Y نسبت به تغییرات محیطی و عوامل استرس‌زا حساس‌تر و آسیب پذیرتر می‌باشند [۹ و ۱۰]. هدف از انجام تحقیق حاضر در پاسخ به این سوال بود که اولا استرس گرمایی چه تاثیری بر پارامترهای اسپرم از جمله تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشا پس از انجماد - ذوب خواهد داشت و دوما آیا اعمال استرس گرمایی قبل از فرایند انجماد - ذوب سیمن می‌تواند منجر به انحراف و تغییر نسبت جنسی اسپرم در جمعیت اسپرم‌های زنده مانده پس از انجماد- ذوب سیمن شود؟ انجام شد. این اولین مطالعه در زمینه اعمال استرس و بررسی نرخ اسپرم‌های زنده مانده حاوی کروموزوم X در مقایسه با اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y پس از انجماد-ذوب سیمن بز نژاد سانن می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری سیمن از ۴ بز آموزش دیده نژاد سانن با استفاده از واژن مصنوعی به مدت ۸ هفته و هفته‌ای سه بار در فصل تولید مثل انجام شد. بلافاصله پس از جمع‌آوری نمونه‌های سیمن، نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه، بررسی‌های ماکروسکوپی اولیه از نظر حجم نمونه انزالی، رنگ و ظاهر نمونه سیمن و همچنین بررسی‌های میکروسکوپی از نظر تحرک و غلظت نمونه سیمن انجام شد. در هر بار نمونه‌گیری، سیمن با حجم بین ۲ ml - ۰/۷۵، شیری رنگ با ویسکوزیته مناسب، غلظت بیشتر از ۳×۱۰^{۹} اسپرم در میلی لیتر، تحرک بیش از ۷۵ درصد و مرفولوژی کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیر طبیعی، در هر انزال به عنوان سیمن طبیعی در نظر گرفته شد. در غیر این صورت نمونه‌های جمع‌آوری‌شده حذف شدند. در هر تکرار، جهت حذف اثرات فردی، نمونه‌های جمع‌آوری شده از ۴ بز نر با نسبت مساوی و در شرایط یکسان به دور از نور محیط و به آرامی با یکدیگر مخلوط شدند. سیمن ترکیب شده برای انجام آزمایش در هر گروه آزمایشی و گروه کنترل استفاده شد.

گروه‌های مورد مطالعه

۱- گروه کنترل: در این گروه سیمن با محیط رقیق کننده تجاری (Ref number: 016218-006584- BIOXCELL) 018617) رقیق شد و سپس منجمد شد .

۲- گروه استرس گرمایی: در این گروه سیمن با محیط رقیق کننده تجاری BIOXCELL رقیق شد و سپس در زمان انکوباسیون رقیق کننده با سیمن رقیق شده، به مدت ۳۰

دقیقه در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد (شرایط استرس گرمایی) قرار داده شدند و سپس منجمد شد.

فرایند انجماد - ذوب سیمن

- رقیق سازی

رقیق‌سازی سیمن با استفاده از محیط تجاری BIOXCELL انجام شد .همچنین غلظت نهایی اسپرم در محیط رقیق کننده در گروه‌های تیماری و گروه کنترل با افزودن مقدار مناسب رقیق کننده به میزان ۱۰۰ - ۸۰ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر ($80- 100 * 10^6$ spz/ ml) تنظیم شد. پس از رسیدن نمونه‌ها به آزمایشگاه و رقیق سازی آنها، نمونه‌ها ی گروه کنترل به مدت ۲ ساعت در یخچال با دمای ۴ ℃ قرار گرفتند اما گروه استرس گرمایی، پس از رقیق سازی ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۳ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس به مدت ۱۱۰ دقیقه دیگر در یخچال با دمای ۴ ℃ قرار داده شد. در نهایت سیمن رقیق شده در هر گروه به درون نی های انجماد کشیده شد.

- فاز بخار و غوطه‌ور سازی درون ازت مایع

بخار ازت دمایی حدود ۸۰ ℃- دارد . نی‌های بسته شده و سرد شده در فاصله ۴ سانتی متری بالاتر از سطح ازت مایع قرار داده شدند تا ظرف مدت ۱۲ دقیقه به آرامی منجمد شوند. در نهایت نی ها به درون ازت مایع (۱۹۶ ℃-) غوطه ور شدند.

ذوب سیمن منجمد شده

پس از خارج کردن نی‌های انجمادی از نیتروژن مایع، نی‌ها به مدت ۱۰ ثانیه در دمای اتاق و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در لوله حاوی نرمال سالین ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

ارزیابی نهایی اسپرم بعد از انجماد- ذوب

- بررسی تحرک اسپرم

بررسی میزان تحرک اسپرم پس از انجماد- ذوب سیمن به کمک نرم‌افزار CASA (Camputer assessed sperm analyzer) بود. بدین منظور سه استراو[1] از هر گروه ذوب شد و محتوی داخل آن به صورت جداگانه به داخل میکروتیوب انتقال داده شدند. سپس با استفاده از سمپلر متغیر و با برداشتن ۶ میکرولیتر از سیمن ذوب شده بر روی لام مخصوص دستگاه CASA که از قبل تمیز و بر روی صفحه ی گرم ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شده بود، ریخته شد و آنگاه باگذاشتن آهسته لامل مخصوص بر روی آن زیر دستگاه CASA گذاشته شد و پارامترهای مختلف آنالیز تحرک اسپرم ثبت شد. جهت ثبت درصد پارامترهای آنالیز اسپرم توسط دستگاه CASA، حد اقل چهار میدان دید به صورت تصادفی که تعداد اسپرم ثبت شده در مجموع بالاتر از ۳۰۰ اسپرم بود، انتخاب شد.

بررسی زنده‌مانی[2] اسپرم‌ها

برای بررسی میزان زنده‌مانی اسپرم ها پس از انجماد - ذوب از تست رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین شرح داده توسط Björndahl L و همکاران (۱۱) استفاده شد. این تست بر پایه میزان نفوذپذیری رنگ ائوزین - نیگروزین به درون غشا سلولی که آسیب دیده است، می‌باشد و عدم نفوذ رنگ به درون غشا سلولی بیانگر سلامت آن است. برای انجام رنگ آمیزی ائوزین - نیگروزین، ۶ میکرولیتر رنگ ائوزین- نیگروزین به ۵۰ میکرولیتر نمونه سیمن ذوب شده اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه باهم مخلوط شدند. یک قطره از این نمونه رنگ آمیزی شده در یک طرف یک لام شیشه ای تمیز قرار داده شد و گستره‌ای تهیه شد و در دمای محیط خشک شد. نمونه‌ها با بزرگنمایی ×۴۰۰ با میکروسکوپ نوری مشاهده شد. در هر تکرار و در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم های رنگ نشده (زنده) نسبت به رنگ شده (مرده) محاسبه شد .

بررسی یکپارچگی غشای سیتوپلاسمی

برای بررسی یکپارچگی غشای سیتوپلاسمی‌اسپرم از تست HOST (Hypoosmotic Swelling Test) استفاده شد. به منظور انجام تست HOST ابتدا ۱۰میکرولیتر از سیمن ذوب شده به ۲۰۰ میکرولیتر از محلول HOST (۱۰۰ میلی اسمولار در لیتر، ۸/۷۲ گرم در لیتر فروکتوز و ۴/۷۴ گرم در لیتر سدیم سیترات) اضافه شد و به آرامی‌مخلوط شد. و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در این محیط انکوبه شد.

[1] straw

[2] viability

بلافاصله پس از انکوباسیون یک قطره از سوسپانسیون اسپرم و محلول هیپواسموتیک روی لام گذاشته شد و با یک لامل روی آن پوشانده شد. و توسط میکروسکوپ معکوس ارزیابی شد. در هر نمونه حداقل ۲۰۰ اسپرم از ۵ میدان دید مختلف میکروسکوپی شمارش شد.

تعیین نسبت جنسی اسپرم‌های حاوی کروموزوم X و اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y در گروه استرس گرمایی و کنترل

- جداسازی اسپرم‌های متحرک و بی تحرک

جداسازی اسپرم های زنده از مرده از روش سانتریفیوژ گرادیان (DGC[1]) غلظتی استفاده شد. بدین منظور یک گرادیان دو لایه ای از محلول Pure sperm ۸۰ % و ۴۰% در لوله فالکون۱۰ cc تهیه شد. سپس ۱/۵ cc از سیمن ذوب شده روی آن قرار داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی با پیپت پاستور آسپیره شد و باقیمانده محتویات لوله به یک لوله فالکون ۵ cc منتقل گردیده و با محیط Sperm Rinse، مخلوط شد. سپس سوسپانسیون ایجاد شده به‌مدت۱۰دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. مجددا پس از سانتریفیوژ، مایع رویی برداشته شد. در نهایت رسوب تشکیل شده در انتهای لوله که محتوی اسپرم‌های جداسازی شده است جهت آنالیزهای ژنتیکی تعیین درصد نسبی اسپرم‌های حاوی کروموزوم X و اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y استفاده شد. در نهایت در هر تکرار در گروه استرس گرمایی و گروه کنترل مقدار $2*10^6$ sp/ ml جداسازی شد و جهت آنالیز مولکولی در Real Time PCR استفاده شد.

- بررسی کمی نسبت کروموزومX به Y با استفاده از روش Real-Time PCR

- طراحی پرایمر

پرایمرهای اختصاصی با استفاده از نرم افزار primer premier 5 بر اساس جایگاه اختصاصی ژن های SRY و Amelogenin به ترتیب برای کروموزوم های Yو X طراحی شد .کیفیت پرایمرها در تکثیر قطعه مورد نظر با واکنش PCR و همچنین راندمان پرایمرها[2] مورد ارزیابی قرار گرفت. پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ بر اساس دارا بودن ویژگی‌های ضروری در واکنش Real-Time PCR طراحی شدند

نمونه‌های اسپرم با استفاده از کیت QIAGEN طبق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده استخراج گردیده و بعد از اطمینان از صحت وجود DNA با استفاده از تعیین غلظت یا ژل الکتروفورز، نمونه‌های DNA تا انجام واکنش Real-Time PCR در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. واکنش Real-Time PCR به صورت ۳ تکرار برای هر نمونه انجام شد. نسبت عدد ct[3] بدست آمده از تکثیر قطعات SRY و Amelogenin در واکنش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت و با نسبت یک به یک اسپرم حاوی در گروه کنترل مقایسه شد.

- روش‌های بررسی آماری

برای آنالیز داده‌ها از روش آماری طرح بلوکی غیر تصادفی ANOVA با توجه به نوع داده ها و با استفاده از نرم افزار SPSS 11.5 استفاده شد.

نتایج

- نتایج مربوط به اثر استرس گرمایی بر پارامتر تحرک اسپرم بز پس از انجماد-ذوب:

نتایج آنالیز آماری داده‌های این آزمون نشان داد که در اعمال استرس در گروه استرس گرمایی منجر به کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) پارامتر حرکت کلاس C و تحرک کلی اسپرم در مقایسه با گروه کنترل می شود (نمودار ۱).

- نتایج مربوط به اثر استرس گرمایی بر پارامتر زنده‌مانی و یکپارچگی غشا سلولی اسپرم بز پس از انجماد-ذوب:

نتایج مربوط به اثر استرس گرمایی بر پارامتر زنده‌مانی و یکپارچگی غشا سلولی اسپرم بز پس از انجماد - ذوب نشان داد که استرس گرمایی منجر به کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) هر دو پارامتر زنده‌مانی و یکپارچگی غشا سلولی اسپرم در مقایسه با گروه کنترل می‌شود (نمودار ۲).

[1] Density Gradient Centrifuge

[2] Primer efficiency

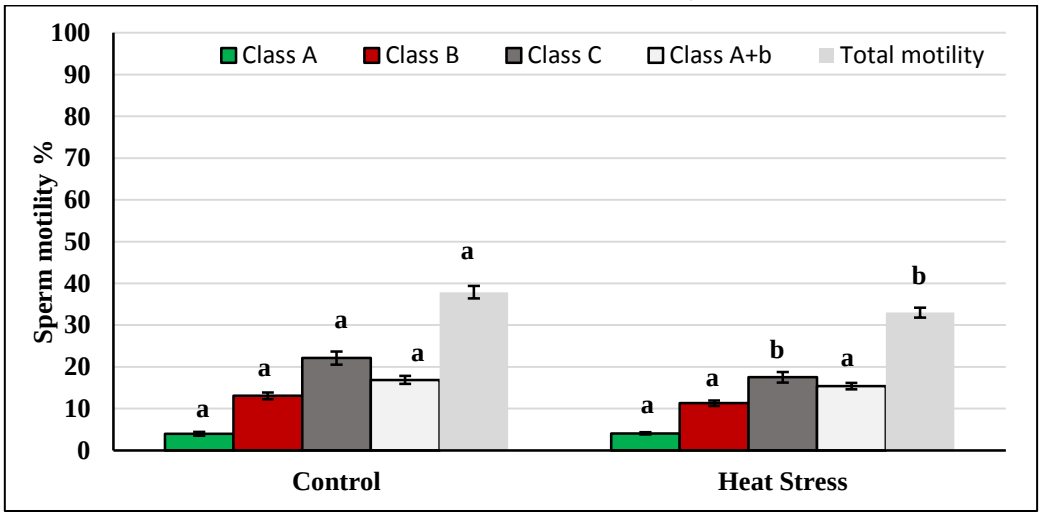
[3] Cycle treshhold

جدول ۱) پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی('3-'5)	طول قطعه تکثیری	NCBIشماره
SRY (F/R)	CGTCGGAAGGCGAAGATGC TTGATGGGCGGTAAGTGGC	167 bp	AC225167.3
Amilogenin (F/R)	TCCCGCTTCGGTACTCTGC TTGATGGGCGGTAAGTGGC	117 bp	NG_012040.1

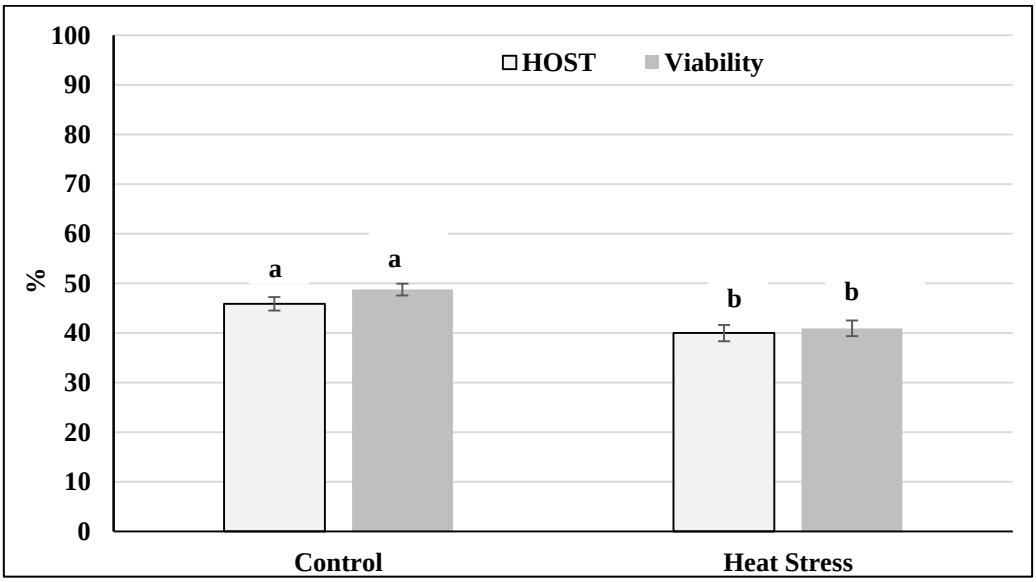
استخراج DNA و واکنش Real-Time PCR:

نمودار ۱) میانگین درصد تحرک اسپرم بز در گروه استرس گرمایی و همچنین گروه کنترل در شرایط پس از انجماد - ذوب.



سیمن."Class A " درصد اسپرم های متحرک با سرعت بالا (حرکت سریع) "Class B "درصد اسپرم های متحرک پیش رونده با سرعت پایین(حرکت آهسته) " Class C "درصد اسپرم های با حرکت درجا دارند، " Class A+ B" درصد مجموع دو حرکت آهسته و سریع، " Total motility "درصد کل تحرک اسپرم. میانگین های دارای حروف متفاوت در هر ستون، از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی دار می باشند.(P<۰/۰۵).

نمودار ۲) نتایج مربوط به اثر استرس گرمایی بر پارامتر زنده‌مانی و یکپارچگی غشا سلولی اسپرم بز پس از انجماد - ذوب در گروه استرس گرمایی و گروه کنترل.



میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون، از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی‌دار می باشند.(P<۰/۰۵).

- نتایج مربوط به اثر استرس گرمایی بر نسبت جنسی اسپرم‌های زنده مانده بز پس از انجماد-ذوب:

برای بررسی نسبت کروموزوم Y به نسبت کروموزوم X بر اساس Ct ژن SRY که بر روی کروموزوم Y قرار دارد و Ct ژن Amelogenin که بر روی کروموزوم X قرار دارد استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که در گروه استرس گرمایی میانگین نسبت Y به X به میزان ۹۴/۴ درصد بود که در مقایسه با میانگین Y به X به میزان ۱ مورد انتظار، تفاوت معنی‌داری را در سطح p< /001 نشان داد.

بحث

نتایج آنالیز آماري داده‌های این آزمون نشان داد که استرس گرمایی منجر به کاهش معنی‌دار پارامتر تحرک کلی اسپرم، زنده‌مانی و یکپارچگی غشا سلولی اسپرم در مقایسه با گروه کنترل شد. در واقع این نتایج قابل پیش‌بینی بود ، زیرا اعمال استرس به هرحال می‌تواند موجب تغییر و اختلال در فیزیولوژی اسپرم و احتمالا آسیب‌های غشایی گردد. گزارش شده که حین فرایندهای انجماد- ذوب سیمن گونه‌های آزاد اکسیژن می‌توانند منجر به ایجاد استرس اکسیدانیو شده و منجر به کاهش پارامترهای سیمن منجمد شده در مقایسه با سیمن تازه شوند. فرایند انجماد - ذوب سیمن منجربه اعمال آسیب‌های مختلف ساختاری و فیزیولوژیکی به اسپرم و در نهایت مرگ درصدی از اسپرم‌ها در گونه‌های مختلف می‌شود. بنابراین طبیعی است که پس از انجماد- ذوب فقط درصدی از اسپرم‌ها توانایی تحرک داشته باشند [۱۲-۱۶]. بنابراین استرس گرمایی (۴۳ درجه سانتی‌گراد - ۳۰ دقیقه) به عنوان یک عامل منفی منجر به کاهش پارامترهای اسپرمی شده است. هرچند خود فرایند حفظ انجمادی سیمن نیز به عنوان یک عامل استرس زا مطرح می‌باشد، با این حال گروه استرس گرمایی متحمل دو استرس شده که یکی مربوط به خود فرایند حفظ انجمادی است و دیگری استرس گرمایی است و چون گروه کنترل نیز دچار استرس ناشی از انجماد شده، بنابراین کاهش پارامترهای اسپرمی مشاهده شده در گروه استرس گرمایی را می‌توان به اعمال استرس گرمایی نسبت داد. دمای طبیعی اسپرم‌سازی در بیشتر پستانداران ۵-۴ درجه سانتی‌گراد پایین تر از دمای بدن است. نشان داده شده که گرم کردن موضعی بیضه ها در موش منجر به اعمال آسیب به تمام سلول‌های بیضه‌ای شده و در این میان سلول‌های زاینده بیضه حساس تر از سلول‌های سرتولی و لایدیک می باشند [۱۸ و ۱۷]. به نظر می‌رسد افزایش دما در شرایط آزمایشگاهی و طی تحقیق حاضر نیز می تواند به اسپرم آسیب‌های ساختاری و عملکردی وارد کند.

به منظور بررسی تاثیر احتمالی متفاوت استرس گرمایی بر روی جمعیت اسپرم‌های زنده مانده پس از انجماد - ذوب و بررسی نسبت اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y به اسپرم‌های حاوی کروموزوم X، نمونه‌ها در گروه استرس گرمایی پس از انجماد- ذوب، با استفاده از روش سانتریفیوژ گرادیان غلظتی، اسپرم‌های زنده و دارای تحرک از اسپرم‌های مرده در اثر آسیب انجمادی جدا شدند و فقط نمونه‌های اسپرم دارای تحرک برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفتند. بررسی نسبت کروموزوم Y به نسبت کروموزوم X بر اساس Ct ژن SRY که بر روی کروموزوم Y قرار دارد و Ct ژن Amelogenin که بر روی کروموزوم X قرار دارد با استفاده از روس PCR انجام شد. با توجه به اینکه تقسیم میوز هر اسپرماتوسیت اولیه منجر به ایجاد ۴ اسپرم می شود که نیمی از آنها حاوی کروموزوم X و نیم دیگر حاوی کروموزوم Y می‌باشند، بنابراین نسبت Y به X باید یک به یک باشد . از آنجا که اسپرم حاوی کروموزوم Y حساس‌تر از، به‌ویژه برای اسپرم‌های منتخب جنسی. ما فرض کردیم استرس حرارتی اولیه قبل از انجماد اسپرم احتمالاً نسبت ۵۰:۵۰ اسپرم -X به -Yدار را منحرف می کند. نتایج حاصل نشان داد که در گروه استرس گرمایی میانگین نسبت Y به X به میزان ۹۴/۴ درصد بود که در مقایسه با میانگین Y به X به میزان ۱ مورد انتظار، تفاوت معنی‌داری را در سطح p< /001 نشان داد. این بدین معنی است که اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y در مقایسه با اسپرم‌های حاوی کروموزوم X حساس‌تر بوده و کاهش معنی‌داری را نشان دادند. البته باید به این نکته اشاره نمود که خود فرایند انجماد-ذوب سیمن نیز به عنوان یک استرس مطرح می‌باشد که در هر دو گروه استرس گرمایی و کنترل وجود دارد و به نوعی موجب کاهش پارامترهای مختلف اسپرم شد. با این حال در گروه استرس گرمایی، علاوه بر استرس انجماد-ذوب، استرس گرمایی یعنی قرار دادن در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه بر روی پارامترهای اسپرمی تاثیر گذار بود. به‌نظر می‌رسد کاهش معنی‌دار

اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y در مقایسه با اسپرم‌های حاوی کروموزوم X مشاهده شده در این تحقیق می تواند بر این فرض استوار باشد که اسپرم حاوی کروموزوم Y حساس‌تر و شکننده‌تر از اسپرم حاوی کروموزوم X باشد. متاسفانه به علت محدودیت‌های مختلف از جمله تامین هزینه‌ها، در تحقیق حاضر انجام لقاح آزمایشگاهی و یا تلقیح مصنوعی با اسپرم‌های گروه استرس گرمایی، امکان پذیر نبود. ادامه این تحقیق و انجام لقاح یا تلقیح مصنوعی و بررسی جنسیت زاده ها و یا جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی، احتمالا می تواند پاسخگوی این سوال باشد که توان لقاحی اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y و اسپرم‌های حاوی کروموزوم X تحت استرس گرمایی به چه ترتیب خواهد بود؟

نتیجه گیری کلی

اعمال استرس از جمله استرس گرمایی به اسپرم می‌تواند منجر به کاهش معنی‌دار پارامترهای اسپرمی از جمله تحرک کلی، زنده مانی و یکپارچگی غشا سلولی اسپرم شود. به علاوه تعداد اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y در مقایسه با اسپرم‌های حاوی کروموزوم X در جمعیت زنده مانده پس از انجماد–ذوب ، کاهش معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که می‌تواند بیانگر حساس‌تر بودن و شکننده‌تر بودن اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y در مقایسه با اسپرم‌های حاوی کروموزوم X در گونه بز باشند.

منابع

[1] Espinosa-Cervantes R, Córdova-Izquierdo A. Trop. Sexing sperm of domestic animals. Anim Health Prod. 2013 Jan;45(1):1-8. doi: 10.1007/s11250-012-0215-0. Epub 2012 Jul 25.

[2] Seidel GE Jr. Sexing mammalian sperm - Where do we go from here? J Reprod Dev. 2012; 58(5): 505-9. doi: 10.1262/jrd.2012-077.

[3] Johnson LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art.. Anim Reprod Sci. 2000 Jul 2;60-61:93-107. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00088-9.

[4] Garner DL, Evans KM, Seidel GE. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. .Methods Mol Biol. 2013;927:279-95. doi: 10.1007/978-1-62703-038-0_26.

[5] Evans G, Hollinshead FK, Maxwell WM Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep..Reprod Fertil Dev. 2004;16(4):455-64. doi: 10.10371/RD04032.

[6] Lu Y, Zhang M, Lu S, Xu D, Huang W, Meng B, Xu H, Lu K. Sex-preselected buffalo (Bubalus bubalis) calves derived from artificial insemination with sexed sperm. Anim Reprod Sci. 2010 Jun;119(3-4):169-71. doi: 0.1016/j.anireprosci.2010.01.001. Epub 2010 Jan 14

[7] Seidel GE Jr.Update on sexed semen technology in cattle. Animal. 2014 May;8 Suppl 1:160-4. doi: 10.1017/S1751731114000202. Epub 2014 Mar 28.

[8] Yadav SK, Gangwar DK, Singh J, Tikadar CK, Khanna VV, Saini S, Dholpuria S, Palta P, Manik RS, Singh MK, Singla SK.An immunological approach of sperm sexing and different methods for identification of X- and Y-hromosome bearing sperm. Vet World. 2017 May;10(5):498-504. doi: 10.14202/vetworld.2017.498-504. Epub 2017 May 9

[9] Quelhas J, Santiago J, Matos B, Rocha A, Lopes G, Fardilha M.Bovine semen sexing: Sperm membrane proteomics as candidates for immunological selection of X- and Y-chromosome-bearing sperm.Vet Med Sci. 2021 Sep; 7(5): 1633-1641. doi: 10.1002/vms3.540. Epub 2021 May 26.

[10] Rahman MS, Pang MG.New Biological Insights on X and Y Chromosome-Bearing Spermatozoa.Front Cell Dev Biol. 2020 Jan 21; 7: 388. doi: 10.3389/fcell.2019.00388. eCollection 2019

[11] Björndahl L, Söderlund I, Kvist U.Hum Reprod. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment.2003 Apr;18(4):813-6. doi: 10.1093/humrep/deg199

[12] Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. Nat Rev Urol. 2017 Aug; 14 (8): 470-485. doi: 10.1038/nrurol.2017.69. Epub 2017 May 16.

[13] Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagozloo P.Reprod Fertil Dev. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. 2016; 28 (1-2): 1-10. doi: 10.1071/RD15325.

[14] Shafiei M, Forouzanfar M, Hosseini SM, Esfahani MH. Theriogenology .The effect of superoxide dismutase mimetic and catalase on the quality of postthawed goat semen. . 2015 May; 83(8): 1321-7. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.01.018. Epub 2015 Jan 21.

[15] Mesbah M, Forouzanfar M, Eghbalsaied S.Biopreserv Biobank Supplementation of Estradiol Into Semen Extender Improved Goat Sperm Cryopreservation.. 2021 Nov 9. doi: 10.1089/bio.2020.0169. Online ahead of print.

[16] Shahat AM, Rizzoto G, Kastelic JP. Amelioration of heat stress-induced damage to testes and sperm quality. Theriogenology. 2020 Dec;158:84-96. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.08.034. Epub 2020 Sep 8.

[17] Shadmehr S, Fatemi Tabatabaei SR, Hosseinifar S, Tabandeh MR, Amiri . Attenuation of heat stress-induced spermatogenesis complications by betaine in mice. A. Theriogenology. 2018 Jan 15;106:117-126. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.10.008. Epub 2017 Oct 7.

[18] Kobayashi J, Oguro H, Uchida H, Kohsaka T, Sasada H, Sato E.J Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence in situ hybridization. Reprod Dev. 2004 Aug;50(4):463-9. doi: 10.1262/jrd.50.463.