مجله پژوهش های بالینی دامپزشکی
JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH
سال اول، شماره سوم، تابستان ۱۳۸۹
صفحات ۱۹۹-۱۸۹

بررسی میزان فعالیت آنزیم های GOT, GPT ,LDH پلاسمای منی و ارتباط آن باکیفیت اسپرماتوزوئیدهای منجمد گاومیش

عبدالرضا رستگارنیا*[۱]، یحیی عیوض صحرا[۲]، وحید شفیع پور[۳]

۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه

۲- دانش آموختهٔ دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه

۳-کارشناس مرکز پرورش واصلاح نژاد گاومیش ایستگاه جبل ارومیه

** نویسنده مسئول: a.rastegar@iaurmia.ac.ir*

چکیده

هدف این تحقیق تعیین میزان فعالیت آنزیم های GOT, GPT و نیز LDH پلاسمای منی در طی فرایند عمل آوری و انجماد و ارتباط آن با کیفیت اسپرماتوزوئیدهای منجمد می باشد. برای این منظور تعداد ۲۵ انزال ۵ راس ازگاومیش های نر موجود در ایستگاه پرورش گاومیش شمالغرب کشور (ایستگاه جبل) جمع آوری گردید. نمونه های منی با کیفیت عالی و با داشتن بیش از ۸۰ درصد اسپرماتوزوئید با تحرک رو به جلو در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با رقیق کننده تریس رقیق گردید. پس از طی مرحله خنک شدن (cooling) در دمای ۴ درجه سانتیگراددر ظرف مدت۲ ساعت و نیز اعمال زمان تعادل ۶-۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد متعاقب افزودن گلیسرول، نمونه های رقیق شده در پایوت های ۰,۵ میلی لیتری فرانسوی با اعمال زمان انجماد مشخص قبل از ورود در ازت مایع منجمد گردیده و در داخل کانتینرهای مخصوص ازت مایع نگهداری شدند. میزان فعالیت آنزیم های مورد نظربلافاصله پس از جمع آوری منی ونیز در مورد نمونه پایوتهای منجمد پس از گذشت ۷۲ ساعت از زمان انجماد،متعاقب یخ گشایی (thawing) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه صورت گرفت. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم LDH از روش کنتیک اکسیداسیون لاکتات به پیرووات و نیز برای اندازه گیری فعالیت سایر آنزیم ها از روش کالریمتری استفاده گردید. در این راستا میزان تحرک، درصد اسپرماتوزوئیدهای با غشای پلاسمالمای سالم و یکپارچه و نیز آکروزومهای دست نخورده نمونه‌های منجمد مورد نظر پس از ذوب به ترتیب یا استفاده از میکروسکوپ صفحه گرم (۳۷ درجه سانتیگراد)، آزمایش HOST و نیز رنگ آمیزی گیمسا مورد بررسی قرار گرفت میانگین فعالیت آنزیم های LDH, GPT, GOT پایوتهای منجمد گاومیش نر مورد بررسی به ترتیب (IU/L) ۱۸/۵±۱۴۰/۴، (IU/L) ۵۸/۵±۲۷۰/۴، (IU/L) ۳۲/۷±۹۰/۴ گزارش گردید. آنالیز نتایج بدست آمده در ارتباط با ارزیابی کیفیت نمونه های منی منجمد پس از یخ گشایی بر اساس میزان فعالیت آنزیم های LDH, GPT, GOT نشان داد که بین میزان تحرک ونیز درصد اسپرماتوزوئیدهای زنده و با آکروزوم نرمال با میزان فعالیت آنزیم های مورد نظر ارتباط معکوس و معنی داری وجود دارد، بطوریکه با کاهش کیفیت منی منجمد میزان فعالیت آنزیم های تحت آزمایش افزایش نشان می دهد ($P<0/05$). به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم های پلاسمای منی میتواند به عنوان یک شاخص در ارزیابی کیفیت نمونه منی منجمد گاومیش مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: منی منجمد، آنزیم هایGOT, GPT ,LDH، گاومیش

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res.1(3)189-199,2010

Studies on seminal plasma enzymes (GOT, GPT and LDH) profile and its relationship with quality of buffalo frozen semen

Rastegarnia. A [1]*، Eviaz Sahara. Y [2], Shafepour, V[3]

1- Department of Clinical Sciences، Faculty of Veterinary Medicine، Islamic Azad University Urmia، Branch، Urmia – Iran ,.P.O.BOX 969

2- Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine، Islamic Azad University Urmia branch، Urmia - Iran

3- Buffalo Breeding and Training Center, Jabal-Urmia, Urmia-,Iran

**Corresponding author: a.rastegar@ iaurmia.ac.ir*

This study was conducted to evaluate seminal enzyme (GOT, GPT and LDH) profile and its relationship with quality of buffalo frozen spermatozoa. For this purpose ,twenty-five split pooled ejaculates from five buffalo bulbs in Buffalo Breeding and Training center (Jabal-Urmia) possessing more than 80% visual sperm motility , were diluted at 37°C in tris- egg yolk extender. The diluted semen was cooled to 4°C within 2 hours, equilibrated at 4°C for 4-6 hours following the addition of glycerol , filled in 0.5 ml French straws and were subjected to cooling condition before being plunged into liquid nitrogen . Semen was thawed at 37°C for 40 seconds after 72 hours of storage inside liquid nitrogen. Post thaw visual sperm motility, plasma membrane integrity and acrosome morphology of each frozen semen sample were assessed by warm plate microscopy at 37°C, hypo osmotic swelling test, and Giemsa staining, respectively. LDH and GOT(AST) ،GPT(ALT) enzyme activities were measured using kinetic oxidation of lactate to private method and colorimetric method , respectively. Overall mean activity of frozen semen GOT (AST) ،GPT (ALT) and LDH enzyme activities were 140.4±18.5 (IU/L), 270.4±58.5 (IU/L) and 90.4±32.7 (IU/L) ,respectively. The relationship between the activities of these enzymes and semen quality showed only a positive correlation between increased LDH and GOT (AST) ،GPT (ALT) enzyme activities and decrease post thaw spermatozoa characteristics. These result revealed that seminal enzyme (GOT, GPT and LDH) profile in extender is suitable and recommendable for evaluation of buffalo frozen semen.

Key words: Frozen semen, GOT ،GPT, LDH enzymes, Buffalo

مقدمه

امروزه هدف اصلی استفاده از تکنیک های تولید مثلی از جمله تلقیح مصنوعی انجام اصلاحات ژنتیکی، به منظور تولید دامهایی است که از لحاظ راندمان و بهره وری تولید محصولات با ارزشی همچون شیر و گوشت، در بالاترین حد ممکن خود قرار داشته باشند. از آنجائیکه استحصال منی با کیفیت بالا از گاومیش های نر مرغوب با مشکلات فراوانی روبرو است، محققین را در سراسر جهان بر آن داشته است، که برای افزایش ظرفیت باروری گاومیش های نر، از طریق بررسی خصوصیات منی تولیدی این گونه دامی گامهایی برداشته شود (۳،۴).

یکی از مهمترین فاکتورهایی که امروزه برای ارزیابی کیفیت منی عمل آوری شده و منجمد مورد استفاده قرار می گیرد، بررسی آنزیمهای موجود در پلاسمای منی منجمد است. با بررسی این آنزیمها می توان میزان آسیب وارده به اسپرماتوزوئیدها را، طی مراحل عمل آوری و انجماد، ارزیابی نمود و به کیفیت و قدرت باروری منی منجمد مورد استفاده در تلقیح مصنوعی پی برد. از جمله مهمترین آنزیمهایی که امروزه مد نظر می باشد، آنزیمهای نظیرگلوتامیک اکسالواستیک ترانس آمیناز AST (GOT)، گلوتامیک پیروات ترانس آمیناز ALT (GPT) ولاکتات دهیدروژناز (LDH) می باشند. از آنجائیکه این آنزیمها در متابولیسم سلولی اسپرماتوزوئیدها نقش دارند و عمدتا در داخل سلولهای اسپرم قرار دارند، افزایش میزان حضور و فعالیت این آنزیمها در پلاسمای منی منجمد، می تواند نشان دهنده از بین رفتن تعدادی از اسپرمها و یا وارد آمدن آسیب به آنها و تراوش این آنزیمها، به داخل پلاسمای منی منجمد باشد (۱۲،۱۱).

با اندازه گیری میزان حضور این آنزیمها در پلاسمای منی می توان درصد سلولهای اسپرماتوزوئید زنده، متحرک و بارور را محاسبه نموده و از منی منجمد با کیفیت بالا برای تلقیح مصنوعی استفاده کرد، که نتیجه آن افزایش درصد آبستنی در گاومیش های ماده متعاقب تلقیح مصنوعی می باشد. در واقع هدف از ارائه این روش ارزیابی منی، انتخاب بهترین نمونه پایوتهای منجمد می باشد که به خوبی تمام مراحل عمل آوری، انجماد و ذوب مجدد را تحمل نموده و بالاترین کیفیت را از لحاظ درصد ماندگاری، قدرت تحرک و باروری سلول های اسپرماتوزوئید موجود در خود دارا باشد (۹،۱۵).

در تحقیق حاضر میزان فعالیت آنزیمهای GOT (AST)، ALT (GPT) و LDH پلاسمای منی منجمد گاومیش های نر بالغ اکوتیپ های مختلف موجود در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گاومیش شمالغرب کشور (ایستگاه جبل) که برای تهیه اسپرم منجمد نگهداری می شوند اندازه گیری شد. در واقع با بررسی میزان فعالیت آنزیمهای مورد نظردر پلاسمای منی بلافاصله پس از جمع آوری و نیز پس ازطی فرایند انجماد، ارزیابی آزمایشگاهی کیفیت نمونه پایوت های منی منجمد تهیه شده انجام گردید.

مواد و روش کار

این تحقیق در مرکز پرورش و اصلاح نژاد گاومیش شمال و شمالغرب کشور (جبل–ارومیه) واقع در استان آذربایجان غربی انجام پذیرفت. برای انجام تحقیق حاضر از منی منجمد گاومیش های نر اکوتیپ های مختلف موجود در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گاومیش جبل (آذربایجان، خوزستان، شمال) با فواصل سنی۴/۵-۴ سال که برای عملیات اسپرم گیری از آنها استفاده می شد، انتخاب گردیدند. مشخصات گاومیش های نر مورد استفاده به تفکیک در جدول شماره ۱ آمده است.

عمل جمع آوری منی با استفاده از روش مهبل مصنوعی (مهبل مصنوعی مدل IMV، مخصوص گاومیش)درفصل پائیز (ماههای مهرو آبان) انجام گرفت. در این راستا عمل تحریک گاومیش نر مورد نظر، توسط یک راس گاومیش ماده استروس که بعنوان مانکن مقیدمی گردید، انجام شد. بلافاصله پس از جمع آوری کیفیت منی از لحاظ تراکم (با

استفاده از دستگاه شمارشگر الکترونیکی یا فتومتر دیجیتالی IMV) ونیز تحرک زیر میکروسکوپ صفحه گرم، ارزیابی وثبت گردید. پس از ارزیابی اولیه، نمونه های منی اخذ شده با استفاده از رقیق کننده تریس – زرده تخم مرغ (تریس ۲/۶۶ گرم، اسید سیتریک ۱/۴۸، گلوکز ۰/۶۴ گرم، سیستئین ۰/۱۳ گرم، زرده تخم مرغ ۲۰ میلی لیتر، گلیسرول ۷ میلی لیتر، پنی سیلین ۱۰ میلی گرم، استرپتومایسین ۰/۱ میلی گرم در ۸۲ میلی لیتر آب مقطر) رقیق گردیده و بعد از طی یک ساعت سرد شدن در دمایی معمول ۳۷ درجه سانتیگراد و اعمال زمان تعادل به مدت ۶-۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد یخچال، توسط دستگاه مدل MRS_3 ساخت فرانسه، بطور اتوماتیک در پایوت های ۰/۵ میلی لیتری (تعداد اسپرماتوزوئیدها ۴۰ میلیون در هر ۰/۵ میلی لیتر پایوت) بسته بندی شده وپس از طی فرایند انجماد در داخل تانک ازت مایع منجمد،در داخل کانتینرهای ازت مایع ۱۹۴- نگهداری شدند.

پایوت های ۰/۵ میلی لیتری منی منجمد تهیه شده را با داشتن شماره از کانتینر ازت مایع خارج کرده و برای ذوب کردن (Thawing) در داخل بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه قرداده سپس بلافاصله بعد از این مدت، میزان حرکت روبه جلو و نیزدرصد اسپرماتوزوئیدهای باآکروزوم سالم ارزیابی گردید. در این بررسی ۱۰ نمونه پایوت منی منجمداز هریک از گاومیش ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه منی ذوب شده در مرحله بعد در داخل یک لوله آزمایش تخلیه شده و به مدت ۱۰ دقیقه و در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید تا پلاسمای منی به منظور بررسی آنزیم های GOT، GPT و LDH از آن جدا گردد. پلاسمای منی جدا شده با استفاده از پیپت پاستور جدا شده و به لوله های آزمایش دیگری منتقل شد.

برای ارزیابی تحرک اسپرماتوزوئیدهای نمونه پایوتهای منجمد، بلافاصله پس از ذوب آن را خشک نموده، درب پرچ شده آنرا با قیچی بریده و یک قطره از نمونه منی را روی لام از پیش گرم ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده و با استفاده از میکروسکوپ صفحه گرم (۳۷ درجه سانتیگراد) میزان تحرک اسپرماتوزوئیدها مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوئید، به صورت تصادفی از چهار میدان میکروسکوپیک برای مشاهده درصد اسپرماتوزوئیدهای متحرک و درصد اسپرماتوزوئیدهایی با حرکت پیش رونده انتخاب و نتایج آن ثبت شد (جدول۲).

برای بررسی مورفولوژی اسپرماتوزوئیدها نمونه‌های منی منجمد از روش رنگ آمیزی گیمسا توصیف شده برای ارزیابی منی منجمد توسط Watson در سال ۱۹۷۵ استفاده گردید. برای این منظور یک قطره از پایوت ذوب شده را روی لام از پیش گرم شده قرار داده و گسترش تهیه گردید، متعاقب آن بلافاصله با دمیدن هوا خشک گردید. در مرحله بعد گسترش‌های تهیه شده با استفاده از بافر فرمال سالین (۰/۳۷ سیترات سدیم، ۰/۶۷ گرم فروکتوز در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۱درصد فرمالین) به مدت ۱۵ دقیقه فیکس گردیده و در ادامه به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه با جریان آب شستشو داده شدند.بعد از طی این مراحل، لام‌ها دوباره خشک شده و به مدت ۹۰ دقیقه با استفاده از محلول گیمسا رنگ آمیزی شدند. نمونه‌های فروتی تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند.در این راستا درصد آکروزوم‌های سالم و دست نخورده (Intact acrosome) مورد شمارش قرار گرفت. اکروزوم‌های متورم (Swollen)، کنده شده و لخت (Denuded) و چروکیده (Ruffled) به عنوان آکروزوم‌های ناسالم محسوب گردیدند(۲۰).

ارزیابی یکپارچگی غشاء پلاسمالمای اسپرماتوزوئیدهای نمونه‌های منی جمع آوری شده (Fresh) قبل از انجماد (Prefreeze) و نیز منجمد با استفاده از روش آزمایش HOS انجام گرفت. برای این منظور محلول HOS با حل کردن ۰/۷۳۵ گرم سیترات سدیم و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر با فشار اسمزی (-190 mosm/kg

انجام گرفت. آزمایش HOS برای نمونه‌های منی منجمد با مخلوط کردن ۵۰ میکرولیتر از نمونه منی رقیق شده مورد نظر پس از ذوب به ۵۰۰ میکرولیتر محلول HOS آماده شده به طریقه فوق در داخل لوله آزمایش در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بن‌ماری به مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه صورت گرفت. بعد از طی مدت یاد شده, یک قطره از نمونه منی در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی۴۰۰ موجود در ایستگاه مورد بررسی قرار گرفت. با شمارش و درصد گیری مشخص گردید که حدود دویست اسپرماتوزوئید حالت تورم (Swelling) داشتند که بصورت اسپرم‌هایی با غشاء پلاسمایی دست نخورده و با حالت دم تا خورده مشخص می‌گردید (۱۹).

برای اندازه گیری فعالیت LDH، از روش کینتیک اکسیداسیون لاکتات به پیروات استفاده گردید (کیت LDH شرکت کیمیا پژوهان). اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم LDH با استفاده از خاصیت کاتالیزوری آن در اکسیداسیون لاکتات به پیروات انجام می گیرد. در این راستا، NAD موجود در محیط احیاء شده و به NADH تبدیل می گردد. شدت این فعل و انفعال متناسب با فعالیت آنزیم تغییر می کند. غلظت NADH بوجود آمده، در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه گیری شد.برای اندازه گیری فعالیت LDH نمونه منی۱۰ میلی لیتر از تامپون به یکی از ۱۰ ویال حاوی سوبسترای موجود در کیت اضافه گردید. سپس صفر اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۴۰ نانومتر در مقابل آب مقطر تنظیم گردید. یک میلی لیتر از محلول آماده شده در کووت کاملا تمیز و فاقد مواد شوینده ریخته شده و ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده می شد. سپس ۵۰ میکوولیتر از پلاسمای منی به آن اضافه گردیده و بعد از تکان مختصر در محفظه اسپکتروفتومتر قرار داده می شد. بعد از ۲ دقیقه انکوباسیون، هر ۳۰ ثانیه یک بار (جمعا ۵ بار) جذب نوری قرائت و ثبت گردید. در پایان، میانگین تغییر جذب نوری (دلتا A) در دقیقه محاسبه و نتیجه در عدد ۳۳۷۶ ضرب می شد تا میزان فعالیت آنزیم LDH به دست آمد. (۲).

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم های GOT (AST)، (GPT ALT) از کیت GPT / GOT شرکت زیست شیمی (روش کالریمتری) استفاده گردید. برای اندازه گیری فعالیت GOT، لوله های آزمایش مطابق دستورالعمل کیت شماره گذاری و در جا لوله ای چیده شد. معرف و نمونه های پلاسمای منی طبق جدول به مقادیر ذکر شده به لوله های آزمایش وارد گردید سپس محتویات لوله ها را مخلوط کرده و پس از ۲۰ دقیقه در حرارت ازمایشگاه به همه لوله ها ۵ میلی لیتر سود ۰/۴ نرمال افزوده شده و مخلوط گردید. پس از ۵ دقیقه جذب نوری، محتویات لوله ها در طول موج ۵/۵ نانومتر مقابل آب مقطر قرائت گردید. میزان جذب نوری لوله های مختلف را در فرمولدستورالعمل کیت قرار داده و محاسبه گردید.عدد بدست آمده در محور عمودی منحنی مخصوص کیت قرار داده شد و فعالیت آنزیم از محور افقی قرائت می گردید.

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم GPT، نمونه های پلاسمای منی، مثل روش اندازه گیری فعالیت آنزیم GOT عمل می شد، با این تفاوت که بجای معرف A از معرف B استفاده می شد و فاصله زمانی افزودن پلاسمای منی و معرف C بجای ۶۰ دقیقه، ۳۰ دقیقه منظور می گردید. برای محاسبه و بدست آوردن میزان فعالیت GPT، از همان روش قبلی استفاده گردید (۲).

اطلاعات بدست آمده به صورت میانگین ± خطای نسبی (Mean ± Se) محاسبه و ارائه گردید از آزمون t جفتی (Paired t test) برای مقایسه میانگین متغیرها بین نمونه‌های تازه و ذوب شده استفاده گردید. نتایج بدست آمده برای هر متغیر به وسیله دستور GLM در برنامه نرم افزارspss نسخه۱۳ با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) بااندازه گیری مکرر با یک یا چند متغییر مورد اررزیابی قرار گرفت.

نتایج

نتایج بدست آمده در ارتباط با ارزیابی میزان تحرک اسپرماتوزوئیدها و نیز درصد اسپرماتوزوئیدها باغشای پلاسمالماوآکروزوم نرمال پس از ذوب (میانگین ± انحراف معیار)، برای تمامی نمونه های پایوت های منی منجمد گاومیش های نر تحت بررسی، به تفکیک در جدول۱ آورده شده است. همچنین نتایج بدست آمده در خصوص اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم های GOT (AST)، (GPT ALT) و LDH پلاسمای منی منجمد گاومیش های نر مورد آزمایش (میانگین ± انحراف معیار)، به تفکیک در جدول ۲ آورده شده است. پس از تحلیل داده های بدست آمده، میانگین فعالیت آنزیم های GOT (AST)، ALT(GPT)، و LDH پایوت های منی منجمد گاومیش های نر تحت بررسی به ترتیب ۱۸/۵ ± ۱۴۰/۴، ۵۸/۵ ± ۲۷۰/۴ و ۳۲/۷ ± ۹۰/۴ وپلاسمای منی تازه به ترتیب ۰/۸ ± ۳۰/۷، ۱۰/۵۸ ± ۲۱۳/۹و ۸/۱ ± ۱۰۱/۲ گزارش گردید (جدول ۲).

نتایج بدست آمده در خصوص ارتباط بین میزان تحرک اسپرماتوزوئیدهای نمونه پایوت های منی منجمد پس ازدوب (post thaw sperm motility) گاومیش های نر تحت بررسی با میزان فعالیت آنزیم های GOT, GPT ونیز LDH رابطه معکوس و معنی دار بوده،بطوری که با افزایش درصد میزان اسپرماتوزوئید های با حرکت روبه جلو میزان فعالیت آنزیم های GOT و GPT کاهش نشان میدهد (P >۰/۰۵)(جدول ۳).

نتایج بدست آمده در خصوص ارتباط بین میزان اسپرماتوزوئیدهای باغشای پلاسمالما و آکروزوم نرمال نمونه پایوت های منی منجمد پس ازدوب با میزان فعالیت آنزیم های GPT GOT, و نیز LDH رابطه معکوس و معنی دار بوده،بطوری که با افزایش درصد میزان اسپرماتوزوئید های با حرکت روبه جلو میزان فعالیت آنزیم های GOT و GPT کاهش نشان میدهد (P >۰/۰۵،جدول ۳).

جدول ۱- خصوصیات نمونه منی جمع آوری شده (میانگین ± انحراف معیار) از گاومیش های نر تحت بررسی

شماره دام	اکوتیپ	سن	حجم منی (ml)	گسترش ضخیم	تراکم اسپرماتوزوئید (در واحد جحم میلیون/ml)	تحرک اسپرماتوزوئید (درصد)	اسپرماتوزوئید با آکروزوم نرمال (درصد)	اسپرماتوزوئید زنده (درصد)
۱	آذربایجان	۵	۳/۷±۰/۳	دودی	۱۰۳۱/۳۱±۲۸	۷۹ ±۰/۷	۸۸/۸±۰/۵	۸۰/۸±۰/۶
۲	آذربایجان	۴	۲/۹±۰/۳۵	دودی	۱۲۹۰/۷±۱۰۰	۷۸/۰±۰/۴	۸۸/۶±۰/۸	۷۸/۶±۰/۸
۳	خوزستان	۵	۳/۸۵±۰/۴	دودی	۱۲۰۲±۵۸	۸۱±۰/۵۴	۸۲/۹±۰/۹	۸۲/۹±۰/۹
۴	شمال	۴	۴/۱±۰/۴	دودی	۱۲۹۰/۷±۱۰۰	۸۲/۰±۰/۴	۸۵ ±۰/۵	۷۸/۶±۰/۸
۵	شمال	۵	۳/۵±۰/۵	دودی	۱۲۰۲ ± ۵۸	۷۹±۰/۵۴	۸۲/۹±۰/۹	۸۲/۹±۰/۹

جدول۲- میزان فعالیت آنزیم های (AST) GOT، ALT(GPT) و LDH (میانگین ± انحراف معیار)پلاسمای منی تازه و منجمد گاومیش های نر مورد آزمایش

آنزیم	LDH (IU/L)	GPT (IU/L)	GOT (IU/L)
منی تازه	۳۰/۷ ± ۰/۸	۲۱۳/۹ ± ۱۰/۸۷	۱۰۱/۲ ± ۸/۱
منی منجمد	۹۰/۴±۳۲/۷	۲۷۰/۴±۵۸/۵	۱۴۰/۴±۱۸/۵

جدول۳- میزان تحرک، درصد اسپرماتوزوئیدهای زنده وبا آکروزوم سالم و نیز میزان فعالیت آنزیم های GOT، GPT و LDH پایوت های منجمد پس از ذوب به تفکیک گاومیش های نر مورد آزمایش

شماره	میزان تحرک (درصد)	اسپرماتوزوئیدها با آکروزوم نرمال (درصد)	اسپرماتوزوئیدها با پلاسمالمای نرمال (درصد)	LDH (IU/L)	GPT (IU/L)	GOT (IU/L)
۱	۵۸±۳/۴	۵۴/۱±۱/۱	۵۹±۱/۲	۳۶±۵	۱۸۱±۷/۳	۹۲ ±۴/۱
۲	۵۰±۲/۷	۵۰/۵±۰/۹	۵۸±۱/۵	۵۴±۹/۴	۱۳۰±۲۰	۱۱۴ ±۷/۳
۳	۶۰±۳	۵۶±۰/۵	۵۳/۴±۱/۹	۳۸ ±۴	۱۵۲±۱۷/۲	۱۳۲ ±۱۵/۱
۴	۴۱/۳±۱/۷	۴۶ ±۲/۷	۴۳/۶±۱/۸	۲۰۷±۳/۹	۳۲۵±۱۵/۱	۱۹۳±۱۴/۸
۵	۳۰±۵/۷	۴۰±۱/۷	۴۶/۹±۲/۲	۱۱۷±۳۷/۵	۴۶۴±۲۷/۴	۱۷۱ ±۲۶/۳

بحث

با بررسی میزان فعالیت آنزیم های مختلف موجود در پلاسمای منی منجمد، می توان گامی در جهت افزایش موفقیت برنامه های تکنیکهای تولید مثل کمک شده A.R.T ((Assisted Reproductive Techniquesاز جمله تلقیح مصنوعی برداشت. در همین راستا و با توجه به عدم پیشینه بررسی آنزیم های مختلف موجود در پلاسمای منی منجمد گاومیش، این پژوهش به منظور تعیین میانگین فعالیت آنزیم های (AST) GOT، ALT(GPT) و LDH پلاسمای منی منجمد گاومیش های نر اکوتیپ های مختلف کشور انجام گرفت. نتایج بدست آمده در خصوص ارزیابی کیفیت منی منجمد گاومیش های نر تحت بررسی از جمله ارتباط بین میزان تحرک ونیزدرصد اسپرماتوزوئیدهای باغشای پلاسمالما و آکروزوم نرمال با میزان فعالیت آنزیم های GPT GOT, ونیز LDH رابطه معکوس و معنی داری را نشان داد به طوری که با افزایش میزان فعالیت آنزیم های مذکور کیفیت منی منجمد کاهش نشان میدهد (P >۰/۰۵،جدول ۳). شارما و همکارانش در سال ۲۰۰۳ طی بررسی هایی که انجام دادندگزارش کردند که ممکن است میزان تحرک اسپرم، میزان اسپرم زنده و درصد آکروزومهای نرمال پس از انجماد کاهش یافته و فعالیت آنزیمهای (AST) GOT، ALT(GPT) و LDH در پلاسمای منی بطور معنی داری افزایش یابد،

که نشانگر خروج این آنزیمها از اسپرماتوزوئیدها می باشد (۱۶). موهان و همکاران (۱۹۹۲) گزارش نمودند که در منی با کیفیت مطلوب و قابلیت انجمادو ذوب عالی، میزان فعالیت آنزیمهای GOT (AST)، ALT(GPT) و LDH پایین می باشد (۱۳).پراتاب و همکاران (۱۹۹۹) اعلام کردندکه به دنبال فرایند انجماد و ذوب به اسپرماتوزوئیدهاآسیب وارد می شود که منجر به افزایش آنزیم هایGOT، GPT خارج سلولی می گردد (۱۴). دامی و کوداگالی (۱۹۹۰) گزارش نمودند که بین باروری منی منجمد ومیزان فعالیت آنزیم های GOT (AST)، ALT(GPT) و LDH رابطه عکس وجود دارد طوریکه با افزایش فعالیت این آنزیمها میزان باروری اسپرم منجمد کاهش می یابد(۷).

در همین راستا اختلاف میزان فعالیت آنزیم های مختلف پلاسمای منی تازه گاومیش های نر اکوتیپ های مختلف موجود در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گاومیش شمالغرب کشور (جبل) با منی منجمد قابل توجه می باشد طوری که میانگین میزان فعالیت آنزیم های GOT (AST)، GPT(ALT) و LDH پایوت منی منجمد گاومیش های نر تحت بررسی، به ترتیب۳۲/۷ ± ۹۰/۴، ۵۸/۵ ± ۱۸/۵،۲۷۰/۴ ± ۱۴۰/۴، در این راستا براساس گزارش محققین حاضر و نیز در یک بررسی مشابه و همزمان دیگر در پلاسمای منی تازه به ترتیب ۰/۸ ± ۳۰/۷، ۱۰/۵۸ ± ۲۱۳/۹و ۸/۱ ± ۱۰۱/۲ گزارش گردید (۱).

در یک تحقیق مشابه انجام گرفته توسط پیرتی و همکاران(۱۹۹۶) میزان تحرک و نیز میزان فعالیت آنزیم های پلاسمای منی منجمد قوچ، پس از ذوب مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق میزان فعالیت آنزیم های AST، ALT، ALP، ACP و LDH قبل و پس از انجماد مورد بررسی قرار گرفته است. میزان اندازه فعالیت آنزیم های AST، ALT و ACP پلاسمای منی قوچ در حدی نبوده است که برای ارزیابی منی قوچ قابل بررسی باشد. معهذا میزان اختلاف فعالیت آنزیم ALP و خصوصا LDH در طی فرایند عمل آوری و انجماد قابل توجه بود و بعنوان شاخصی برای ارزیابی منی منجمد مورد توجه قرار گرفته است(۱۸). موهان و همکاران (۱۹۹۲) قابلیت انجماد نمونه های منی را بر اساس میزان فعالیت آنزیم های پلاسمای منی گاومیش های نر مورا، گاوهای نر فریزین و دو رگه مورد بررسی قرار دادند. نتایج بدست آمده نشان داد که در هر سه گروه تحت بررسی، منی با کیفیت مطلوب و قابلیت انجماد خوب، فعالیت آنزیم ALP بالا و میزان فعالیت آنزیم های GOT (AST)، GPT) ALT) و LDH پایینی داشته است. در این تحقیق کیفیت و قابلیت انجماد بر اساس میزان تحرک اسپرماتوزوئیدها پس از ذوب ارزیابی گردیده است(۱۳) .

شارما و همکاران(۲۰۰۳) در بررسی ای که بروی نمونه منی جمع آوری شده از ۵ رأس گاومیش نر سورتی قبل و بعد از انجماد، برای ارزیابی شدت آسیب وارده به اسپرماتوزوئیدها انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که تحرک اسپرم، میزان اسپرم زنده و درصد آکروزومهای نرمال پس از انجماد کاهش و فعالیت آنزیم های GOT (AST)، ALT (GPT) و LDH در پلاسمای منی بطور معنی داری افزایش می یابد که نشانگر نشت این آنزیم ها از اسپرماتوزوئیدها می باشد(۱۷). دامی وساهنی در سال ۱۹۹۴ در تحقیقی که به منظور بررسی ارتباط بین قابلیت انجماد، میزان فعالیت آنزیم ها و باروری منی گاومیش نر و نیز تاثیر رقیق کننده های مختلف در این انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که بین باروری منی منجمد و فعالیت آنزیم های GOT (AST)، ALT (GPT)، LDH، AKP و ACP رابطه معکوس وجود دارد، بطوریکه با افزایش فعالیت این آنزیم ها، میزان باروری اسپرم منجمد پایین می آید. محققین یادشده بیان داشته اند که می توان از ارزیابی میزان فعالیت آنزیم های LDH، GOT و AKP برای ارزیابی قابلیت انجماد و میزان باروری استفاده کرد (۸).

کاکار و آناند در سال ۱۹۸۴ با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، ساختار اسپرماتوزوئیدها را قبل و بعد از انجماد مورد ارزیابی قرار دادند. در این بررسی ۸۰ درصد از

اسپرماتوزوئیدها قبل از انجماد دارای سر نرمال بودند در حالی که متعاقب فرایند انجماد و ذوب تعداد بیشتری از این اسپرماتوزوئیدها دچار آسیب شدند، بطوری که فقط در ۲۲ درصد اسپرماتوزوئیدها ساختار اکروزوم، نرمال باقیمانده مانده بود. در این بررسی بین میزان نشت آنزیم های هیالورونیداز، GOT، GPT و آکروزین به مایعات خارج سلولی و آسیب وارده به آکروزوم اسپرماتوزوئیدها رابطه مستقیمی گزارش گردید(۱۰).

دامی و کوداگالی (۱۹۸۸) با بررسی ای که بر روی نمونه اسپرم منجمد ۴ راس گاومیش نر سورتی انجام دادند، نشان دادند که میزان آبستنی بطور معنی داری با غلظت آنزیم های (GPT(ALT ،GOT (AST)، LDH و ALP پلاسمای منی در ارتباط می باشد. بطوریکه نرخ آبستنی با افزایش مقادیر GOT و LDH افزایش و برعکس با افزایش مقادیرALP و ACP کاهش می یابد در این تحقیق میزان باروری اسپرماتوزوئید ها با فعالیت انزیم های GOT و LDH اولیه نمونه های منی رابطه مستقیم داشته، طوری که هرچه میزان فعالیت اولیه این دو آنزیم بیشتر باشد، میزان باروری بیشتر است. این محققین نشان دادند که هر چه میزان فعالیت انزیم های GOT و LDH پلاسمای منی جمع آوری شده بیشتر باشد، میزان باروری اسپرم بالاتر خواهد بود؛ در حالیکه افزایش این میزان پس از انجماد و ذوب، باروری را کاهش داده و این امر حاکی از آسیب وارده به اسپرماتوزوئیدهاست(۶).

سانسون وهمکاران (۲۰۰۰) گزارش دادند که میزان باروری در گاو میش ارتباط معکوس ومعنی داری با میزان فعالیت آنزیم های (GPT(ALT ،GOT (AST)، LDH و ALP پلاسمای منی داشته و به نظر میرسد مقادیر آزاد شدن این آنزیم ها می تواند شاخصی برای ارزیابی قابلیت انجماد و باروری منی منجمد باشد(۱۶).

بوسرکار و همکاران (۱۹۹۱) با بررسی نمونه منی ۱۰ راس گاومیش نر ۴-۵ ساله که با فاصله ۴ روز اخذ و پس از عمل آوری در رقیق کننده egg yolk glycerol tris fructose citric acid توسط بخار نیتروژن مایع منجمد می گردید، گزارش کردند که فصل بطور معنی داری بر درصد اسپرماتوزوئیدهای زنده، نرمال و با آکروزوم های سالم موثر است. انجماد درصد اسپرماتوزوئیدهای زنده و نرمال را کاهش و درصد اسپرماتوزوئیدهای غیرنرمال را افزایش داد. میزان فعالیت آنزیم GOT پلاسمای منی با انجماد افزایش می یابد و منی در فصل پاییز (ماههای سپتامبر و نوامبر) بهترین کیفیت را دارد و پس از فصل پاییز به ترتیب فصول بارانی، تابستان و زمستان در رتبه های بعدی قرار می گیرد (۵).

دوبه و همکاران در سال ۱۹۸۲ گزارش کردند که رابطه معنی داری بین میزان فعالیت آنزیم LDH پلاسمای منی و کیفیت منی پس از انجماد وجود دارد؛ و این نشان می دهد که فعالیت LDH در پلاسمای منی با فعالیت متابولیک اسپرم رابطه مستقیم دارد که به نظر می رسد نتایج محققین فوق با نتایج تحقیق حاضر همخوانی ندارد(۹).

به طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم های (GPT) ALT ،GOT (AST) و LDH نمونه پایوت های منجمد پس از ذوب، می تواند بعنوان یک شاخص در ارزیابی کیفیت نمونه های منی منجمد گاومیش خصوصاً با توجه به اینکه امروزه استفاده ازسایر رقیق کننده های جدید و عاری از منبع پروتئین حیوانی (زرده تخم مرغ) بیشتر مد نظر می باشد مورد استفاده قرار گرفته و راه را برای تحقیقات بعدی در خصوص ارائه یک روش ارزیابی قابل قبول هموار سازد.

منابع

۱- محمدزاده خلخالی، رضا (۱۳۸۴). بررسی آنزیم های GOT، GPT، و LDH پلاسمای منی گاومیش های نر بالغ اکوتیپ های مختلف ایستگاه اصلاح نژاد گاومیش شمالغرب کشور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی ارومیه، پایان نامه شماره ۶۹۵

۲- مجابی، علی (۱۳۷۹). بیوشیمی درمانگاهی دامپزشکی، ویراست دوم، انتشارات نوربخش صفحات ۸۹-۹۱ و ۱۷۳-۱۷۵.

3- Aguiar,P.H.P., Andrade,V.J., Abreu,J.J., Gomez, N.B.N., (1994). Physical and morphological semen characteristic of buffaloes aged from four to eight years old. Proc. 4th int. Buffalo congress. sao Paulo, Brazil 3:486-488.

4- Alexiev, A.I., Kolev, S.I., Danev, A.D., Stojanova. M., (1994). Characteristics of buffalo bulls sperm production in Bulgaria. Proc.4 th Int. Buffalo congr., Sao Paulo, Brazil 3:492-494.

5- Bhosrekar, M.R, Mokashin S., Purohit J.R., Gokhale S.B., Mangurkar B.R. (1991). Studies on the deep breezing and seasons on the leakage of aspartate amino transferase into extracellular medium and sperm morphology of murrah buffalo bulls. Animal Reproduction Science, 26(3-4): 219-226.

6- Dhami, A.J., and Kodagali, S.B., (1988). Studies on seminal enzymatic profiles and its relationship with fertility of Surti buffalo bulls. Indian Journal of Animal Production ., 9(4): 24-29.

7- Dhami, A.J., Kodagali, S.B., (1990). Freezability enzyme leakage and fertility of buffalo spermatozoa in relation to the quality of semen ejaculates and extenders. Theriogenology, 34(5): 853-863.

8- Dhami, A.J.,Sahni, k.l .,(1994).Effect of various cooling (from 30Ċ to 5Ċ), equilibration and diluent treatments on freezability , post-thaw thermorssistance, enzyme leakage and fertility of bubaline spermatozoa. Buffalo J. 2: 147-159

9- Dube, GD., Pareek, P.K., Dwaraknath, P.K., Vyas, K,K., (1982). Lactic dehydrogenase in relation to semen quality. Indian Journal of Dairy Sience, 35(1): 80-82.

10- Kakar, S.S., Annand, S.R., (1984). Acrosomal damage and enzyme leakage during freeze preservation of buffalo spermatozoa. Indian Journal of Experimental Biology., 22(4): 5-40.

11- Kumar, S., Sahni, K.L,Benjamin, B.N., Mohan, G., (1993). Effect of various levels of yolk on deep freezing and storage of buffalo semen in different diluters without adding glycerol. Buffalo J.4: 79-85.

12- Misra, A.K., Patel, S.H., Joshi, B.V., Jaswal, R.S., Trivedi, K.R., (1994). Buffalo semen characteristics and its freezability under Indian conditions. Proc. 4 th Int. Buffalo congr., Sao Paulo, Brazil 495-497.

13- Mohan, G., Sahni, K.L., Dhami, A.J., Tripati, R.P., (1992). Prediction freezability on the basis of seminal plasma enzymatic profiles in Murrah, Friesian and Croossbred Bulls. Indian Journal of animal Sciences, 62(9): 811-815.

14- Pratap, N., Reddy, V.N.V., Sharma, P.A., Honnappa, T.g., Devaraj, M., Krishnaswamy, A., Arora, V.K., Pratap,N., (1999). Estimation of transaminases (ALT and AST) in cryopreserved Murrah buffalo semen. Indian journal of animal reproduction, 20(2): 150-160.

15- Rattan, P.J.S., (1990). Physico – Chemical constituents of buffalo bull semen. In: Acharya,

R.M., Lokeshwar, R.R., Kumar, s. (Eds), Recent Advances in Buffalo Research 3: 26-30.

16- Sanson,G., Nastri,M.J.F., Fabbrocini,A(2000). Storage of buffalo(Bubalus Bubalis) semen. Animal Reproduction Science, 62:55-76

17- Sharma, R., Pareek, P.K., Tailor, S.P., Perohit, G.N., Sharma, R., (2003). Studies on seminal enzyme (GOT, GPT and LDH) profile and its relationship with acrosomal integrity In Surti buffalo bull semen. Indian Journal of Animal Reproduction, 24(1): 75-76.

18- Upreti, G.C; Payne, S.R., Duganzich, D.M., Oliver, J.E., Smith, J.F., (1996). Emzyme leakage during cryopreservation of farm spermatozoa. Animal Reproduction science. 41(1): 27-36.

19- Vale, W.G., (1994). Collection, processing and deep freezing of buffalo semen.Buffalo J 2: 65-72.

Watson, P.F.; (1975): Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. Vet. Record. 197: 12-15.