ارزیابی اثر افزودن سطوح مختلف اسیدهای چرب n-۳ به رقیق کننده بایوکسل بر قابلیت انجماد اسپرم بز

مهدی انصاری[1*]، آرمین توحیدی[1]، محمد مرادی شهر بابک[1]

۱. گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: m.ansari@alumni.ut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۸۹/۱۲/۲۸، پذیرش نهایی: ۹۰/۳/۱۸)

چکیده

هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر افزودن سطوح مختلف اسیدهای چرب n-۳ به رقیق کننده بایوکسل بر قابلیت انجماد اسپرم بز بود. ٦ رأس بز بالغ مهابادی برای جمع‌آوری اسپرم انتخاب شده و اسپرم‌گیری به‌وسیله مهبل مصنوعی انجام گرفت. پس از ارزیابی شاخص‌های کیفی، اسپرم‌ها مخلوط و به ٤ گروه مساوی تقسیم شد. گروه‌های تیماری شامل سطوح ۰، ۰/۱، ۱ و ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر اسید چرب بودند. فراسنجه‌های تحرک و تحرک پیشرونده، زنده‌مانی و درصد اسپرم‌های ناهنجار ارزیابی شده و نرخ بازیافت اسپرم محاسبه شد. داده‌ها به وسیله Proc GLM نرم افزار SAS مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میانگین درصد تحرک و نرخ بازیافت گروه ng/ml ۱۰ به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه ۰، ۰/۱ و ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر بود. درصد تحرک پیشرونده در گروه‌های ۱۰ و ۰/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری بالاتر از صفر و ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر بود. درصد زنده‌مانی در سطح ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری پایین‌تر از سطوح دیگر بود. درصد اسپرم‌های ناهنجار بین سطوح مختلف اسید چرب تفاوت معنی‌داری نداشت. نتایج نشان داد که افزودن سطح ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر اسیدچرب قابلیت انجماد اسپرم بز را بهبود می‌بخشد.

مجله علوم تشخیصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۹، دوره ٤، شماره ٤، پیاپی ١٦، صفحات: ۱۰۱۷-۱۰۱۳.

کلید واژه‌ها: اسیدهای چرب n-۳، قابلیت انجماد، منی، بایوکسل

مقدمه

یکی از فناوری‌های مهم جهت حفظ و نگه‌داری ذخایر ژنتیکی، انجماد اسپرم است. اسپرم‌های منجمد، جهت تلقیح مصنوعی باید از کیفیت لازم جهت تلقیح مصنوعی برخوردار باشند. بنابراین فرایند انجماد اسپرم فناوری دقیق و ماهرانه‌ای است که طی چند دهه اخیر برای بهبود آن فعالیت-های عمده‌ای صورت گرفته است، اما کماکان میزان بازیافت اسپرم پس از انجماد رضایت بخش نبوده و باید بهبود یابد. مهم‌ترین مزیت فرایند انجماد، جلوگیری از کاهش توان زنده-مانی اسپرم‌ها در طی یک دوره زمانی طولانی مدت می‌باشد. اهمیت فرایند انجماد اسپرم به عنوان فرایندی که مانع از آسیب رساندن به سلول اسپرم و همچنین کاهش تنش‌های ناشی از تغییرات سلولی می‌باشد، واضح است. اسپرم در منی رقیق نشده، برای زمان کوتاهی زنده می‌ماند و سرد کردن آهسته منی تا دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سبب مرگ بسیاری از اسپرم‌ها می-شود. بنابراین، مایع رقیق کننده، افزون بر این که باید برای رقیق

کردن مناسب باشد، لازم است که اسپرم‌ها را در خلال سرد شدن حفظ کند و دوره زنده‌مانی آن‌ها را افزایش دهد.

در اغلب گونه‌های پستانداران بخش اعظم اسیدهای چرب غشای اسپرم، اسیدهای چرب بلند زنجیر غیراشباع است که بیشتر شامل سری‌های n-۳ می‌باشند. در بیشتر پستانداران از جمله نشخوارکنندگان اسید دوکوزاهگزاانوئیک (C22:6 n-3، Docosahexaenic acid)، اسیدچرب غالب فسفولیپیدهای غشای اسپرم است، به طوری که بالغ بر ٦٠ درصد از کل اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه را تشکیل می‌دهد (٥). به طور کلی در ترکیب اسیدهای چرب پرندگان اهلی، وجود مقدار زیادی اسیدهای چرب n-٦ به اثبات رسیده است، در حالی که در پستانداران اهلی مقدار زیادی اسیدهای چرب غیر اشباع n-۳ وجود دارد. شواهد نشان دهنده این مطلب است که کاهش در مقدار اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه (Polyunsaturated fatty acid) باعث کاهش در تعداد، تحرک و قابلیت انجماد اسپرم‌ها در بسیاری از گونه‌های اهلی پستانداران می‌شود (٨).

Connor و همکاران (١٩٩٨)، با تجزیه اسید چرب قسمت سر و دم اسپرماتوزوئید نشان دادند که اسید دوکوزاهگزاانوئیک به ترتیب ١/١ و ١٩/٦ درصد مجموع اسیدهای چرب سر و دم اسپرماتوزوئید را تشکیل می‌دهد (٦). از آنجا که چربی‌ها نقش مهمی در تمامیت، سیالیت، ثبات و نفوذپذیری غشا دارند، آنها این فرضیه را ارائه نمودند که ممکن است تراکم انتخابی اسید دوکوزاهگزاانوئیک با داشتن پیوندهای دوگانه بیشتر در دم اسپرم برای افزایش سیالیت غشاء، که لازمه خمش و انعطاف دم است، مورد نیاز باشد. این خمش و انعطاف برای تحرک اسپرم لازم است.

Perez-pe و همکاران (٢٠٠١)، نشان دادند که مصرف اسید لینولئیک در جیره، مانع از پدیده شوک سرمایی و بهبود سیالیت غشاء می‌شود و قابلیت زنده ماندن اسپرماتوزوئید را بالا می‌برد (١٠). بهبود سیالیت غشاء به نوبه خود سبب پاسخ‌دهی بهتر اسپرم به گنادوتروپین‌ها می‌شود. Amorim و همکاران (٢٠٠٨)، اثرات اضافه کردن کلسترول، ویتامین A، روغن کبد ماهی کاد و روغن بزرک را بر بقاء اسپرم گاو نر پس از انجماد مورد بررسی قرار دادند. افزودن کلسترول به نمونه‌های اسپرم قبل از فرایند انجماد موجب افزایش زنده‌مانی اسپرم پس از فرایند انجماد-ذوب شد (٣). در مطالعه‌ای که توسط Badr و همکاران (٢٠٠٤) انجام گرفت، اضافه کردن اسیدهای چرب غیراشباع و کلسترول به محیط رقیق کننده انجمادپذیری و قدرت باروری اسپرم قوچ در شرایط برون تنی را بهبود بخشید (٤). بر خلاف آن، استفاده از زرده تخم‌مرغ غنی از امگا-٣ در رقیق‌کننده اسپرم خوک نتوانست انجمادپذیری آن را بهبود بخشد (٩). با توجه به در دسترس نبودن اطلاعات کافی در مورد بز، هدف از این مطالعه، بررسی اثر افزودن سطوح مختلف منبع اسیدهای چرب n-۳ به رقیق‌کننده تجاری بایوکسل بر قابلیت انجماد اسپرم بز مهابادی بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ٥ تکرار انجام گرفت. جمع‌آوری منی پس از عادت دادن بزها، به وسیله مهبل مصنوعی صورت گرفت. بلافاصله پس از جمع‌آوری منی نمونه‌ها در داخل بن ماری با دمای ٣٢ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پس از ارزیابی اولیه و داشتن استانداردهای مناسب انجماد (تحرک بالاتر از ٧٠٪)، نمونه‌های منی با هم مخلوط شده و به ٤ گروه مساوی تقسیم شدند. از بایوکسل (Bioxcell®, Aigle, IMV, France) به عنوان رقیق کننده پایه استفاده گردید. گروه‌های تیماری شامل سطوح ٠، ٠/١ ، ١ و ١٠ نانوگرم در هر میلی‌لیتر اسیدچرب n-۳ (Viva PharmaceuticalInc, Canada) بود. منی رقیق‌شده به مدت ٣ ساعت تا دمای ٥-٤ درجه سانتی‌گراد سرد شد. نمونه‌ها در داخل پایت‌ها (٠/٥ میلی‌لیتری و $١٠^{٦}$× ١٠٠ اسپرم در هر پایت) ریخته شده و در رک قرار داده شد. با استفاده از جعبه پلی استیرن رک‌های محتوی نمونه،

در معرض بخار نیتروژن مایع در ارتفاع ٤ سانتی‌متری بالای نیتروژن مایع به مدت ٨ دقیقه قرار گرفته و سپس در نیتروژن مایع غوطه ورشدند (١١).

اندازه‌گیری فراسنجه‌های منی

الف) تحرک اسپرم

نمونه‌ای از منی تازه در سرم فیزیولوژیک (نمک طعام ٠/٩ درصد) به نسبت ١ به ١٠٠ رقیق شد. لام و لامل از قبل روی صفحه گرم در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرم شده و ٢٠ میکرولیتر از نمونه رقیق شده منی روی لام تمیزی قرار داده شد. جهت تعیین تحرک اسپرم در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ١٠٠ مورد بررسی قرار می‌گرفت. حداقل ١٠ میدان میکروسکوپی برای تخمین صحیحی از درصد تحرک، مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت. تخمین درصد سلول‌های متحرک، بر اساس تجربه از روی میدان‌های مشاهده شده صورت می‌گیرد. این کار در دمای ٣٧ درجه و همچنین پس از ذوب تکرار شد.

ب) حرکت پیشرونده اسپرم

جهت تعیین درصد اسپرم‌های با تحرک پیشرونده در نمونه منی تازه و نمونه ذوب شده از روش چشمی و با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ٢٠٠ استفاده گردید. حداقل ١٠ میدان میکروسکوپی برای تخمین صحیحی از درصد تحرک پیشرونده اسپرم، مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت.

ج) اسپرم‌های ناهنجار

قطره کوچکی از محلول ٢/٩ درصد سیترات سدیم روی یک لام گرم قرار داده شد. یک پایت خالی به سطح نمونه منی نزدیک شد تا مقداری اسپرم به آن بچسبد و سپس انتهای این پایت به درون محلول سیترات سدیم روی لام فرو برده شد تا اسپرم و سیترات سدیم به خوبی مخلوط شوند. به کمک یک لام دیگر، مخلوط اسپرم و سیترات سدیم به صورت یک لایه بسیار نازک روی لام اول پخش شد. پس از آن لام‌ها از یکدیگر جدا شده و لام اول روی صفحه گرم قرار داده و خشک شد. با شمارش ١٠٠ اسپرم در هر لام و به کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ٤٠٠، درصد اسپرم‌های ناهنجار تعیین شد. حداقل ١٠ میدان میکروسکوپی برای تخمین صحیحی از درصد اسپرم‌های ناهنجار، مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت.

د) تعیین درصد اسپرم زنده و مرده

جهت اندازه‌گیری درصد اسپرم زنده و مرده در نمونه منی تازه و نمونه ذوب شده از رنگ ائوزین- نیگروزین تجاری برای رنگ‌آمیزی اسپرم‌ها استفاده شد. قطره کوچکی از رنگ روی یک لام گرم قرار داده شد. یک پایت خالی به سطح نمونه منی نزدیک شد تا مقداری اسپرم به آن بچسبد و سپس انتهای این پایت به درون رنگ روی لام فرو برده شد تا اسپرم و رنگ به خوبی مخلوط شوند. به کمک یک لام دیگر گستره بسیار نازکی از نمونه منی تهیه شده و لام به سرعت خشک گردید تا اسپرم‌های زنده در اثر رنگ از بین نرفته و رنگ‌آمیزی نشوند. برای خشک شدن سریع، لام روی صفحه گرم با دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد گذاشته می‌شود. درصد اسپرم‌های زنده و مرده در حداقل ١٠ میدان از لام و با شمردن حداقل ٣٣٣ اسپرم تعیین شد. اسپرم‌هایی که سر آن‌ها اندکی رنگ گرفته بود نیز جزء اسپرم‌های مرده در نظر گرفته شدند.

ه) تعیین میزان بازیافت اسپرم پس از انجماد:

برای تعیین درصد بازیافت اسپرم پس از انجماد از فرمول زیر استفاده شد (٧):

$$\text{درصد بازیافت} = \frac{\text{درصد جنبایی بعد از ذوب}}{\text{درصد جنبایی قبل از انجماد}} \times 100$$

یافته‌ها، بحث و نتیجه‌گیری

بین سطوح مختلف اسیدهای چرب امگا-۳، در میانگین درصد اسپرم‌های جنبا، درصد اسپرم‌های با تحرک پیشرونده، درصد اسپرم‌های مرده و زنده پس از انجماد، گروه دریافت کننده ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با سایر گروها به طور معنی‌داری بیشتر بود. احتمالاً اضافه کردن اسیدهای چرب n-۳ به رقیق کننده اسپرم و افزایش محتوای اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه (PUFA) و اسید دوکوزاهگزاانوئیک (DHA) غشا اسپرم، باعث افزایش قابلیت انعطاف و سیالیت غشا شده و در نتیجه اثر نامطلوب انجماد بر زنده‌مانی و ظاهر ناهنجار را کاهش می‌دهد. برای توجیه افزایش تحرک و کاهش زنده‌مانی اسپرم در اثر استفاده از اسیدهای چرب n-۳ می‌توان اظهار داشت که با افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای پلاسمایی پوشش دهنده سر و دم اسپرم و بهبود سیالیت و قابلیت فشردگی غشا، بالابردن توانایی سازگاری غشای پلاسمایی با حرکات فلاژلوم اسپرم، اثرگذاری در تأمین انرژی و برخی مواد و مشتقاتی که در تسهیل و افزایش تحرک اسپرم دخالت دارند، اعمال می‌گردد. اثرات مثبت اسیدهای چرب n-۳ بر خصوصیات اسپرم، می‌تواند به علت افزایش دادن سیالیت و قابلیت فشردگی به غشای اسپرم و افزایش انعطاف پذیری دم آن باشد این انعطاف پذیری باعث افزایش قدرت تحمل انجماد و ممانعت از پاره شدن و مرگ سلولی در اثر تشکیل کریستال‌های یخ در طی انجماد می‌شود. این آزمایش نشان داد که بین سطوح مختلف اسیدهای چرب امگا-۳ از لحاظ توانائی حفظ کیفیت اسپرم در طی مراحل انجماد اختلاف وجود دارد. نصیری و همکاران (۱۳۸۷) نشان دادند که استفاده از منبع اسیدهای چرب امگا-۳ در محیط نگه‌دارنده، ویژگی‌های برون‌تنی منی را پس از انجماد-ذوب بهبود می‌بخشد (۲). از طرفی تغذیه منبع اسیدهای چرب n-۳ نیز کیفیت منی و انجمادپذیری آن را در گاو بهبود داده است (۱). در مجموع چنین استنباط می‌شود که اسیدهای چرب n-۳ در حفاظت از اسپرم در طی مراحل انجماد-ذوب مؤثر بوده و مصرف آن چه به صورت برون تنی یا درون تنی، قابلیت انجماد اسپرم را در گونه‌های نشخوارکنندگان از جمله بز بهبود خواهد داد.

جدول ۱- میانگین درصد فراسنجه‌های کیفی اسپرم در سطوح مختلف اسید چرب پس از انجماد

فراسنجه کیفی منی / تیمار	تحرک منی (SEM=۰/۷۹)	تحرک پیش رونده (SEM=۰/٦٨)	زنده مانی (SEM=۰/۲۹)	ناهنجاری (SEM=۰/۱۸)	نرخ بازیافت (SEM=۱/۷٤)
۱۰ (ng/ml)	٤٨/٦١ a	٣٩/٤٤ a	٦٢/٠٢ a	٤/٦٢	٣٥/٥ a
۱ (ng/ml)	٤٥/٢٧ b	٣٦/٩٤ b	٦٠/٠١ b	٤/٦٤	٢٦/٥٦ bc
۰/۱ (ng/ml)	٤٦/١١ b	٣٧/٧٧ ab	٦١/٥٧ a	٥/١٦	٢٩/٦٣ b
۰ (ng/ml)	٤٣/٨٨ b	٣٥/٨٣ b	٦١/٤٥ a	٤/٨٥	٢٣/٤٤ c

abc: در هر ستون، میانگین‌هایی که حروف مشترک ندارند، اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) دارند.

سپاسگزاری

از زحمات کارشناسان مرکز اصلاح نژاد کشور به ویژه جناب آقایان دکتر بحریني و مهندس میرزاخاني و همه عزیزاني که در مراحل مختلف این تحقیق یار و یاور ما بوده‌اند، کمال تشکر و قدرداني را می‌نماییم.

منابع

۱. خوشوقت، ع. ۱۳۸۷. اثر تغذیه منبع اسیدهای چرب n-۳ بر خصوصیات کمی و کیفی و ترکیب اسیدهای چرب اسپرم و میل جنسی در گاو هلشتاین. پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام. گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

۲. نصیری، ا. ح. ۱۳۸۷. اثر افزودن منبع اسیدهای چرب n-۳ و ویتامین E به رقیق کننده بر قابلیت انجماد اسپرم گاو هلشتاین. پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام. گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

3. Amorim, E.A.M, Graham, J., Spizziri, B., Meyers, M., Amorim, L.S. and Torres, C.A.A. 2008. The effect of Adding Cholestrol, Vitamin A, Cod liver or Flax Oil Loaded Cyclodextrin on Bull Sperm Cryosurvival. 16th Congress on Animal Reproduction, Hungary, p: 29.
4. Badr, M.R., Abdel-Malak, M.G. and Shaker, M. H. 2004. Influence of some fatty acids and cholesterol addition to semen extender on freezability and *in vitro* fertilizing potential of ram spermatozoa. Assiut Vet. Med. J. 50: 304-318.
5. Castellini, S., Lattaioli, P., DalBosco, A., Minelli, A. and Mugnai. C. 2002. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acid. Reprod. Nutr. Develop. 43: 91–103.
6. Connor, W.E., Lin, D.S., Wolf, D.P. and Alexander, M. 1998. Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm. Journal of Lipid Research, 39: 1404-141.
7. Hafez, B. and Hafez, E.S.E. 2000. Reproduction of farm animals. P123-158, seventh edition. Lippincott Williams and Wilkins, Phyladelphia.
8. Kelso, K.A., Cerolini, S., Noble, R.C., Sparks, N.H.C. and Speake. B.K. 1996. Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. Reprod. Fert. 106: 201-206.
9. Maldjian A., Pizzi, F., Gliozzi, T., Cerolini, S., Penny, P. and Noble, R. (2005): Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. Theriogenology, 63: 411-421.
10. Perez-Pe, R., Cebrian-Perez, J.A. and Muino-Blanco, T. 2001. Semen plasma proteins prevent cold shock membrane damage to ram spermatozoa. Theriogenology, 56: 425-434.
11. Purdy P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Res. 63: 215–225.