نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۳ شماره ۴/ سال۱۳۹۲

اثر آنتی اکسیدانی ملاتونین بر فراسنجه‌های اسپرم گاومیش پس از فرآیند انجماد- یخ گشایی

صادق تجویدی عصر[۱]، حمید کهرام[۲*]، رحیم بهشتی[۳] و ایرج اشرفی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲٤ تاریخ پذیرش: ۹۲/٤/۳۱

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، شبستر، ایران

[۲] استادیار گروه علوم دامی دانشگاه تهران، کرج، ایران

[۳] استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، شبستر، ایران

[٤] عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

[*] مسئول مکاتبه: E-mail: hamid_kohram@yahoo.com

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی اثر آنتی اکسیدانی غلظت های مختلف ملاتونین بر فراسنجه های اسپرم گاومیش پس از فرآیند انجماد- یخ گشایی انجام شد. نمونه های منی گاومیش پس از جمع آوری، با دو نوع رقیق کننده تریس- سیترات- زرده تخم مرغ و بایوکسل به همراه غلظت‌های مختلف ملاتونین (۰، ۱، ۵۰ و ۱۰۰میکرو مول) رقیق و تا ۵ °C سرد و سپس در معرض بخار ازت منجمد قرار گرفته و در نهایت در تانک ازت مایع ذخیره شدند. یخ گشایی با استفاده از حمام آب گرم ۳۷°C و در طی ٤٥ ثانیه انجام گرفت. فراسنجه های تحرک اسپرم، قابلیت زنده مانی ، یکپارچگی غشای پلاسمایی و آکروزم به ترتیب توسط میکروسکوپ فاز مقایسه‌ای، رنگ آمیزی سوپراویتال، تست التهابی هیپواسموتیک و واکنش آکروزمی پلاسما در زمان های صفر و ٦ ساعت پس از یخ گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده هر دو نوع رقیق کننده حاوی سطوح مختلف ملاتونین نسبت به گروه شاهد به طورمعنی‌داری (P<۰/۰۵) باعث بهبود توانایی انجماد اسپرم شدند. غلظت ۱۰۰ میکرومول در زمان صفر بعد از یخ گشایی و ٦ ساعت پس از یخ-گشایی در هر دو نوع رقیق کننده بیشترین بهبود (P<۰/۰۵) را در ویژگی‌های ارزیابی شده داشت. نتیجه گیری در یک سطر آورده شود و در چکیده انگلیسی هم لحاظ شود

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدان، منی گاومیش، محافظت از انجماد، ملاتونین

مقدمه

درسیستم های صنعتی پرورش دام های اهلی، تلقیح مصنوعی نقش مهمی در کنترل تولیدمثل دارد. به دلیل قابلیت انجماد و باروری ناچیز اسپرم گاومیش در مقایسه با گاو، کاربرد تلقیح مصنوعی با منی منجمد- یخ‌گشایی شده گاومیش در یک مقیاس محدود گزارش شده است (کاکار و آناند ۱۹۸۱ و موئر و همکاران ۱۹۸۸ و اندرابی و همکاران ۲۰۰۸ و احمد و همکاران ۲۰۰۳ و کومارسان و همکاران ۲۰۰۵). انجماد و ذخیره اسپرم، شامل قراردادن اسپرم در ازت مایع و در نتیجه توقف واکنش‌های متابولیکی آن است. با کاهش و یا توقف متابولیسم اسپرم طول عمر باروری آن‌ها افزایش

می‌یابد و در نتیجه می‌توان از آنها برای مدت زمان طولانی‌تری استفاده نمود. حفظ انجمادی اسپرم تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی را در غشای اسپرم به وجود می‌آورد که در نتیجه آن زنده‌مانی اسپرم را بعد از انجماد-یخ گشایی تحت تاثیر قرار می‌دهد (هالت ۲۰۰۰) .

یکی از عواملی که می‌تواند موجب تخریب غشای پلاسمایی، اختلال در حرکت و دیگر فعالیت‌های اسپرماتوزوییدها شود، رادیکال‌های آزاد هستند. ایجاد تعادل بین تولید رادیکال های آزاد و فراورده‌های گروه-های واکنش اکسیژنی و سم زدایی آنها توسط آنتی اکسیدان‌ها، یک عامل مهم در بقای سلول اسپرم و عملکرد آنها، قبل و بعد از حفاظت انجمادی می‌باشد که به هم خوردن این تعادل باعث استرس اکسیداتیوی می‌شود (آیتکن ۱۹۹۵) .

با پیشرفت در تکنیک تلقیح مصنوعی، منی برای تولید حداکثر تعداد دوزها از یک انزال رقیق می‌شود و تکرار این عمل باعث کاهش غلظت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی اسپرم شده و در نتیجه اسپرم‌ها آسیب‌پذیر می شوند. وقتی اسپرم در طی محافظت سرمایی در معرض آسیب قرار می‌گیرند شرایط برای تولید ROS افزایش می‌یابد و از طرف دیگر کمبود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در منی رقیق شده شرایط را آسیب‌پذیرتر می‌نماید. بنابر این برای برگشت شرایط منی به حالت اول اضافه نمودن سطوح طبیعی آنتی‌اکسیدان‌ها در فرایند انجماد منی ضروری به نظر می‌رسد (ایجاز و همکاران ۲۰۰۹). مطالعات زیادی بر خاصیت آنتی اکسیدانی ملاتونین تاکید کرده (آلگرا و همکاران ۲۰۰۳ و جاکنات و همکاران ۲۰۰۵) و تاثیر مثبت آن در حفاظت از اسپرم در طی فراوری را گزارش کرده اند (اشرفی و همکاران ۲۰۱۱ و سونمز و همکاران ۲۰۰۷ و رامادان و همکاران ۲۰۰۹). بنابر این هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر دوزهای مختلف ملاتونین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در رقیق‌کننده منی گاومیش بود.

مواد و روش

تهیه نمونه منی و فرآوری آن

نمونه‌های منی بوسیله یک واژن مصنوعی از ٤ گاومیش بالغ (۲ تا ٤ سال) در فصل تولیدمثل (اواخر پاییز و اوایل زمستان) در مرکز تحقیقات گاومیش جبل ارومیه جمع‌آوری شد. بعد از تحریک اولیه که شامل ۳ پرش کاذب و ممانعت شدید از جفت‌گیری بود، به گاومیش نر اجازه داده شد که بر روی گاومیش ماده پرش انجام دهد. بعد از جمع‌آوری، نمونه‌های منی خام در عرض ۱ دقیقه به آزمایشگاه منتقل شده و برای آزمایش در حمام آب ۳۷°C نگهداری شد. پس از بررسی فراسنجه های حرکتی، مورفولوژی و غلظت نمونه های منی استحصالی، بمنظور حذف اثر دام از آزمایش نمونه‌های طبیعی با هم مخلوط شده در رقیق کننده های آماده شده در ۳۷°C در ۱۰ دقیقه بعد از جمع‌آوری رقیق شدند. در این تحقیق از دو نوع رقیق کننده استفاده شد. برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر رقیق کننده تریس-زرده تخم مرغ، ۳/۰۲۸ گرم تریس، ۱/٦۷۵ گرم اسید سیتریک، ۱/۲۵ گرم فروکتوز، ۱۰۰،۰۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین G، ۱۰۰،۰۰۰ میکروگرم استرپتومایسین سولفات را در ۵۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر شده حل کرده و بعد از افزودن ۲۰ میلی لیتر زرده تخم مرغ و ۷ میلی لیتر گلیسرول محلول به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. رقیق کننده تجاری بایوکسل بر اساس دستور عمل شرکت سازنده، با نسبت ۱ به ٤ با آب دوبار تقطیر شده تهیه شد. رقیق سازی ملاتونین به روش رقیق‌سازی پی‌درپی با استفاده از اتانول انجام شد. برای تهیه غلظت های ۱، ۵۰ و ۱۰۰ میکرمول ملاتونین به ترتیب مقادیر ۰/۰۰۰۲، ۰/۰۱۱٦ و ۰/۰۲۳۲ گرم پودر ملاتونین وزن شده و در ۱۵۰ میکرو لیتر اتانول حل شدند. سپس این مقادیر را با افزودن رقیق کننده پایه به حجم ۱۰۰ سی سی رسانده شد. ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول نهایی برداشته شده و در میکرو تیوپ های ۱/۵ میلی لیتر ریخته شد.

مراحل عمل آوری اسپرم قبل از انجماد

پس از جمع آوری و ارزیابی اولیه، نمونه هایی که دارای تحرک بالای ۷۰ درصد و اسپرم های غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد بود با هم مخلوط شدند. رقیق کننده هایی که قبلا آماده شده بودند در لوله های فالکون ۱۵ میلی لیتری ریخته شده در بن ماری قرار داده شدند. بعد از اضافه نمودن اسپرم به لوله های فالکون حاوی رقیق کننده، مخلوط حاوی اسپرم و رقیق کننده به لوله های حاوی غلظت های مختلف ملاتونین که در بن ماری قرار داشتند، منتقل شده و به مدت ۵ دقیقه در این لوله ها انکوبه شدند و سپس این لوله ها در درون آب ۳۷°C (در حدود ۲۰۰ میلی لیتر) گذاشته و به یخچال منتقل شدند تا به تدریج به دمای ۵°C برسند.

بعد از سپری شدن ٤ ساعت زمان تعادل، مخلوط های اسپرم و رقیق کننده بوسیله دستگاه فیلینگ- سیلینگ در پایوت های ۰/۵ میلی لیتری پر شدند. هر پایوت حاوی ۵۰×۱۰^{٦} اسپرم بود. بعد از این مرحله، پایوت ها به وسیله بخار ازت مایع و در مدت ۸ دقیقه در فاصله ٤ سانتی متر از سطح ازت مایع منجمد شده و تا زمان ارزیابی در ازت مایع ۱۹٦ °C- ذخیره شدند (ایجاز و همکاران ۲۰۰۹).

ارزیابی فراسنجه های منی بعد از یخ گشایی

برای ارزیابی نمونه های منی، ۵ پایوت از هر سطح در بن ماری ۳۷°C به مدت ٤۵ ثانیه، یخ گشایی گردیدند.

تحرک اسپرم پس از یخ گشایی

یک قطره از اسپرم ذوب شده را روی یک لام از قبل ا گرم شده گذاشته و با یک لامل آنرا می پوشانیم . با شمارش۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید (میکروسکوپ با بزرگنمائی ×٤۰) درصد تحرک تعیین شد. میانگین سه مشاهده به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شد.

یکپارچگی غشای پلاسمایی

یکپارچگی غشای پلاسمایی با استفاده از تست التهاب هیپواسموتیک تعیین شد (HOST). یک محلول هیپواسموتیک (۱۹۰ mOsm/L) باحل کردن ۰/۷۳۵ گرم تری-سدیم سیترات دی‌هیدرات و ۱/۳۵۱ گرم D(-) فروکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر یونیزه آماده شد. برای این آزمایش ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک با ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه اسپرم منجمد-ذوب مخلوط شده و برای ٤۵ دقیقه در ۳۷°C انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، نمونه با ملایمت مخلوط شده و سپس یک قطره (حدود ۵ میکرولیتر) از مخلوط عمل‌آوری شده روی لامی که قبلا گرم شده قرار داده و سپس آنرا با لامل پوشانده و با میکروسکوپ (×٤۰) بررسی شد. ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید شمارش شد و درصد اسپرم با دم تاب‌خورده تعیین شد. میانگین سه مشاهده به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شد (آدیل و همکاران ۲۰۰۹).

یکپارچگی آکروزوم

۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه منجمد-ذوب شده توسط ۵۰ میکرولیتر سیترات فرمالدئید ۱٪ و سیترات تری-سدیم دی‌هیدرات ۲/۹ ٪ (W/V) فیکس شد. ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ (×۱۰۰) از نظر برآمدگی راس سر طبیعی مورد شمارش قرار گرفتند. ناهنجاری‌هایی شبیه نبود آکروزوم، آکروزوم موج‌دار و یا آکروزوم متورم شمارش شدند (ایجاز و همکاران ۲۰۰۹).

قابلیت زنده‌ماندن اسپرم

۲۰ میکرولیتر از منی منجمد-ذوب شده را روی اسلایدی که قبلا گرم شده بود قرار داده و با ۱۰۰ میکرولیتر ترکیب رنگ‌آمیزی سوپراویتال [۱٪(w/v) ائوزین B، ۵ ٪ (w/v) نیگروزین در ۳ ٪ تری-سدیم سیترات دی‌هیدرات محلول] مخلوط گردید. سپس برای ایجاد یک لایه نازک و یک شکل، یک قطره (حدود ۵ میکرولیتر) از مخلوط عمل‌آوری شده روی لام که قبلا گرم شده قرار داده شد و یک گسترش از آن تهیه شد. بعداز خشک شدن در هوا، نمونه اسلاید زیر میکروسکوپ (×۱۰۰) مشاهده می‌شود. ۲۰۰ اسپرم برای سرهای غیر رنگ‌آمیزی شده، اسپرم در حالت زنده و نیز برای سرهای رنگ‌آمیزی شده (به طور کامل

یا جزیی) اسپرم در حالت مرده، شمارش شد (بالستری و همکاران ۲۰۰۷) .

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات

داده‌های حاصل از این مطالعه به صورت جداگانه در قالب طرح کامل تصادفی به کمک رویه Proc GLM نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل و اختلاف میانگین‌ها با LSD مقایسه شدند. نتایج حاصل از ۵ تکرار به صورت mean ± S.E.M. گزارش شد.

نتایج

نتایج به دست آمده نشان داد که تحرک، یکپارچگی آکروزم و زنده‌مانی اسپرم ها بعد از یخ‌گشایی با افزودن غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول ملاتونین در منی رقیق شده با رقیق کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ بهبود یافت (P < ۰/۰۵) (جدول ۱). بیشترین تحرک، یکپارچگی آکروزوم، پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده‌مانی اسپرم ها در غلظت ۱۰۰ میکرومول ملاتونین بدست آمد (P < ۰/۰۵). در تمام مشخصه‌های مورد ارزیابی افزودن ۱۰۰ میکرومول ملاتونین در رقیق کننده در مقایسه با سایر سطوح مصرفی و گروه شاهد بهترین نتیجه را نشان داد (۰/۰۵ > P).

جدول ۱- تاثیر افزودن ملاتونین بر کیفیت منی گاومیش محافظت سرمایی شده، بعد از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ (میانگین ±خطای معیار)

غلظت های ملاتونین (میکرو مول)	فراسنجه های اسپرم (٪)			
	تحرک	یکپارچگی آکروزم	پاسخ التهابی هیپواسموتیک	زنده‌مانی
۰	۳۹/۱۶ ± ۱/۱۰^{a}	۱۹/۲۸ ± ۱/۴۲^{a}	۴۲/۹۲ ± ۱/۳۷^{a}	۵۵/۰۸ ± ۱/۶۰^{a}
۱	۳۹/۵۶ ± ۱/۴۸^{a}	۱۹/۷۶ ± ۱/۴۹^{ab}	۴۳/۷۲ ± ۱/۳۰^{a}	۵۵/۵۲ ± ۱/۳۵^{a}
۵۰	۲۴/۴۸ ± ۱/۳۸^{b}	۲۱/۳۶ ± ۱/۴۹^{b}	۴۴/۴۴ ± ۱/۵۱^{a}	۵۹/۰۸ ± ۱/۲۹^{b}
۱۰۰	۴۹/۲۰ ± ۱/۷۳^{c}	۲۴/۱۶ ± ۱/۴۳^{c}	۴۷/۹۲ ± ۱/۰۸^{b}	۶۲/۱۶ ± ۱/۴۰^{c}

حروف مختلف (a, b, c, d) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P < ۰/۰۵) در هر ستون است.

تمام فراسنجه های مورد ارزیابی بعد از ۶ ساعت از یخ گشایی در جدول ۲ نشان داده شده است که نسب به فراسنجه های قبل از انجماد(جدول ۱) بطور قابل توجهی کاهش یافت. بیشترین تحرک، یکپارچگی آکروزم، پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده‌مانی منی اسپرم ها ۶ ساعت پس از یخ‌گشایی با افزودن ۱۰۰ میکرومول ملاتونین در منی رقیق شده در رقیق کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ حاصل شد (P < ۰/۰۵). یکپارچگی اکروزوم و زنده‌مانی منی اسپرم ها ۶ ساعت پس از یخ‌گشایی با افزایش ۵۰ میکرومول ملاتونین در منی رقیق شده در رقیق کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ نسبت به گروه شاهد نیز بهبود حاصل نمود (P < ۰/۰۵). در تمام مشخصه‌های مورد ارزیابی افزودن ۱۰۰ میکرومول ملاتونین در رقیق کننده در مقایسه با سایر سطوح مصرفی و گروه شاهد بهترین نتیجه را نشان داد (P<۰/۰۵).

تحرک، یکپارچگی آکروزم و زنده‌مانی اسپرم ها بعد از یخ‌گشایی در جدول ۳ نشان داده شده است که به دلیل افزودن غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول ملاتونین در منی رقیق شده در رقیق‌کننده تجاری بایوکسل بهبود یافت (P < ۰/۰۵). بیشترین تحرک، یکپارچگی آکروزم، پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده‌مانی اسپرم ها در غلظت ۱۰۰ میکرومول ملاتونین بدست آمد (P < ۰/۰۵).

جدول ۲- تاثیر افزودن ملاتونین بر کیفیت منی گاومیش محافظت سرمایی شده، ۶ ساعت بعد از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ (میانگین ±خطای معیار)

غلظت های ملاتونین	فراسنجه های اسپرم (٪)			
(میکرو مول)	تحرک	یکپارچگی آکروزم	پاسخ التهابی هیپواسموتیک	زنده‌مانی
۰	۱۷/۱۶ ± ۱/۴۹^{a}	۸/۰۰ ± ۱/۳۲^{a}	۱۹/۱۲ ± ۱/۲۵^{a}	۲۰/۸۸ ± ۱/۳۳^{a}
۱	۱۷/۳۲ ± ۱/۶۱^{a}	۸/۱۶ ± ۱/۳۵^{a}	۱۹/۲۰ ± ۱/۳۱^{a}	۲۱/۱۶ ± ۱/۳۱^{ab}
۵۰	۱۸/۴۰ ± ۱/۲۲^{a}	۹/۱۶ ± ۱/۰۳^{ab}	۱۹/۸۴ ± ۱/۰۶^{a}	۲۲/۹۶ ± ۱/۲۹^{bc}
۱۰۰	۲۲/۱۲ ± ۱/۲۵^{b}	۱۰/۶۴ ± ۱/۲۸^{b}	۲۱/۶۴ ± ۱/۳۷^{b}	۲۴/۴۰ ± ۱/۴۷^{c}

حروف مختلف (a, b, c, d) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) در هر ستون است.

جدول ۳- تاثیر افزودن ملاتونین بر کیفیت منی گاومیش محافظت سرمایی شده، بعد از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده تجاری بایوکسل(میانگین ±خطای معیار)

غلظت های ملاتونین	فراسنجه های اسپرم (٪)			
(میکرو مول)	تحرک	یکپارچگی آکروزم	پاسخ التهابی هیپواسموتیک	زنده‌مانی
۰	۴۷/۲۰ ± ۱/۶۳ ^{a}	۲۱/۹۶ ± ۱/۴۸^{a}	۴۵/۹۶ ± ۱/۲۹^{a}	۶۱/۸۸ ± ۱/۲۲^{a}
۱	۴۷/۱۲ ± ۱/۳۹ ^{a}	۲۲/۱۶ ± ۱/۲۹^{ab}	۴۵/۹۶ ± ۱/۲۲^{a}	۶۲/۱۶ ± ۱/۲۹^{a}
۵۰	۵۰/۱۲ ± ۱/۳۰^{b}	۲۳/۹۶± ۱/۵۵^{b}	۴۷/۰۰ ± ۱/۳۳^{a}	۶۵/۳۰ ± ۱/۴۸^{b}
۱۰۰	۵۷/۱۶ ± ۱/۹۸^{c}	۲۸/۰۴ ± ۱/۵۷^{c}	۵۱/۰۸ ± ۱/۲۹^{b}	۶۶/۹۶ ± ۱/۳۰^{b}

حروف مختلف (a, b, c, d) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) در هر ستون است.

جدول ۴- تاثیر افزودن ملاتونین بر کیفیت منی گاومیش محافظت سرمایی شده، ۶ ساعت بعد از یخ گشایی در رقیق‌کننده تجاری بایوکسل (میانگین ± خطای معیار)

غلظت های ملاتونین	فراسنجه های اسپرم (٪)			
(میکرو مول)	تحرک	یکپارچگی آکروزم	پاسخ التهابی هیپواسموتیک	زنده‌مانی
۰	۲۱/۸۰ ± ۱/۰۹^{a}	۱۰/۱۲ ± ۱/۲۹^{a}	۲۰/۹۶ ± ۱/۲۲^{a}	۲۸/۹۲ ± ۱/۳۶^{a}
۱	۲۲/۰۴ ± ۱/۵۸^{a}	۱۰/۲۸ ± ۱/۳۶^{a}	۲۱/۰۴ ± ۲/۱۱^{a}	۲۹/۳۶ ± ۱/۳۶^{ab}
۵۰	۲۳/۶۰ ± ۱/۴۶^{a}	۱۱/۰۸ ± ۱/۲۹^{ab}	۲۱/۹۶ ± ۱/۲۹^{ab}	۳۱/۱۶ ± ۱/۴۲^{bc}
۱۰۰	۲۷/۲۰ ± ۱/۸۳^{b}	۱۲/۵۲ ± ۱/۳۹^{b}	۲۳/۷۸ ± ۱/۶۹^{b}	۲۳/۷۶ ± ۱/۶۱^{c}
۵۰	۲۳/۶۰ ± ۱/۴۶^{a}	۱۱/۰۸ ± ۱/۲۹^{ab}	۲۱/۹۶ ± ۱/۲۹^{ab}	۳۱/۱۶ ± ۱/۴۲^{bc}
۱۰۰	۲۷/۲۰ ± ۱/۸۳^{b}	۱۲/۵۲ ± ۱/۳۹^{b}	۲۳/۷۸ ± ۱/۶۹^{b}	۲۳/۷۶ ± ۱/۶۱^{c}

حروف مختلف (a, b, c, d) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) در هر ستون است

نتایج جدول ٤ نشان می دهد که یکپارچگی آکروزوم، پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده‌مانی اسپرم ها ٦ ساعت پس از یخ‌گشایی با افزودن ۵۰ میکرومول ملاتونین در منی رقیق شده در رقیق کننده تجاری بایوکسل بهتر شد ($P < ۰/۰۵$) ولی بیشترین نتیجه در تمام خصوصیات ارزیابی شده وقتی حاصل شد که ۱۰۰ میکرومول ملاتونین به رقیق کننده اضافه شده بود ($P < ۰/۰۵$).

بحث

ملاتونین و همچنین متابولیت‌های آن پاک‌کننده‌های بالقوه مستقیم رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌های غیرمستقیم به دلیل توانایی آن‌ها در تنظیم رونویسی ژن برای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشد. خاصیت‌های

آنتی‌اکسیدانی ملاتونین به طور گسترده مطالعه شده است و استفاده این مولکول به عنوان یک محافظت‌کننده سلول و نیز یک عامل جلوگیری‌کننده از بیماری‌های بالقوه پیشنهاد شده است. ملاتونین به میزان زیادی در حمایت سلول در مقابل استرس اکسیداتیو موثر است (تامورا و همکاران ۲۰۰۸).

تاثیر حفاظتی ملاتونین در سلول های مختلف موجب شده اثر آنتی اکسیدانی ملاتونین کاملا مشهود شود. ملاتونین مستقیما تعداد زیادی از رادیکال های آزاد سمی را غیرفعال کرده (پیروت و دوکروگ ۲۰۰۸، تان و همکاران ۲۰۰۷ و هاردلند و همکاران ۲۰۰۹)، در بیان ژن های آنزیم های آنتی اکسیدانی موثر بوده و موجب افزایش سطح mRNA و پروتئین های این آنزیم ها می شود (ریتر و همکاران ۲۰۰۰). ملاتونین همچنین می تواند اسپرم را علیه جیوه، نیتریک اکساید، H_2O_2 و آسیب های اکسیداتیو محافظت کند (رائو و گانگادهاران ۲۰۰۸). گاوائی و برنارد (۲۰۰۲) گزارش کردند که ملاتونین بر اساس دوزهای مورد استفاده جنبایی اسپرم را تحت تاثیر قرار می دهد. فوجی نوکی (۲۰۰۸) مشاهده کرد که استفاده ار ملاتونین در شرایط آزمایشگاهی موجب افزایش فعالیت اسپرم موش می شود که سطح ۱ نانومولار موثرترین دوز می باشد. کاساسو و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کرد که استفاده از غلظت ۰/۰۰۱ میلی مولار ملاتونین موجب بهبود ظرفیت پذیری و کاهش تغییرات شبه آپاپتوزی می شود، در حالی که در سطوح پایین تر اثرات محافظتی ملاتونین مشاهده نمی شود.

در این مطالعه تاثیر افزودن ملاتونین با غلظت‌های متفاوت (۱-۱۰۰ میکرومول) به رقیق‌کننده تریس-سیترات زرده تخم‌مرغ و رقیق‌کننده بایوکسل مورد ارزیابی قرار گرفت. در رقیق کننده تریس-سیترات زرده تخم‌مرغ به کارگیری ۱۰۰ میکرومول ملاتونین باعث افزایش ۱۰ درصدی تحرک اسپرم ها بلافاصله پس از یخ‌گشایی شد. ولی تفاوت بین تیمارهای شاهد، ۱ میکرومول ملاتونین معنی‌دار نبود. مقدار تحرک تیمار ۵۰ میکرومول ملاتونین نسبت به تیمار شاهد، ۳ درصد افزایش نشان داد (جدول ۵).

در مطالعه حاضر، نتایج در رقیق‌کننده تجاری بایوکسل نیز نشان داد که افزودن ۱۰۰ میکرومول ملاتونین موجب بهبود معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) کیفیت منی نسبت به سایر تیمارها شد. بین تیمارهای شاهد و ۱ میکرومول ملاتونین تفاوت معنی‌دار برحسب تحرک، یکپارچگی آکروزم، پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده‌مانی وجود نداشت. همچنین مقایسه تیمار شاهد و تیمار ۵۰ میکرومول ملاتونین نشان داد که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری بر حسب مشخصه‌های اسپرم با هم ندارند (جدول ۷).

نتایج بررسی تحرک، یکپارچگی آکروزم و پاسخ التهابی هیپواسموتیک و زنده‌مانی اسپرم ها، ٦ ساعت پس از یخ‌گشایی نشان داد که افزودن ملاتونین به هر دو نوع رقیق‌کننده (تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ و بایوکسل) سبب بهبود کیفیت منی می‌شود. در رقیق کننده تریس-سیترات زرده تخم‌مرغ افزودن ۱۰۰ میکرومول ملاتونین بهترین نتیجه را باعث شد و در مقایسه با تیمار شاهد مقدار تحرک را در حدود ۵ درصد افزایش داد (جدول ٦). نتایج مقایسه تیمارها ٦ ساعت پس از یخ‌گشایی در رقیق کننده بایوکسل نیز مشابه رقیق کننده تریس-سیترات زرده تخم‌مرغ بود. به طوری که بین تیمارهای شاهد، ۱ و ۵۰ میکرومول ملاتونین تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و به کارگیری ۱۰۰ میکرومول ملاتونین بهترین تنایج را باعث شد (جدول ۸).

در مطالعه ای که توسط لئون و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد، گزارش شد که نقش محافظتی ملاتونین روی میتوکندری و به طبع آن روی جنبایی اسپرم می تواند از طریق چندین مکانیسم باشد. مکانیسم ۱) خاصیت آنتی اکسیدانی و جاروب کننده رادیکال های آزاد توسط ملاتونین، اندامک های سلول را در برابر آسیب های استرس اکسیداتیو محافظت می کند. مکانیسم۲)

ملاتونین موجب افزایش فعالیت کمپلکس های ۱ و ٤ در شاخه های انتقال الکترون شده، در نتیجه موجب بهبود تنفس میتوکندریایی و افزایش تولید ATP تحت شرایط طبیعی و استرس می شود (آکونا و همکاران ۲۰۰۲) . مکانیسم ۳) ملاتونین با کاهش مصرف اکسیژن، کاهش پتانسیل غشا و کاهش تولید آنیون سوپراکساید، میتوکندری را در برابر آسیب های اکسیداتیو محافظت می کند در حالی که میزان تولید ATP حفظ شود (لوپز و همکاران ۲۰۰۹).

ارزیابی مشخصه‌های منی بلافاصله پس از یخ‌گشایی و ٦ ساعت پس از یخ‌گشایی، در هر نوع رقیق‌کننده (تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ و بایوکسل) نشان داد که افزودن ۱۰۰ میکرومول ملاتونین به رقیق کننده‌های تریس- سیترات زرده تخم‌مرغ و بایوکسل باعث بهبود کیفیت منی شد.پیشنهاد می شود در تحقیقات آتی تاثیر استفاده از دز های بیشتر ملاتونین و همچنین تست های عملکردی بیشتری همچون تست های باروری و بیوشیمیایی مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

Acuna Castroviejo D, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H and Reiter RJ, 2002. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. Current Topics in Medicinal Chemistry 2: 133-151.

Adeel M, Ijaz A, Aleem M, Rehman H, Yousaf MS and Jabbar MA, 2009. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (Bubalus bubalis) through supplementation of fat. Theriogenology 71: 1220-1225.

Ahmad Z, Anzar M, Shahab M, Ahmad N and Andrabi SM, 2003. Sephadex and sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. Theriogenology 59: 1189-1202.

Aitken RJ, 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reproduction, Fertility, and Development 7: 659-668.

Allegra M, Reiter R.J, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L and Livrea MA, 2003. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. Journal of Pineal Research 34: 1-10.

Andrabi SM, Ansari MS, Ullah N, Anwar M, Mehmood A and Akhter S, 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. Animal Reproduction Science 104: 427-433.

Ashrafi I, Kohram H , Naijian H , Bahreini M and Poorhamdollah M, 2011. Protective effect of melatonin on sperm motility parameters on liquid storage of ram semen at 5°C. African Journal of Biotechnology 10: 6670-6674.

Balestri F, Giannecchini M, Sgarrella F, Carta MC, Tozzi MG and Camici M, 2007. Purine and pyrimidine nucleosides preserve human astrocytoma cell adenylate energy charge under ischemic conditions. Neurochemistry International 50: 517-523.

Casao A, Vega S, Palacin I, Perez-Pe R, Lavina A, Quintin FJ, Sevilla E, Abecia JA, Cebrian-Perez JA, Forcada F, Muino-Blanco T, 2010. Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams. Reproduction in Domestic Animals 45: 425-432.

Fujinoki M, 2008. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. Reproduction 136: 533-541.

Gwayi N and Bernard RT, 2002. The effects of melatonin on sperm motility in vitro in Wistar rats. Andrologia 34: 391-396.

Hardeland R, Tan DX and Reiter RJ, 2009. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. Journal of Pineal Research 47: 109-126.

Holt WV, 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Scienc 62: 3-22.

Ijaz A, Hussain A, Aleem M, Yousaf MS and Rehman H, 2009. Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (Bubalus bubalis). Theriogenology 71: 1326-1329.

Juknat AA, Mendez Mdel V, Quaglino A, Fameli CI, Mena M and Kotler ML, 2005. Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. Journal of Pineal Research 38: 84-92.

Kakar SS and Anand SR, 1981. Changes in adenosine 5'-triphosphate, adenylate energy charge and adenosine 3'5'-cyclic monophosphate during the freezing of buffalo semen. Journal of Reproduction and Fertility 62: 543-548.

Kumaresan A, Ansari MR and Garg A, 2005. Modulation of post-thaw sperm functions with oviductal proteins in buffaloes. Animal Reproduction Science 90: 73-84.

Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX and Reiter RJ, 2005. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. Journal of Pineal Research 38: 1-9.

Lopez A, Garcia JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, Lopez LC and Acuna-Castroviejo D, 2009. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. Journal of Pineal Research 46: 188-198.

Muer SK, Roy SB, Mohan G and Dhoble RL, 1988. Cryogenic changes in seminal protein of cattle and buffalo. Theriogenology 30: 1005-1010.

Peyrot F and Ducrocq C, 2008. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. Journal of Pineal Research 45: 235-246.

Ramadan TA, Taha TA, Samak MA, Hassan A, 2009. Effectiveness of exposure to longday followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. Theriogenology 71: 458-468.

Rao MV and Gangadharan B, 2008. Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. Toxicology in Vitro 22: 935-942.

Reiter RJ, Tan DX, Osuna C and Gitto E, 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. Journal of Biomedical Science 7: 444-458.

Sonmez M, Yuce A and Turk G, 2007. The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. Reproductive Toxicology 23: 226-231.

Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Ishikawa H, Reiter RJ and Sugino N, 2008. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. Journal of Pineal Research 44: 280-287.

Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ and Reiter RJ, 2007. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? Journal of Pineal Research 42: 28-42.

Antioxidant effect of Melatonin on the buffalo sperm parameters after freeze thawing process

S Tjvidi Asr[1], H Kohram[2*], R Beheshti[3] and I Ashrafi[4]

Received: April 13, 2013 Accepted: July 15, 2013

[1]MSc Student, Department of Animal Science, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Tehran, Karaj, Iran
[3]Assistant professor, Department of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran
[4]Young Researchers and elites Club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
*Corresponding author: E mail: hamid_kohram@yahoo.com

Abstract

This study was carried out to evaluate the potential impact of melatonin on the frozen–thawed semen quality of buffalo. Ejaculated semen was extended in a Tris–citrate egg yolk and bioexcell extenders containing various concentrations of melatonin (0, 1.0, 50 and 100 μM). After cooling at 5ºC, semen samples were frozen in liquid nitrogen vapor and plunged into liquid nitrogen for storage. Straws from each treatment were thawed at 37 °C water bath for 45 s to assess the semen quality in terms of sperm motility, viability, plasma membrane integrity and acrosomal integrity at 0 and 6 h after thawing. Post-thawed sperm motility was determined using a phase-contrast microscope. Viability, plasma membrane integrity and acrosomal integrity were evaluated by the supravital staining, hypo-osmotic swelling test and normal acrosomal reaction, respectively. Adding melatonin in two extenders conferred better cryopreserving ability to spermatozoa compared to control groups. The highest ($P < 0.05$) value was achieved by addition of 100 μM melatonin upon and 6 h after thawing.

Keywords: Antioxidant, Buffalo semen, Cryopreservation, Melatonin