اثرات مخرب اتانول بر ویژگی‌های حیاتی سلول اسپرم در بز

انصاری، م.[۱]، توحیدی، آ.*[۲]، مرادی شهر بابک، م.[۲]

دریافت: ۱۳۸۸/۱۰/۹ پذیرش: ۱۳۸۹/۲/۲۹

خلاصه:

افزودن مواد محلول در چربی به رقیق‌کنندهٔ منی با حل کردن آنها در یک حلال مناسب، نظیر اتانول صورت می‌گیرد. با این وجود حلال‌ها ممکن است دارای اثرات مخرب بر سلول اسپرم باشند. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی افزودن اتانول به عنوان حلال رایج چربی‌ها به محیط رقیق‌کننده، بر قابلیت انجماد اسپرم است. ۵ رأس بز نر سالم، نژاد مهابادی انتخاب و منی به وسیلهٔ واژن مصنوعی جمع‌آوری شد. نمونهٔ منی بعد از ارزیابی اولیهٔ خصوصیات کیفی، مخلوط و به دو گروه مساوی تقسیم شد. گروه‌های تیماری شامل : ۱) رقیق‌کنندهٔ پایه به عنوان گروه شاهد، ۲) رقیق‌کنندهٔ پایه + اتانول (۰/۰۵ ٪ حجمی) بودند. فراسنجه‌های تحرک، تحرک پیشرونده، زنده-مانی و درصد اسپرم‌های ناهنجار با استفاده از روش‌های استاندارد ارزیابی شد. داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS تجزیه تحلیل گردید. در گروه شاهد نسبت به تیمار، میانگین تحرک (۱/۵۸±۴۴ در برابر۱/۵۸±۳۷)، زنده‌مانی (۰/۵۱± ۶۴/۰۴ در برابر۰/۵۱± ۵۸/۶۹) و نرخ بازیافت (۰/۰۲±۵۸/۰۱ در برابر۰/۰۲±۵۰/۷۶) به صورت معنی‌داری بالاتر بود، اما میانگین تحرک پیشرونده (۲/۱۲±۳۳ در برابر۲/۱۲±۲۸) و درصد اسپرم‌های ناهنجار(۳۲ /۰± ۵/۰۵ در برابر۳۲ /۰± ۴/۶۴) تحت تأثیر تیمار قرار نگرفت. نتایج آزمایش حاضر از فرضیهٔ سمی بودن اتانول برای اسپرم حمایت می‌کند.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، اتانول، بز مهابادی، انجماد.

---

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

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

*نویسنده مسؤول: atowhidi@ut.ac.ir

مقدمه:

استفاده از اتانول یکی از راه‌های حل‌کردن مواد محلول در چربی در رقیق‌کنندهٔ اسپرم و همچنین افزودن آن به محیط کشت‌های بلوغ اووسیت از گذشته تاکنون است. برای مثال برای مطالعهٔ اثر ویتامین E بر تکوین رویان در شرایط برون-تنی از اتانول برای حل کردن آن استفاده شده است. این امر باعث بهبود درصد بلاستوسیست‌ها می شود. همچنین اضافه کردن ویتامین E محلول در اتانول به محیط کشت جنینی بمدت ۵/۵ روز و انتقال آنها به گاوهای گیرندهٔ جنین باعث افزایش تولید بلاستوسیست‌ها شده است (Olson و Seidel، ۲۰۰۰). مطالعات انجام شده در محیط کشت جنین، سطح ۰/۰۵ اتانول را برای حل کردن مواد لیپیدی غیر مضر دانسته‌اند. در مطالعهٔ دیگر، اثر ویتامین E و استر آن یعنی آلفا توکوفرول استات محلول در اتانول بر روی پراکسیداسیون لیپیدی و تحرک اسپرم نریان در شرایط برون تنی بررسی شد و نتایج حاصل حاکی از اثر منفی اتانول بر انجمادپذیری اسپرم نبود (Almeida و Ball، ۲۰۰۵). هر چند که در یک مطالعه برای جلوگیری از اثرات منفی اتانول بر اسپرم از روش تبخیر اتانول استفاده شده است (Ijaz و همکاران، ۲۰۰۹) اما دربارهٔ اثر افزودن اتانول به محیط رقیق‌کننده بر ویژگی‌های حیاتی اسپرم، مطالعات زیادی در دسترس نیست؛ بنابراین هدف از این آزمایش، بررسی اثر افزودن اتانول به محیط رقیق‌کننده و ارزیابی انجمادپذیری اسپرم است.

مواد و روش کار:

حیوانات و مکان آزمایش:

در این آزمایش از ۵ رأس بز بالغ نژاد مهابادی با سن ۳ سال و میانگین وزنی ۶۳ کیلوگرم استفاده گردید. آزمایش طی آبان ماه ۱۳۸۸ بمدت ۴ هفته در مزرعه آموزشی و پژوهشی گروه علوم دامی واقع در جاده محمد شهر شهرستان کرج (′۴۸°۳۵ شمالی و ′۲°۵۱ شرقی) و مرکز اصلاح نژاد دام کشور واقع در جاده مشکین دشت کرج اجرا گردید.

طرح آزمایشی

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۵ تکرار انجام گرفت. جمع‌آوری منی پس از عادت دادن بزها و به وسیلهٔ واژن مصنوعی صورت گرفت. بلافاصله پس از جمع‌آوری منی نمونه‌ها در داخل بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته، به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پس از ارزیابی اولیه و داشتن استانداردهای مناسب انجماد (تحرک بالاتر از ۷۰٪)، نمونه‌های منی با هم ادغام شده و به دو گروه مساوی تقسیم شدند. گروه‌های تیماری شامل ۱) رقیق‌کنندهٔ تجاری بایوکسل[1] (IMV, Aigle، فرانسه) به عنوان گروه شاهد، ۲) رقیق‌کنندهٔ بایوکسل + اتانول (۰/۰۵ ٪ حجمی) بودند.

منی رقیق‌شده به مدت ۳ ساعت تا دمای ۵-۴ درجه سانتی-گراد سرد شد. نمونه‌ها در داخل پایت‌ها (۰/۵۰ میلی‌لیتری و $۱۰^{۶}$× ۱۰۰ اسپرم در هر پایت) ریخته و در رک قرار داده شد. با استفاده ازجعبهٔ پلی استیرن رک‌های محتوی نمونه، در معرض بخار نیتروژن مایع در ارتفاع ۴ سانتی‌متری بالای نیتروژن مایع بمدت ۸ دقیقه قرار گرفته و سپس در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند (Purdy، ۲۰۰۶).

اندازه گیری فراسنجه‌های منی

الف) تحرک اسپرم

نمونه‌ای از منی تازه در سرم فیزیولوژیک (نمک طعام ۰/۹ درصد) به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد. لام و لامل از قبل بر روی صفحهٔ گرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم شده و ۲۰ میکرولیتر از نمونهٔ رقیق‌شدهٔ منی بر روی لام تمیزی قرار داده شد. جهت تعیین تحرک، اسپرم در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. حداقل ۱۰ میدان میکروسکوپی برای تخمین صحیحی از درصد تحرک، مشاهده و بررسی شد. تخمین درصد سلول‌های متحرک، بر اساس تجربه از روی میدان‌های مشاهده شده صورت گرفت. این کار در دمای ۳۷ درجه و همچنین پس از ذوب تکرار شد.

1. Bioxcell®

ب) حرکت پیشرونده اسپرم

جهت تعیین درصد اسپرم‌های با تحرک پیشرونده در نمونهٔ منی تازه و نمونهٔ ذوب شده از روش چشمی و با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۲۰۰ استفاده گردید. حداقل ۱۰ میدان میکروسکوپی برای تخمین صحیحی از درصد تحرک پیشرونده اسپرم، مشاهده و بررسی شد.

ج) اسپرم‌های ناهنجار

قطرهٔ کوچکی از محلول ۲/۹ درصد سیترات سدیم روی یک لام گرم قرار داده شد. یک پایت خالی به سطح نمونهٔ 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 بخوبی مخلوط شوند. به کمک یک لام دیگر، مخلوط اسپرم و سیترات سدیم به صورت یک لایهٔ بسیار نازک روی لام اول پخش شد. پس از آن لام‌ها از یکدیگر جدا شده و لام اول روی صفحهٔ گرم قرار داده و خشک شد. با شمارش ۱۰۰ اسپرم در هر لام و به کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های ناهنجار تعیین شد. حداقل ۱۰ میدان میکروسکوپی برای تخمین صحیحی از درصد اسپرم‌های ناهنجار، مشاهده و بررسی شد.

د) تعیین درصد اسپرم زنده و مرده

جهت اندازه‌گیری درصد اسپرم زنده و مرده در نمونهٔ منی تازه و نمونهٔ ذوب شده از رنگ ائوزین- نیگروزین تجاری برای رنگ‌آمیزی اسپرم‌ها استفاده شد. قطرهٔ کوچکی از رنگ روی یک لام گرم قرار داده شد. یک پایت خالی به سطح نمونهٔ 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 بخوبی مخلوط شوند. به کمک یک لام دیگر گسترهٔ بسیار نازکی از نمونهٔ منی تهیه شده و لام بسرعت خشک گردید تا اسپرم‌های زنده در اثر رنگ از بین نرفته و رنگ‌آمیزی نشوند. برای خشک شدن سریع، لام روی صفحهٔ گرم با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. درصد اسپرم‌های زنده و مرده در حداقل ۱۰ میدان از لام و با شمردن حداقل ۳۳۳ اسپرم تعیین گشت. اسپرم‌هایی که سر آنها اندکی رنگ گرفته بود نیز جزء اسپرم‌های مرده در نظر گرفته شدند.

ه) تعیین میزان بازیافت[2] اسپرم پس از انجماد

برای تعیین درصد بازیافت اسپرم پس از انجماد از فرمول زیر استفاده شد (Hafez و Hafez، ۲۰۰۰):

$$\text{درصد باز یافت} = \frac{\text{درصد جنبایی بعد از ذوب}}{\text{درصد جنبایی قبل از انجماد}} * 100$$

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده از این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به کمک رویه GLM نرم افزار SAS تجزیه تحلیل شد. مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون دانکن صورت گرفته و در سطح ۰/۰۵، اختلاف معنی‌دار گزارش شد.

نتایج:

نتایج نشان داد که در گروه شاهد نسبت به تیمار، میانگین تحرک (۱/۵۸±۴۴ در برابر۱/۵۸±۳۷)، زنده‌مانی (۰/۵۱± ۶۴/۰۴ در برابر۰/۵۱± ۵۸/۶۹) و نرخ بازیافت (۰/۰۲±۵۸/۰۱ در برابر۰/۰۲±۵۰/۷۶) به صورت معنی‌داری بالاتر بود، اما میانگین تحرک پیشرونده (۲/۱۲±۳۳در برابر۲/۱۲±۲۸) و درصد اسپرم‌های ناهنجار(۳۲ /۰± ۵/۰۵ در برابر۳۲ /۰± ۴/۶۴) تحت تأثیر تیمار قرار نگرفت. اثر گروه تیماری و شاهد بر روی برخی فراسنجه‌های اسپرم بز در جدول ۱ نشان داده شده است.

بحث:

در این آزمایش، اتانول اثرات مضری بر ویژگی‌های حیاتی اسپرم داشت هر چند که سازوکار دقیق این اثر مشخص نیست. اما با توجه به مطالعات درون‌تنی و برون‌تنی انجام گرفته بر روی سلول‌های سوماتیک انسانی و حیوانی و اثر مضر اتانول بر روی DNA سلول

2. Recovery rate

(Blasiak و همکاران، ۲۰۰۰؛ Kayani و Parry، ۲۰۱۰؛ Lamarche و همکاران، ۲۰۰۴)، احتمالاً این امر در مورد سلول‌های جنسی نر نیز صادق بوده و افزایش غلظت اتانول در محیط باعث آسیب DNA (برای مثال قطعه قطعه شدن[3] ماده وراثتی) می‌شود که به از بین رفتن سلول، کاهش زنده‌مانی اسپرم و همچنین کاهش تحرک آن می‌انجامد. اخیراً از سیکلودکسترین به جای اتانول به عنوان حلالی برای کونژوگه‌های مختلف کلسترول (هپتانوات[4]،پالمیتات[5]، پلارگونات[6] یا استئارات[7]) در محیط رقیق‌کننده اسپرم استفاده شده است و اثر مضری بر ویژگی‌های حیاتی اسپرم گزارش نشده است (Amorim و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین برای جلوگیری از تداخل اثر اتانول با اثر تیمار بهتر است از یک حلال مناسب‌تری نظیر سیکلودکسترین برای حل‌کردن مواد محلول در چربی در رقیق‌کننده اسپرم استفاده شود.

گروه	فراسنجه‌های اندازه گیری شده (بر حسب درصد)				
	تحرک	تحرک	اسپرم‌های	زنده‌مانی	نرخ بازیافت
شاهد	۴۴±۱/۵۸ a	۳۳±۲/۱۲ a	۵/۰۵ ±۰/۳۲ a	۶۴/۰۴ ±۰/۵۱ a	۵۸/۰۱±۰/۰۲ a
اتانول	۳۷±۱/۵۸ b	۲۸±۲/۱۲ a	۴/۶۴ ±۰/۳۲ a	۵۸/۶۹ ±۰/۵۱ b	۵۰/۷۶±۰/۰۲ b

جدول ۱) اثر اتانول بر درصد (میانگین ± خطای معیار) برخی ویژگی‌های اسپرم بعد از انجماد در بز مهابادی.

a, b در هر ستون مقادیری که دارای حروف مشترک لاتین نیستند، اختلاف معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۵$) دارند.

تشکر و قدردانی

از زحمات کارشناسان مرکز اصلاح نژاد دام کشور، آقایان دکتر بحرینی، مهندس میرزاخانی و آقای ویسه تقدیر و تشکر می‌شود.

3.fragmentation

4. Heptanoate
5. palmitate
6. Pelargonate
7. Estearate

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 2 (2010) 151-156

The detrimental effects of ethanol on vital characteristics of goat sperm cells

Ansari, M. [1], Towhidi, A.* [2], Moradi Shahrbabak, M. [2]

Received: 20.05.2010 Accepted: 16.11.2010

Abstract:
Inclusion of fat soluble material to the semen extender involves their solution into an appropriate solvent such as ethanol. In addition, these solvent seem to have their specific effects on sperm cells. Hence, the objective of this study was to investigate the effects of adding ethanol to the extender Bioxcell® (IMV, Aigle, France) on freezing ability of goat semen. Five mature mahabadi bucks were selected and semen samples were collected using an artificial vagina. Semen was divided into two groups including groups 1) basal extender as a control and 2) basal extender + ethanol (0.05% of volume). Motility, progressive motility, abnormality and viability were evaluated by standard methods. Data was analyzed using proc GLM of SAS. Motility percentage (44±1.58 vs. 37±1.58), viability (64.04±0.51 vs. 58.69±0.51) and recovery rates (58.01±0.02 vs. 50.76) were significantly higher in control than the other group but progressive motility percentage and abnormality (33±2.12 and 5.05±0.32 vs. 28±2.12 and 4.64±0.32, respectively) were not affected by treatment. This result suggested that ethanol has a toxic effect on sperm cells.

Key words: Sperm, Ethanol, Mahabadi goat, Freezing**.**

1: MSc student, Department of Animal Science, Faculty of Agronomy and Animal Science, University of Tehran, Karaj, Iran.

2.Department of Animal Science, Faculty of Agronomy and Animal Science, University of Tehran, Karaj, Iran.

*Corresponding author: atowhidi@ut.ac.ir

منابع

Almeida, J., Ball. B.A. 2005. Effect of [alpha]-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. Journal of Animal Reproduction Science. **87**, 321-337.

Amorim, E. A. M., Graham, J. K., Spizziri, B., Meyers, M., Torres, C. A. A. 2009. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. Journal of Cryobiology. **58**, 210-214.

Blasiak, J., Trzeciak, A., Malecka-Panas, E., Drzewoski, J., Wojewódzka, M. 2000. In vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde in human lymphocytes and the gastrointestinal tract mucosa cells. Journal of Toxicology in Vitro. **14**, 287-298.

Hafez, B., Hafez, E.S.E. 2000. Reproduction of farm animals, 7th edn. Lippincott Williams and Wilkins, Phyladelphia. 231-250.

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

Kayani, M.A., Parry, J.M. 2010. The in vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. Journal of Toxicology in Vitro. **24**, 56-60.

Lamarche, F., Gonthier, B., Signorini, N., Eysseric, H., Barret. L. 2004. Impact of ethanol and acetaldehyde on DNA and cell viability of cultured neurones. Journal of Cell Biology and Toxicology. **20**, 361-374.

Olson, S.E., Seidel, G.E. 2000. Culture of In Vitro-Produced Bovine Embryos with Vitamin E Improves Development In Vitro and After Transfer to Recipients. Journal of Biology of Reproduction. **62**, 248-252.

Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Journal of Small Ruminant Research. **63**, 215-225.