بهینه سازی آزمایش های ارزیابی اسپرم های منجمد گاو

محمدی، ق.[۱*]، مهدیون، ح.[۲]، گورانی نژاد، س.[۱]، خواجه، غ.[۱]، مشکورزاده، م.[۳]

دریافت: ۱۳۹۰/۰۴/۱۴ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۱۰

خلاصه

ضایعات متعدد اسپرم ها طی انجماد و ذوب شدن باعث کاهش باروری آنها می شود. بنابراین ارزیابی این روند از اهمیت بسزایی برخوردار است. آزمایش های معمولی ارزیابی اسپرم ها در اکثر موارد برای ارزیابی اسپرم های منجمد مناسب نیستند؛ در نتیجه، اصلاح این ازمایش ها ضروری است. مهمترین ارزیابی اسپرم های منجمد عبارتند از: آزمایش درصد تحرک اسپرم، تعداد اسپرم های زنده و مرده، آزمایش ارزیابی غشاء پلاسمایی اسپرم، آزمایش ارزیابی آکروزوم اسپرم و بررسی میزان ناهنجاری های ساختاری اسپرم. هدف از این مطالعه اصلاح و بهینه سازی روش های ارزیابی اسپرم های منجمد ذوب شده می باشد.

واژه های کلیدی: بهینه سازی، ارزیابی اسپرم منجمد ذوب شده، گاو، ایران.

۱. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

۲. دانش آموختهٔ دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

۳. کارشناس امور دام سازمان جهاد کشاورزی استان خوزستان، اهواز، ایران

*نویسنده مسؤول: ghmohammadi9@yahoo.com

مقدمه

اسپرم ها طی انجماد و ذوب شدن دچار ضایعات متعددی از قبیل: کاهش تحرک اسپرم ها، افزایش تعداد اسپرم های مرده، معیوب شدن ارگان های اختصاصی اسپرم مثل آکروزوم، پاره شدن آکروزوم، پاره شدن غشای پلاسمایی و اختلال در ساختمان میتوکندری ها می شوند که باعث کاهش باروری آنها می گردد. بنابراین ارزیابی اسپرم های منجمد پس از ذوب شدن از اهمیت بسزایی برخوردار است. آزمایش های معمولی ارزیابی اسپرم ها در اکثر موارد برای ارزیابی اسپرم های منجمد مناسب نیستند؛ لذااصلاح روش های جاری ضروری است. معمولاً آزمایشگاه های تشخیصی، فاکتورهای متعددی شامل: تعیین حجم انزال، تعیین درصد تحرک، تعیین درصد سلول های زنده و مرده (با استفاده از رنگ آمیزی حیاتی یا فلوسیتومتری)، تعیین درصد اسپرم های ناهنجار، تعیین غلظت انزال و آزمایش تورم هیپواسموتیک برای ارزیابی منی انجام می دهند (Hulet و Ercanbrack، ۱۹۶۲؛ Foote، ۲۰۰۳) که مهمترین آن هاشامل: آزمایش درصد تحرک، تعداد اسپرم های زنده و مرده، آزمایش ارزیابی غشاء پلاسمایی اسپرم، آزمایش ارزیابی آکروزوم اسپرم و بررسی میزان ناهنجاری های ساختاری اسپرم است. آزمایش میکروسکوپی تحرک اسپرم ها، مهم ترین آزمایش ارزیابی باروری اسپرم هاست و اطلاعات زیادی در خصوص میزان تحرک اسپرم ها ارائه می دهد (Ballp و Peters، ۲۰۰۴)؛ چون تحرک اسپرم ها برای عبور اسپرم ها از مهبل، رحم، اویداکت و هنگام لقاح بسیار ضروری است (Martinez، ۲۰۰۴). یکی از روش های تعیین تعداد سلول های زنده و مرده، استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی است. برای این منظور از رنگ ائوزین B استفاده می‌شود. در رنگ‌آمیزی حیاتی، ترکیب رنگ های ائوزین و نگروزین برای تعیین تعداد سلول–های مرده به کار می رود. اصول رنگ‌آمیزی حیاتی براساس رنگ های مخصوصی مثل ائوزین B است که به داخل سلول های اسپرم مرده نفوذ کرده، آن ها را به رنگ قرمز در می‌آورد اما سلول های زنده، رنگ مزبور را به خود نمی‌گیرند (محمدی و براتی، ۱۳۸۸). آزمایش رنگ آمیزی ساختار اسپرم ها از مهم ترین آزمایش هایی است که می تواند اطلاعات ارزشمندی در خصوص میزان سلامت ساختار اسپرم ها و یا تعداد اسپرم های ناهنجار به ما دهد (Ballp و Peters، ۲۰۰۴). نکتهٔ مهم در این آزمایش تهیهٔ گسترش مناسب و خشک کردن آن است. برای شناسایی ساختمان اسپرم ها از رنگ‌آمیزی حیاتی، مرکب هندی، گیمسا، رایت، آنیلین‌بلو و متیلن‌بلو استفاده می شود (Hafez و Hafez، ۲۰۰۰؛ Roberts، ۱۹۸۶). آسان ترین و سریع ترین روش رنگ‌آمیزی برای بررسی ساختار اسپرم ها، رنگ‌آمیزی جوهر هندی است (محمدی و براتی، ۱۳۸۸). سالم بودن آکروزوم یکی از ضروریات موفقیت در لقاح است. اگر آکروزوم اسپرم آسیب ببیند سبب اختلال در نفوذپذیری آکروزوم یا غشای پلاسمایی می شود، درنتیجه باعث خروج محتویات آنزیمی و سبب ناتوانی در نفوذ اسپرم به داخل تخمک می گردد (Johnson و همکاران، ۱۹۷۶؛ De lasHeras ، ۱۹۹۶). بنابراین شناسایی و تفریق اسپرم های حاوی آکروزوم طبیعی از اسپرم های حاوی آکروزوم دژنره یکی از مهم ترین آزمایش های منی است. براین اساس از روش های مختلفی برای ارزیابی آکروزوم اسپرم ها استفاده می شود. بررسی های اخیر که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روی نقایص اسپرم اسب های نابارور و کم بارور انجام شده است، نشان می دهد که نقایص آکروزومی، بویژه آکروزوم های جداشده، از مهم ترین عوامل ناباروری در این دام ها است (Pesch و همکاران، ۲۰۰۶).

مدت های طولانی آزمایش ارزیابی میزان تحرک بعنوان یک آزمایش اصلی برای ارزیابی کیفیت اسپرم ها مطرح بود (Kjaested و همکاران، ۱۹۹۳) اما با آزمایش بررسی وضعیت غشاء پلاسمایی و تحرک، بهتر می توان میزان باروری اسپرم ها را ارزیابی کرد (Henkel و همکاران، ۱۹۹۳). باتوجه به این که در طی پروسه لقاح غشاء پلاسمایی اسپرم نقش مهمی دارد، بنابراین اگر غشاء پلاسمایی ناسالم باشد عمل لقاح موفقیت آمیز نخواهد بود (Jeyendran و همکاران، ۱۹۸۴) بنابراین یکی از بهترین آزمایش هایی که به وسیله آن می توان وضعیت غشاء پلاسمایی اسپرم ها را انجام داد، آزمایش تورم هیپواسموتیک است (Samardžija و همکاران، ۲۰۰۸).

باتوجه به این که اسپرم ها طی انجماد و ذوب شدن، دچار تغییرات ساختاری و فیزیولوزیکی می شوند، بنابراین برای ارزیابی اسپرم های منجمد، لازم است آزمایش های مرسوم ارزیابی اسپرم ها بهینه شود. هدف از این مطالعه بهینه کردن آزمایش های معمول آزمایشگاه های آندرولوژی به منظور ارزیابی مناسب اسپرم های منجمد است.

مواد و روش کار:

در این مطالعه ۵۰ پایوت اسپرم منجمد گاوی هلشتاین از شرکت جاهد (کرج– ایران) خریداری شد و آزمایش های مختلفی به منظور بهینه سازی آزمایش های

مختلف ارزیابی اسپرم های منجمد روی آنها انجام گردید. برای ذوب کردن، پایوت های منجمد به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری تا از حالت انجماد خارج شوند (Correa و همکاران، ۱۹۹۷).

آزمایش تحرک:

برای انجام این آزمایش از دو روش بدون سانتریفوژ و با سانتریفوژ استفاده شد:

در روش بدون سانتریفوژ ۵۰ میکرولیتر منی را با ۵۰ میکرولیتر سرم نمکی ۳۷ درجه سلسیوس، مخلوط کرده و ۱۰ میکرولیتر از مخلوط را روی لام ۳۷ درجه سلسیوس، گذاشته و روی آن یک لامل قرار داده، سپس با درشت نمایی ۴۰۰ (میکروسکوپ CX31 الیمپوس)، درصد تحرک اسپرم ها بررسی شد.

در روش سانتریفوژ، ۵۰ میکرولیتر منی با ۱۰۰ میکرولیتر سرم نمکی ۳۷ درجه سلسیوس، مخلوط و به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی دور ریخته و ۵۰ میکرولیتر سرم نمکی به اسپرم های ته لوله اضافه شد، به آرامی مخلوط کرده و ۱۰ میکرولیتر از آن روی لام گرم قرار داده شد. سپس روی آن یک لامل گذاشته و با درشت نمایی ۴۰۰ میزان تحرک اسپرمها محاسبه گردید. برای تعیین درصد تحرک، اسپرمهای ۵ میدان دید بررسی شد (Anzar و همکاران، ۲۰۰۹).

آزمایش رنگ آمیزی حیاتی:

در این آزمایش از دو روش سانتریفوژ و بدون سانتریفوژ برای ارزیابی اسپرم ها استفاده شد. در روش ارزیابی با سانتریفوژ، ابتدا ۵۰ میکرولیتر اسپرم ذوب شده را با ۱۰۰ میکرولیتر سرم نمکی مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی را برداشته و ۵۰ میکرولیتر سرم نمکی ۳۷ درجه سلسیوس به اسپرم های ته لوله اضافه و به آرامی مخلوط شد. یک قطره مخلوط رنگ ائوزین نگروزین (محمدی و براتی ۱۳۸۸) را روی یک لام تمیز قرار داده و به وسیلهٔ شعلهٔ الکلی حرارت داده تا گرم شود. سپس یک قطره از مخلوط اسپرم را به رنگ اضافه کرده و به آرامی با هم مخلوط شدند. پس از تیمار مخلوط رنگ و اسپرم ها در زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه گسترش تهیه شده و خشک گردید.

در روش بدون سانتریفوژ، یک قطره مخلوط رنگ را روی یک لام تمیز قرار داده،گرم کرده، سپس یک قطره اسپرم ذوب شده به آن اضافه شد و مانند روش قبل در زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه گسترش تهیه کرده و خشک گردید. برای تهیه گسترش ۱۰ میکرولیتر از مخلوط رنگ و اسپرم را روی یک لام تمیز قرار داده و پس از تهیه گسترش خشک شد.

آزمایش مدت زمان زنده مانی:

در این آزمایش از دو روش رقیق شده با سرم نمکی و بدون رقیق کردن، مدت زمان زنده مانی اسپرم ها ارزیابی گردید. در روش رقیق کردن، ۲۵ میکرولیتر اسپرم ذوب شده به ۲۵ میکرولیتر سرم نمکی ۳۷ درجه سلسیوس اضافه گردید و به بن ماری ۳۷ درجه منتقل و در زمان های مختلف تا زمان بی حرکت شدن کامل اسپرم ها، وضعیت تحرک آنها بررسی شد.

در روش بدون رقیق سازی، ۱۰ میکرولیتر از منی ذوب شده را روی یک لام گرم ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده و روی آن را با یک لامل پوشانده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و هر ۵ دقیقه تحرک آنها بررسی گردید و زمانی که همهٔ اسپرم ها بی حرکت شدند، ثبت گردید.

اندازه گیری غلظت:

در این آزمایش ۲۵ میکرولیتر اسپرم ذوب شده را با ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرولیتر محلول فرمال سالین ۲٪ مخلوط کرده و با استفاده از لام هماسیتومتر، تعداد اسپرم ها شمارش شدند.

آزمایش رنگ آمیزی آکروزوم:

برای این آزمایش از اسپرم های ذوب شده بعد از دو روش سانتریفوژ و بدون سانتریفوژ گسترش تهیه گردید.

برای روش سانتریفوژ، همانند روش درصد تحرک، پس از عمل سانتریفوژ، گسترش تهیه گردید و پس از خشک شدن لام، برای ثابت کردن اسپرم ها از دو روش متانول ۹۶٪ و فرمال سالین ۵٪ استفاده شد. پس از ثابت شدن اسپرم ها، برای رنگ آمیزی، از مخلوط رنگ گیمسا با غلظت های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴٪ با زمان های رنگ آمیزی ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ ساعت استفاده شد.

آزمایش بررسی ساختار اسپرم ها:

در این آزمایش از رنگ آمیزی جوهر هندی با رقت های مختلف ۵۰ میکرولیتر جوهر با ۲۵ میکرولیتر اسپرم، ۵۰ میکرولیتر جوهر با ۵۰ میکرولیتر اسپرم و ۱۰۰ میکرولیتر جوهر با ۳۰ میکرولیتر اسپرم با زمان های تیمار ۳۰، ۶۰ و ۱۰۰ ثانیه استفاده شد. برای تهیهٔ گسترش ۱۰ میکرولیتر از مخلوط را روی لام قرار داده و گسترش تهیه و پس از خشک شدن با درشت نمایی ۴۰۰ و ۱۰۰۰ ساختار اسپرم ها بررسی شد.

آزمایش تورم هیپو اسموتیک:

برای این آزمایش از آب مقطر و محیط های نمکی، دکستروز نمکی و ساکارز با رقت های ۵۰ ، ۷۵، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی اسمول استفاده گردید. در این آزمایش ۲۰ میکرولیتر اسپرم ذوب شده را با ۲۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کرده و در زمان های ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سلسیوس تیمار شدند. پس از تیمار، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط را روی لام قرار داده و روی آن یک لامل گذاشته و با درشت نمایی ۴۰۰ و ۱۰۰۰ میزان نسبت اسپرم های واکنش داده به محیط هیپوتونیک بررسی گردید.

نتایج:

الف) در صد تحرک:

نتایج حاصل از آزمایش ها نشان داد که سانتریفوژ باعث کاهش درصد تحرک اسپرم ها می شود؛ بنابراین انجام سانتریفوژ برای بررسی درصد تحرک اسپرم های منجمد مناسب نیست. مناسب ترین حالت آن است که اسپرم های ذوب شده به نسبت ۱ به ۱ در یک میکروتیوب با سرم نمکی مخلوط شود و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گیرد و سپس میزان تحرک بررسی گردد.

ب) رنگ آمیزی حیاتی:

بهترین زمان برای انجام رنگ آمیزی حیاتی، بلافاصله پس از تهیه نمونه برای آزمایش تحرک است. بهترین زمان برای تیمار کردن اسپرم و رنگ ۶۰ ثانیه می باشد. سانتریفوژ باعث شفاف شدن اسپرم ها می شود، در نتیجه اسپرم ها پس از رنگ آمیزی با وضوح بهتری دیده می–شوند؛ به عبارت دیگر، تفکیک اسپرم های رنگی و بی رنگ بسیار بهتر صورت می گیرد اما عمل سانتریفوژ باعث افزایش اسپرم های مرده (رنگی) و درنتیجه باعث نتیجهٔ کاذب می شود. بهترین زمان برای شمارش و تعیین درصد اسپرم های مرده و زنده بلافاصله بعد از خشک شدن لام است و البته این زمان تا ۳ ساعت پس از خشک شدن قابل انجام است و اگر عمل تعیین درصد طولانی شود، درصد اسپرم های رنگی بیشتر می شود، به طوری که تمام اسپرم ها ۲۴ ساعت پس از خشک شدن لام، رنگی می شوند. بنابراین برای ارزیابی درصد اسپرم های زنده و مرده، نباید از سانتریفوژ استفاده کرد. بهترین زمان تیمار ۶۰ ثانیه و بهترین زمان بررسی لام ها بلافاصله پس از خشک شدن است (تصویر ۱).

ج) آزمایش مدت زنده مانی:

در این آزمایش مشخص شد که تفاوت معنی داری بین هر دو حالت رقیق کردن با سرم نمکی و بدون رقیق کردن وجود ندارد. بهترین حالت آن است که پس از قرار دادن اسپرم روی لام، یک لامل روی آن قرار گیرد.

د) اندازه گیری غلظت:

بهترین رقت برای شمارش تعداد اسپرم، مخلوط ۲۵ میکرولیتر اسپرم ذوب شده با ۷۵ میکرولیتر محلول فرمال سالین ۲٪ است.

هـ) آزمایش رنگ آمیزی آکروزوم:

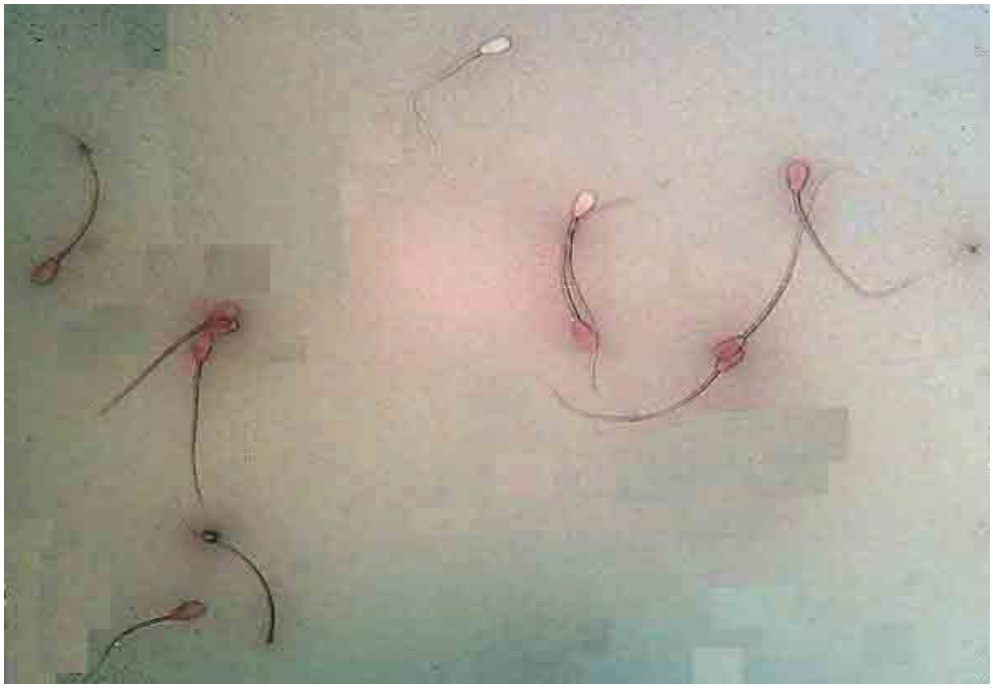
این آزمایش یک آزمایش حساس است و اگر در زمان رنگ آمیزی مراحل انجام کار با دقت انجام نگیرد، نتایج مناسبی به دست نمی آید. بهترین روش برای رنگ آمیزی آکروزوم بدین صورت است: ابتدا اسپرم ذوب شده را سانتریفوژ و سپس گسترش تهیه می کنیم و به مدت ۳۰ دقیقه با محلول فرمال سالین ۵٪ ثابت می گذاریم. سپس لام را بدون شستشو با آب مقطر، مستقیم به مخلوط رنگ گیمسای ۰/۵٪ منتقل کرده و به مدت ۸ تا ۱۰ ساعت در مخلوط رنگ قرار می دهیم (تصویر ۲). از مخلوط رنگ گیمسا با غلظت های بیشتر نشود، چون باعث باقی ماندن رنگ به صورت رسوب بر روی گسترش گردیده و در بررسی آکروزوم اختلال ایجاد می شود. استفاده از اتانول برای ثابت شدن گسترش نیز توصیه نمی شود چون نتایج مناسب و قابل قبولی به دست نمی آید.

ر) آزمایش بررسی ساختار:

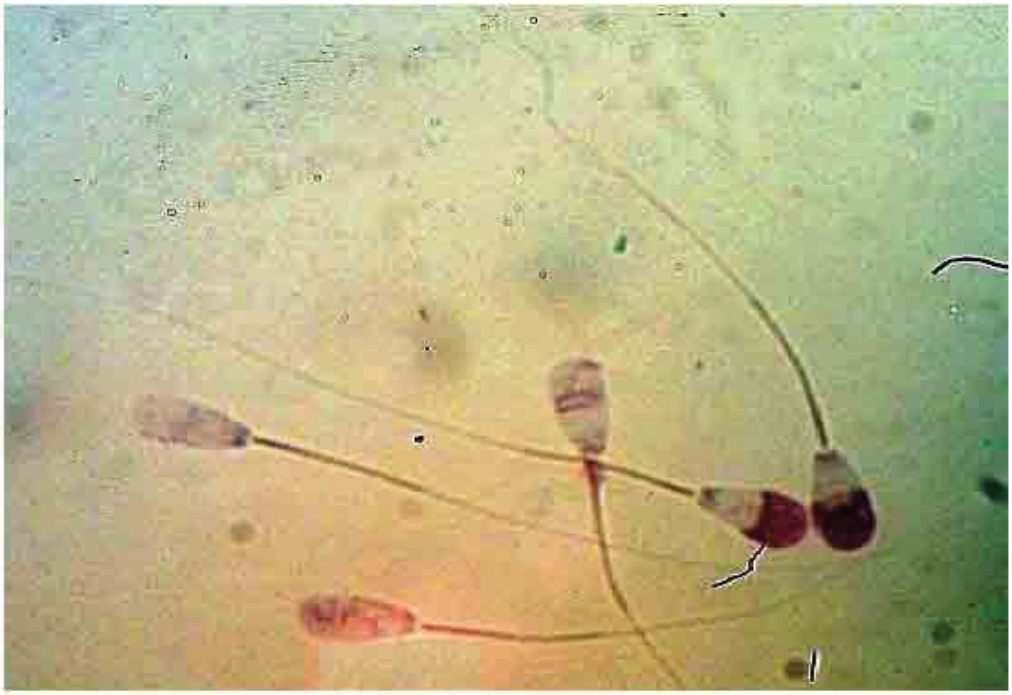
در این آزمایش لازم است که قبل از انجام آن، لامها با الکل ۵۰٪ شسته شوند. بهترین میزان نسبت اسپرم به جوهر، ۲۵ میکرولیتر اسپرم به ۵۰ میکرولیتر جوهر است. مناسب ترین مدت زمان لازم برای تیمار اسپرم و جوهر، ۶۰ ثانیه است. در این حالت اسپرم ها به قدر کافی رنگ گرفته و می توان با درشت نمایی ۴۰۰، بخوبی ساختار اسپرم ها را بررسی کرد (تصویر ۳). برای بررسی دقیق تر اسپرم ها می توان با درشت نمایی ۱۰۰۰ اسپرم ها را بررسی کرد.

ز) آزمایش تورم هیپواسموتیک:

در این آزمایش مشاهده شد که مدت زمان لازم برای تیمار اسپرم های ذوب شده با آب مقطر ۵ دقیقه است. بهترین محلول رقیق شده برای بررسی غشاء پلاسمایی اسپرم های منجمد گاوی، محلول دکستروز نمکی با رقت ۵۰ میلی اسمول است و مناسب ترین زمان تیمار ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس است (تصویر ۴).



تصویر ۱. گسترش رنگ آمیزی شده اسپرم با مخلوط رنگ حیاتی ائوزین نگروزین؛ (به اسپرم های زنده، بی رنگ و اسپرم های مرده، قرمز رنگ توجه شود)



تصویر ۲. گسترش رنگ آمیزی شده اسپرم با رنگ گیمسا ۰/۵٪، [به اسپرم های با آکروزوم سالم (رنگی) و بدون آکروزوم (بی رنگ)توجه شود]

تصویر ۳. گسترش رنگ آمیزی شده اسپرم با جوهر هندی، درشت نمایی ۴۰۰.

تصویر۴. گسترش تهیه شده اسپرم پس از تیمار با محلول هیپواسمول، (به پیچ خوردگی دم اسپرم ها که نشانه واکنش اسپرم ها به محلول هیپواسمول است توجه شود)

بحث:

برای ارزیابی آکروزوم از رنگ آمیزی های فلورسنت و معمولی استفاده می شود، در رنگ آمیزی معمولی از رنگ های گیمسا، کومسی بلو و تریپانبلو استفاده می شود. یکی از معروف ترین رنگ های مورد استفاده برای ارزیابی آکروزوم، استفاده از گیمسا است. در مطالعهٔ حاضر به واسطهٔ سهولت و در دسترس بودن و عدم نیاز به میکروسکوپ فلورسنت، از رنگ گیمسا استفاده شده است. برای بررسی آکروزوم باید رنگ آمیزی به صورتی باشد که لام دارای رسوب رنگ نباشد، مرز بین آکروزوم و محیط اطراف بخوبی مشخص و مرز بین آکروزوم و پس اکروزوم مشخص باشد. براساس نتایج حاصل از این مطالعه از مخلوط رنگ گیمسای ۰/۵٪ و مدت زمان تیمار ۸ تا ۱۰ ساعت استفاده شده است. در این روش آکروزوم بتدریج رنگ می گیرد و رسوب رنگ نیز روی گسترش باقی نمی ماند. براساس نتایج به دست آمده بهتر است اسپرم های ذوب شده قبل از تهیهٔ گسترش، سانتریفوژ شود تا مواد موجود در رقیق¬کننده که باعث مهار رنگ آمیزی آکروزوم می شود، حذف گردند. در مطالعهٔ Saacke و همکاران (۱۹۶۸)، از محلول ثبوت استفاده نگردید و مدت زمان رنگ آمیزی ۳۰ تا ۴۰ دقیقه و از محلول ۱/۱۰ محلول ذخیره استفاده شده بود. اما در مطالعهٔ Hackett و Macpherson (۱۹۶۵) از محلول ۱/۱۰ گیمسا و مدت زمان رنگ آمیزی ۳۰ تا ۶۰ دقیقه استفاده شده بود. Kutvolgyi و همکاران (۲۰۰۶) برای رنگ آمیزی آکروزوم از محلول گیمسای ۷/۵٪ و به مدت ۴ ساعت استفاده کردند. در مطالعهٔ Kovacs و همکاران (۲۰۱۰) نیز از گیسمای ۷/۵ درصد به همراه رنگ های مختلفی مانند قرمز خنثی و تریپانبلو استفاده شده بود که برای انجام آزمایش به فراهم کردن شرایط خاص برای رنگ آمیزی، نیاز است. براساس مطالعهٔ Berger و همکاران (۱۹۸۹)، برای مطالعهٔ آکروزوم از رنگ آمیزی سه گانه (بیسمارک قهوه ای، رز بنگال وتریپانبلو) به منظور بررسی آکروزوم و پس آکروزوم استفاده گردید. رنگ آمیزی فوق شاید رنگ آمیزی مناسبی باشد اما به علت داشتن مراحل زیاد و نیاز به مواد بیشتر، اندکی برای محقق آسان نیست در صورتی که از روش پیشنهادی این مطالعه استفاده شود می توان به همان نتایج نیز دست یافت. در هیچکدام از مطالعات فوق از سانتریفوژ قبل از رنگ آمیزی استفاده نشده بود؛ در صورتی که در مطالعهٔ حاضر از روش سانتریفوژ و بدون سانتریفوژ استفاده شده بود و مشخص شد که انجام سانتریفوژ قبل از رنگ آمیزی، علاوه بر این که تأثیری روی نتایج ندارد، بلکه باعث افزایش کیفیت رنگ پذیری اسپرم ها نیز می شود.

با توجه به این که در طی روند انجماد و ذوب شدن احتمال آسیب دیدن غشاء پلاسمایی اسپرم ها زیاد است و وجود غشاء پلاسمایی سالم بویژه در ناحیهٔ آکروزوم برای انجام لقاح ضروری است، بنابراین انجام آزمایش واکنش تورم هیپواسموتیک روی اسپرم های منجمد لازم است (Januskauskas و Zilinskas، ۲۰۰۲).

در مطالعهٔ Correa و Zavos (۱۹۹۴)، نسبت واکنش اسپرم های منجمد گاوی واکنش داده به محلول فروکتوز سیترات سدیم رقیق شده با رقت ۱۰۰ میلی اسمول بیشتر از رقت های ۵۰، ۷۵، ۱۲۵، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی اسمول بود، اما آنها از آب مقطر استفاده نکرده بودند. مطالعات Rota و همکاران (۲۰۰۰) نشان می دهد که مناسب ترین محلول برای آزمایش تورم هیپواسموتیک اسپرم های گاو، محلول فروکتوز سیترات سدیم ۱۰۰ میلی اسمول است؛ اما بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعهٔ حاضر، آب مقطر و محلول دکستروز نمکی با رقت ۵۰ میلی اسمول بهتر می تواند وضعیت غشاء پلاسمایی اسپرم های منجمد گاوی را بیان کند.

رنگ آمیزی حیاتی یک آزمایش کیفی است و نتایج آن زمانی ارزش بیشتری دارد که همراه با آزمایش های دیگر مانند تحرک و تورم هیپواسموتیک بررسی گردد. در این مطالعه مشخص شد که عمل سانتریفوژ باعث افزایش وضوح اسپرم ها می شود، اما تعداد اسپرم های مرده افزایش می یابد؛ بنابراین عمل سانتریفوژ اسپرم های منجمد به منظور جدا شدن محلول رقیق کنندهٔ اسپرم توصیه نمی شود. براساس نتایج به دست آمده مناسب ترین زمان تیمار اسپرم و رنگ حیاتی ۶۰ ثانیه است و بهترین زمان برای تعیین درصد اسپرم های زنده و مرده بلافاصله بعد از خشک شدن گسترش است و نباید از ۳ ساعت بیشتر شود.

مطالعهٔ انجام گرفته روی اسپرم انسان بیان می کند که مدت زمان ۳۰ ثانیه برای تیمار اسپرم و رنگ مناسب است (Nasre-Esfahani و همکاران، ۲۰۰۲). اما در مطالعهٔ Kulaksiz و همکاران (۲۰۱۰) پس از مخلوط کردن اسپرم بز و رنگ ائوزین نگروزین، گسترش تهیه می گردید و زمانی

برای تیمار منظور نمی شد.

برای مطالعهٔ ساختار اسپرم ها از رنگ های مختلفی استفاده می شود. در مطالعهٔ Al-Makhzoomi و همکاران (۲۰۰۸)، از رنگ کربول فوشین برای بررسی ساختار اسپرم ها استفاده شده بود. در صورتی که Freneau و همکاران (۲۰۱۰) از رنگ ائوزین برای بررسی ساختار اسپرم ها استفاده کرده بودند. در مطالعهٔ حاضر از رنگ آمیزی ساده، ارزان و در دسترس جوهر هندی استفاده شده است و با استفاده از بزرگ نمایی ۴۰۰ و ۱۰۰۰ می توان ساختار اسپرم ها را بخوبی بررسی نمود.

آزمایش تحرک، بهترین آزمایش ارزیابی اسپرم های منجمد است (محمدی و براتی، ۱۳۸۸)؛ بنابراین این آزمایش، اولین آزمایش و بلافاصله بعد از ذوب شدن پایوت باید انجام گیرد. سانتریفوژ کردن اسپرم های ذوب شده سبب کاهش تحرک اسپرم ها میگردد؛ از این رو عمل سانتریفوژ نباید در زمان ارزیابی میزان تحرک اسپرم های منجمد انجام گیرد. براساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، بهترین حالت برای ارزیابی میزان تحرک اسپرم های ذوب شده، تیمار اسپرم ها با سرم نمکی در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۵ دقیقه است سپس ارزیابی تحرک اسپرم ها انجام گیرد.

سپاسگزاری:

این مطالعه از محل اعتبارات پژوهشی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام پذیرفته است، بدین وسیله مراتب تشکر خود را اعلام می داریم.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 3 (2011) 135-145

Modified methods for evaluation of bull frozen-thawed sperm

Mohammadi, G.[1*], Mahdion, H.[2], Gooraninejad, S.[1], Khadjeh, Gh.[1], mashkourzadeh M.[3]

Received: 05.07.2011 Accepted: 31.12.2011

Abstract

Damages of sperms following cryopreservation reduce fertility rate of sperm. Therefore evaluation of frozen-thawed sperm is important to assess of fertility rate of the sperm. Routine methods used for evaluation of sperms are not suitable for frozen sperm. Hence modifying of these methods is essential. The most important of assessing of frozen-thawed sperm are rate of motility test, number of dead and alive sperms, assess of acrosome and plasma membrane of sperm, and rate of morphological abnormalities of sperm. The aim of this study was modifying techniques to evaluate quality of frozen-thawed sperm.

Keywords: Modified, evaluation, frozen-thawed sperm, Cattle, Iran.

1. Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahwaz, Ahwaz, Iran.

2. Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahwaz, Ahwaz, Iran.

3. Agricultural organization of khouzestan province, Ahwaz, Iran.

*Corresponding author: ghmohammadi9@yahoo.com

منابع

محمدی ق، و براتی ف. ۱۳۸۸، تلقیح مصنوعی در حیوانات اهلی، اولین ویرایش، انتشارات دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

Al-Makhzoomi, A., Lundeheim, N., Haard, M., Rodrıguez-Martınez, H. 2008. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. Theriogenology, **70**, 682–691.

Anzar, M., Kroetsch, T., Buhr, M.M. 2009. Comparison of Different Methods for Assessment of Sperm Concentration and Membrane Integrity With Bull Semen. Journal of Andrology, **30(6)**, 661-668.

BallP, J.H., Peters, A.R. 2004. Reproduction in Cattle. Third ed. Blackwell Publishing, UK.

Berger, T., Turner, K.O., Meizel, S., Hedricck, J.L. 1989. The zonapellucida induced acrosome reaction in boar sperm. Biology of Reproduction, **4**0, 525-530.

Correa, J.R., Zavos P.M. 1994. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. Theriogenology, **42**, 351-360.

Correa, J.R., Pace, M.M., Zavos, P.M. 1997. Relationship among frozen- thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility. Theriogenology, **48**, 721-731.

De Las Heras, M.A., Valcarcel, A., Furnus, C., Perez, L., Moses, D., Baldassarre, H. 1996. Changes in sperm-bound amidase activity suggest subtle damage to ram sperm acrosomes by freezing/thawing, not detected by light microscopy, Animal Reproduction Science, **45**, 81-89.

Foote, R.H. 2003. Fertility estimation: A review of past experience and future prospects. Animal Reproduction Science, **75**, 119–139.

Freneau, G.E., Chenoweth, P.J., Ellis, R., Rupp G. 2010. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. Animal Reproduction Science, **118**, 176–181.

Hackett, A. J., Macpherson, J.W. 1965. some staining procedures for spermatozoa, a review. Canandian Veterinary Journal, **6(3)**, 55-62.

Hafez, E.S.E., Hafez, B. 2000. Reproduction in farm animals. Seventh ed. Philadelphia Publishing, USA.

Henkel, R., Muller, C., Miska, W., Gips, H., Schill W.B. 1993. Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. Human Reproduction, **8**, 2128-2132.

Hulet, C.V., Ercanbrack, S.K., 1962. A Fertility Index for rams. Journal of Animal Science, **21**, 489-493.

Januskauskas, A., Zilinskas, H., 2002. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. Veterinarija IR Zootechnika, **17(39)**, 17-25.

Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D., 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. Journal of Reproduction Fertility, **70**, 219-228.

Johnson, L., berndtson, W. E., Pickett B.W. 1976. An Improved Method For Evaluating Acrosome of Bovine Spermatozoa. Journal of Animal Science, **42**, 951-954.

Kjaestad, H., Ropstad, E., Andersen, K. 1993. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. Acta Veterinaria Scandinavica, **34**, 299-303.

Kovacs, A., Sarlos, P., Olah, J., Egerszegi, I. 2010. Improved viability and acrosome staining to frozen-thawed semen samples - technical note. Animal Sciences and Biotechnologies, **43 (1)**, 1-3.

Kulaksiz, R., Daskin, A. 2010. In vitro evaluation of Saanen buck semen frozen in different extenders supplemented with various antioxidants. Ankara University Veteterinary Fak Derg, **57**, 151-156.

Kutvolgyi, G., Stefler J, Kova´cs A. 2006. Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. Biotechnic & Histochemistry, **81(4-6)**, 109-117.

Martinez, A.I.P. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. Animal Reproduction Science, **82-83**, 209-224.

Nasr-Esfahani, M.H., Aboutorabi, R., Esfandiari, E., Mardani M. 2002. Sperm MTT Viability Assay: A New Method for Evaluation of Human Sperm Viability. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, **19(10)**, 477-482.

Pesch, S., Bostedt, H., Failing, K., Bergmann, M. 2006. Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. Animal Reproduction Science, **91**, 285-298.

Roberts, S.J. 1986. Veterinary Obstetrics and Genital Diseases (Theriogenology). Third ed. Edvards brothers, North Pomfret, USA.

Rota, A., Penzo, N., Vincenti L., Mantovani R. 2000. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. Theriogenology, **53**, 1415-1420.

Saacke, R.G., Amann, R.P., Marshall, C. E. 1968. Acrosomal Cap Abnormalities of Sperm from Subfertile Bulls. Journal of Animal Science, **27**,1391-1400.

Samardzija, M., Dobranić, T., Kruslin, S., Cergolj, M., Karadjole M., Prvanovic N., Grizelj J. 2008. The use of the hypoosmotic swelling test and supravital staining in evaluation of sperm quality in boars. Veterinarski Arhiv, **78**, 279-287.