(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124759

اثر تنش حرارتی مصنوعی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاو پس از یخ‌گشایی

- **افشین سیفی‌جمادی:** گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **حمید کهرام*:** گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **مهدی ژندی:** گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **آن ون سام:** گروه مامایی، تولیدمثل و سلامت گله، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه گنت، گنت، بلژیک

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٨ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٨

چکیده

در این آزمایش به‌منظور مطالعه اثر تنش حرارتی بر کیفیت اسپرم گاوهای نژاد آبی بلژیکی از سه رأس گاو نر آبی بلژیکی که در شرایط یکسان مدیریتی و تغذیه قرار داشتند برای اسپرم‌گیری استفاده شد. برای شبیه‌سازی اثرات تنش حرارتی بیضه دو راس گاو نر با استفاده از کیسه نایلونی عایق‌سازی شد. پس از دو هفته در مجموع تعداد پنج انزال از گاوهای نر جمع‌آوری شده و پس از ارزیابی‌های اولیه، منجمد شدند. پس از یخ‌گشایی، فراسنجه‌های جنبایی، ناهنجاری‌های اسپرم، یکپارچگی غشای آکروزومی، وضعیت کروماتین اسپرم‌ها، زنده‌مانی، تولید رادیکال‌های آزاد هیدروژن پراکسید و هیدروکسیل ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که درصد جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده و حرکت درمسیر مستقیم در گروه تحت تنش حرارتی به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد بود. هم‌چنین، درصد ناهنجاری‌های کل، اسپرم‌های با دم‌های گره خورده و اسپرم‌های با قطره پروتوپلاسمی سری در گروه تحت تنش حرارتی بیش‌تر از گروه شاهد بود ($P\leq ۰/۰۵$). براساس نتایج به‌دست آمده، تنش حرارتی باعث افزایش ناهنجاری‌های کروماتین اسپرم گاو شده ($P\leq ۰/۰۵$) اما اثر معنی‌داری بر افزایش آسیب‌های آکروزومی اسپرم‌ها نداشت. هم‌چنین، تنش حرارتی باعث کاهش زنده‌مانی اسپرم‌ها پس از یخ‌گشایی شده ($P\leq ۰/۰۱$) و میزان تولید پروکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل را افزایش می‌دهد ($P\leq ۰/۰۵$). براساس نتایج این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که تنش حرارتی می‌تواند اثرات نامطلوبی بر ویژگی‌های کیفی اسپرم پس از انزال داشته و احتمالا باروری گاوها را نیز تحت تاثیر قرار دهد.

کلمات کلیدی: انجماد اسپرم، باروری، رادیکال‌های آزاد، شاخص دما و حرارت

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Hamid_kohram@yahoo.com

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124759

مقدمه

تنش حرارتی یکی از نتایج اصلی و مستقیم بروز تغییرات آب و هوایی در جهان به‌شمار می‌روند که توسط شاخص‌هایی از قبیل دمای محیط، رطوبت، تابش آفتاب، بارش و باد تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Habeeb و همکاران، ۲۰۱۸). شاخص دمایی- رطوبتی (Thermal Humidity Index, THI) شاخصی است که با تلفیق اثر دما و رطوبت محیط، ارزیابی دقیق و کمی اثر تنش حرارتی بر جانوران را میسر می‌سازد (Dikmen و Hansen، ۲۰۰۹؛ Habeeb و همکاران، ۲۰۱۸). گزارش شده است که دامنه قابل تحمل THI در جانوران می‌تواند بر اساس شرایط آب و هوایی منطقه تغییر پیدا کند. بر این اساس، در پژوهشی گزارش شد که آستانه THI برای گاوهای شیری در منطقه آب‌وهوایی اروپا، نسبت به مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری بسیار پایین‌تر است (Al-Kanaan و همکاران، ۲۰۱۵). در جانوران، دمای محیطی بالا، باعث افزایش دمای عمومی بدن، به نقطه‌ای بالاتر از نقطه دمایی فیزیولوژیک شده و منجر به کاهش تولید (Silanikove و Koluman، ۲۰۱۵) و اختلال در تولیدمثل (Boni، ۲۰۱۹). می‌گردد. هم‌چنین نشخوارکنندگان، به‌دلیل تولید گرمای متابولیکی به‌واسطه تولید شیر، نشخوار و هضم میکروبی، حساسیت بالایی به تنش حرارتی نشان می‌دهند (Cheng و همکاران، ۲۰۱۶). در این راستا گزارش شده است که تنش حرارتی منجر به کاهش کیفیت اسپرم گاوها می‌شود که به نوبه خود در کاهش نرخ آبستنی و گیرایی نقش اساسی دارد. علاوه بر آن، تنش حرارتی سبب کاهش غلظت، جنبایی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، و افزایش احتمال بروز جهش در DNA و افزایش ناهنجاری‌های اسپرم می‌گردد (Sabés-Alsin و همکاران، ۲۰۱۶). هم‌چنین در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است که افزایش دمای محیطی در دامنه‌ای بالاتر از ظرفیت دمایی بدن منجر به افزایش ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی اسپرم انسان (Durairajanayagam و همکاران، ۲۰۱۵) موش (Paul و همکاران، ۲۰۰۹)، قوچ (Hamilton و همکاران، ۲۰۱۶)، نریان (Brito و همکاران، ۲۰۰۳) و گاو نر (Cheng و همکاران، ۲۰۱۶) می‌شود، که نتیجه آن کاهش باروری است (Yaeram و همکاران، ۲۰۰۶). در تنش حرارتی، حیوانات برای جبران تنش وارد شده، دمای بدن خود را از طریق تغییرات فیزیولوژیکی تغییر می‌دهند. این تغییرات باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (Paul و همکاران، ۲۰۰۸)، که اولین عامل کاهش کیفیت اسپرم‌ها به‌شمار می‌روند (Castro و همکاران، ۲۰۱۶؛ Sabés-Alsina و همکاران، ۲۰۱۶). اسپرم‌سازی در گاوهای نر فرآیندی تقریباً ۶۰ روزه است که دارای سه مرحله مجزا (اسپرمیوژنز، میوز و اسپرماتوسیتوژنسیز) می‌باشد (Sabés-Alsin و همکاران، ۲۰۱۹). پس از این مراحل اسپرم‌ها برای رسیدن به بلوغ کامل و تبدیل شدن به اسپرم‌های کاربردی، نیاز به یک مرحله بلوغ تکمیلی در اپیدیدم بیضه نیز دارند (Staub و Johnson، ۲۰۱۶). گزارش شده است که طی فرآیند اسپرم‌سازی، سلول‌های زاینده حساس‌ترین سلول‌ها به تنش حرارتی هستند. هم‌چنین، سلول‌های موجود در مرحله پاکی‌تن (Pachytene) و دیپلوتن (Diplotene) میوز یک و سلول‌های اسپرماتید اولیه حساسیت بالایی نسبت به تنش حرارتی دارند (Shiraishi و همکاران، ۲۰۱۲). در مقابل، سلول‌های موجود در اپیدیدیم بیضه هیچ واکنش فعالی نسبت به تنش حرارتی نشان نمی‌دهند (Rahman و همکاران، ۲۰۱۴). به‌نظر می‌رسد اثرات منفی تنش حرارتی بر اسپرم پستانداران بلافاصله پس از بروز تنش قابل بررسی نیست (Llamas-Luceño و همکاران، ۲۰۲۰). بلکه این اثرات دو هفته پس از تنش حرارتی وتا ۸ هفته پس از آن در انزال قابل مشاهده خواهند بود (Hansen، ۲۰۰۹). بنابراین، اگر ارزیابی اثر تنش حرارتی بر فراسنجه‌های اسپرم بلافاصله پس از بروز در انزال بررسی شود، نتایج دقیق‌تری به‌دست نخواهد آمد. گاو نژاد آبی بلژیکی (Belgian Blue) جزو گاوهای نژاد گوشتی است که ویژگی بارز آن تولید عضلات دوگانه (Double-muscled) در پی بروز یک جهش در ژن مربوط به جلوگیری از رشد بی‌رویه عضلات است. این نژاد، منبع اصلی تولید گوشت در کشورهای مرکزی اروپا به‌ویژه بلژیک می‌باشد (De Behr و همکاران، ۲۰۰۱). گزارش‌های مختلف نشان داده‌اند که عضلانی بودن شدید، کیسه بیضه کوچک و ظرفیت تنظیم دمایی پایین در بیضه این نژاد (Rahman و همکاران، ۲۰۱۱). سبب شده است تا گاوهای نر این نژاد حساسیت بالایی به تنش حرارتی (Hoflack و همکاران، ۲۰۰۷؛ ۲۰۰۶) به‌ویژه در آب و هوای مرطوب بلژیک نشان دهند. هم‌چنین، در پژوهشی دیگر گزارش شد که گاوهای نژاد آبی بلژیکی حساسیت بیش‌تری به تنش حرارتی نسبت گاوهای هلشتاین دارند (Rahman و همکاران، ۲۰۱۱). به‌نظر می‌رسد استفاده از روش‌های آمیخته‌گری گاوهای گوشتی آبی بلژیکی با نژادهای موجود در ایران نقش اساسی در بهبود و خودکفایی تولید گوشت در کشور داشته باشد. هم‌چنین با توجه به اهمیت تنش حرارتی در تولیدمثل گاوهای شیری و گوشتی، هدف از انجام این آزمایش مطالعه اثر تنش حرارتی شبیه‌سازی شده (مصنوعی) به‌وسیله عایق‌سازی بیضه بر تولید رادیکال‌های آزاد و کیفیت اسپرم گاوهای آبی بلژیکی بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات و جمع‌آوری اسپرم: در این آزمایش از سه رأس گاو نر نژاد آبی بلژیکی (سن ۴۱ تا ۴۳ ماه) که در مرکز جمع‌آوری و انجماد اسپرم شرکت AWE واقع در شهر سینی کشور بلژیک (Ciney) (موقعیت جغرافیایی ۵ و ۲۹ درجه شمالی و ۵ و ۱۱ درجه شرقی) تحت شرایط یکسان تغذیه‌ای و مدیریتی نگه‌داری می‌شدند، استفاده

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124759

شد. برای بررسی اثر تنش حرارتی بر کیفیت اسپرم گاوها، بیضه دو راس گاو نر به‌مدت دو روز عایق شدند تا تحت تنش حرارتی قرار گیرند. هم‌چنین در این آزمایش از اسپرم‌های یک راس گاو نر نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد. اسپرم‌گیری و انجماد جداگانه اسپرم‌ها ۱۴ تا ۲۸ روز پس از تنش حرارتی انجام شده و براساس پژوهش‌های قبلی، هر انزال به‌عنوان یک تکرار (در مجموع ۱۵ انزال از سه راس گاو نر) درنظر گرفته شد (Rahman و همکاران، ۲۰۱۴). در این پژوهش روزهای ۱۴ تا ۲۸ پس از بروز تنش حرارتی به‌عنوان روز نمونه‌گیری استفاده شد (Sabés-Alsina و همکاران، ۲۰۱۹). برای شبیه‌سازی اثر تنش حرارتی بیضه. پس از قرار دادن بیضه در کیسه، اطمینان حاصل شد که کیسه بیضه تا انتهای شکمی آن در کیسه قرار گرفته باشند. سپس طی دو روز آینده بیضه‌ها بررسی شدند تا تصادفاً از کیسه خارج نشده باشند. طی زمان عایق‌سازی گاوها در حالت طبیعی در داخل جایگاه نگه‌داری شده و دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند. این روند در اواخر تابستان و زمانی که تنش حرارتی تابستانی (تنش حرارتی طبیعی) به اتمام رسیده بود انجام شد (Rahman و همکاران، ۲۰۱۱).

پردازش و انجماد اسپرم: انزال‌های دارای بیش از ۶۰ درصد جنبایی کل و بیش از ۳۰۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر توسط رقیق‌کننده اُپتیدیل (Cryo-Vet, Quebriac, France) رقیق‌شده (۱۰۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر) و طی چهار ساعت تا دمای چهار درجه سانتی‌گراد سرد شدند. سپس منی رقیق و سرد شده با استفاده از دستگاه‌های بسته‌بندی (IMV, Technologies-Digitcool, L'Aigle, France) به‌داخل پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شده و توسط یک سیستم برنامه‌دار منجمد شدند (IMV, Technologies-Digitcool, L'Aigle, France). به‌طور خلاصه در مرحله اول دمای پایوت‌ها تا ۱۰- درجه سانتی‌گراد و با نرخ ۵- درجه سانتی‌گراد در دقیقه کاهش یافت سپس دمای پایوت‌ها از دمای ۱۰- تا ۱۴۰- درجه سانتی‌گراد، با نرخ ۴۰- درجه سانتی‌گراد در دقیقه کاهش یافته و در مرحله بعدی در ازت مایع غوطه‌ور شده و پس از انجماد کامل، پایوت‌ها در مخزن ازت مشخص ذخیره‌سازی شدند (Ashrafi و همکاران، ۲۰۱۷).

ارزیابی فراسنجه‌های حرکتی و ریخت‌شناسی اسپرم‌های یخ‌گشایی شده: پایوت‌های منجمد شده برای هر گاو نر در هر انزال (پنج تکرار) درون آب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد یخ‌گشایی شده و با استفاده از یک بافر با نسبت یک به سه (۱:۳) رقیق شده و به‌مدت پنج دقیقه بر روی یک صفحه گرم نگه‌داشته شدند، سپس یک قطره (معادل ۳ میکرولیتر) از نمونه بر روی لام لجا (۳۷ °C; Leja counting chambers, depth 20 mm; Microptics, Barcelona, Spain) قرار گرفته و برای ارزیابی فراسنجه‌های حرکتی و ریخت‌شناختی وارد سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (CASA) شدند (IVOS-II CASA system, Hamilton Thorne Inc, Beverly, USA). حداقل ۱۰۰۰ اسپرم در هر نمونه و در هشت میدان مختلف و با بزرگ‌نمایی ۱۰۰X ارزیابی شدند. سیستم کامپیوتری مذکور کلیه اعمال نظیر ثبت تصویر، تنظیم و انتخاب میدان‌های دید را به‌طور کاملاً خودکار انجام داده و پس از ارزیابی، نتایج به‌دست آمده را که شامل فراسنجه‌های حرکتی و ناهنجاری‌های ریخت شناسی هستند، در قالب فایل اکسل به اپراتور ارایه می‌کند (Murphy و همکاران، ۲۰۱۸). فراسنجه‌های حرکتی ارزیابی شده شامل جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده، سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده (VCL)، سرعت اسپرم در خط مستقیم (VSL)، میانگین سرعت در مسیر مستقیم (VAP)، درصد خطی بودن حرکت اسپرم (LIN)، درصد مستقیم بودن حرکت اسپرم (STR)، حداکثر دامنه حرکات جانبی (ALH) و فرکانس حرکات جانبی (BCF) برحسب هرتز بود. همچنین، ناهنجاری‌های ریخت شناسی نیز شامل درصد ناهنجاری‌های کل، درصد اسپرم‌های با دم خمیده و پیچ خورده، درصد اسپرم‌های با قطره‌های پروتوپلاسمی نزدیک به سر و نزدیک به دم بودند.

ارزیابی وضعیت آکروزوم اسپرم‌های یخ‌گشایی شده: وضعیت غشای آکروزومی اسپرم‌ها با استفاده از پروب فلوئورسنت PNA متصل به FITC ارزیابی شد (PNA-FITC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). به‌طور خلاصه، نمونه‌ها با استفاده از PBS فاقد منیزیوم$^{+2}$ و کلسیم$^{+2}$ (PBS^{-}) با شتاب ۶۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه شستشو شدند. سپس به‌میزان یک میکروگرم در میلی‌لیتر از محلول PNA-FITC به آن‌ها اضافه شده و در محل تاریک با دمای اتاق به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. پس از دوبار شستشوی دیگر، اسپرم‌های رنگ آمیزی شده روی اسلایدها قرار گرفته و با استفاده از میکروسکوپ مجهز به سیستم فلوئورسنت با بزرگ‌نمایی ۲۰۰X ارزیابی شدند. برای تشخیص اسپرم‌های با آکروزوم سالم، حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شده و درصد نسبی اسپرم‌های دارای آکروزوم سالم محاسبه گردید (Leemans و همکاران، ۲۰۱۴). اسپرم‌هایی که بدون ناحیه روشن در بخش آکروزومی بودند به‌عنوان اسپرم‌های طبیعی و اسپرم‌هایی که در ناحیه آکروزومی نوری را نشان می‌دادند به‌عنوان اسپرم‌های با آکروزوم آسیب‌دیده در نظر گرفته شدند (Nizański و همکاران، ۲۰۱۲).

ارزیابی وضعیت کروماتین اسپرم‌های یخ‌گشایی شده: وضعیت کروماتین اسپرم‌ها با استفاده از رنگ فلوئورسنت CMA_3 انجام شد (Sigma-aldrich, Diegem, Belgium). در این روش، اسپرم‌ها پس از یخ‌گشایی با استفاده از PBS^{-} شستشو شده (سانتریفیوژ با قدرت ۶۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه) و در محلول کارنوی (Carnoy's solution) فیکس شدند. محلول کارنوی از ترکیب متانول و استیک اسید به نسبت سه به یک به‌دست می‌آید. سپس پلیت تشکیل‌شده در سه قطره از محلول PBS^{-} مجدداً رقیق شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی با استفاده از

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124759

رنگ CMA_3 در دمای اتاق انکوبه شدند. رنگ CMA_3 از حل شدن ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر CMA_3 که در محلول مکیلوین (McIlveen solution) (شامل: هفت میلی‌لیتر سیتریک اسید ۰/۱ مولار، ۳۲/۹ میلی‌لیتر از سیدم فسفات هفت آبه ۰/۲ مولار و ۱۰ میلی‌مول کلیرید منیزیوم) به‌دست می‌آید. سپس نمونه‌ها برای ارزیابی دقیق کل سلول‌ها با پنج میلی‌گرم در میلی‌لیتر از رنگ فلئورسنت هوخست ۳۳۳۴۲ به‌مدت پنج دقیقه انکوبه شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها برای حذف مقادیر اضافی رنگ‌های فلوئورسنت و با استفاده از PBS^- شستشو شدند. برای آماده‌سازی اسلایدها، نمونه‌های شستشو شده با استفاده از محلول دابکو [۱،۴-diazabicy- clo (2.2.2) octane solution, DABCO] روی لام قرار گرفتند. برای ارزیابی وضعیت کروماتین حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید با بزرگ‌نمایی ۲۰۰x میکروسکوپ مجهز به سیستم فلوئورسنت (Olympus IX80, Olympus Corporation) شمارش شدند (Castro و همکاران، ۲۰۱۸). اسپرم‌هایی که رنگ سبز متمایل به زرد روشن نشان می‌دادند به‌عنوان اسپرم‌های با کروماتین نابجا و اسپرم‌های با رنگ سبز تیره به‌عنوان اسپرم‌های با وضعیت کروماتین مناسب دسته‌بندی شدند (Rahman و همکاران، ۲۰۱۱).

ارزیابی‌های فلوسایتومتری اسپرم‌های یخ‌گشایی شده: برای ارزیابی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری، تعداد سه پایوت از هر انزال (چهار تکرار) یخ‌گشایی شده و با همدیگر مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها دوبار در PBS^- شستشو شده (با قدرت ۶۰۰g در دقیقه به‌مدت پنج دقیقه در محیط تاریک) و مجدداً تا غلظت نهایی ۲/۵ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر رقیق شدند (با استفاده از PBS^-). سپس برای هرکدام از ارزیابی‌های فلوسایتومتری ۲۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل (معادل نیم میلیون اسپرماتوزوا در هر نمونه) اختصاص داده شد. ارزیابی‌های فلوسایتومتری با استفاده از دستگاه سایتوفلکس (CytoFLEX, Beckman Coulter Inc., Atlanta, Georgia, USA) که مجهز به سه نوع لیزر مختلف ۴۰۵، ۴۸۸ و ۶۳۸ نانومتری بود، انجام شد. پس از کالیبره کردن دستگاه فلوسایتومتری، نمونه‌های رنگ شده با طول موج ۴۸۸ نانومتر برانگیخته شده و سپس توسط دستگاه بررسی شدند. برای ارزیابی هریک از فراسنجه‌ها از قبیل زنده‌مانی، میزان تولید H_2O_2 و تولید یون‌های سوپراکسید، شدت فلوئورسنت PI و FITC با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری ارزیابی شدند. براساس اطلاعات حاصل از دفترچه راهنما دستگاه و رنگ‌های استفاده شده، فلوئورسنت PI در طول موج ۵۸۲/۴۲ و فلئورسنت FITC در طول موج ۵۲۵/۴۰ برانگیخته می‌شدند. در مجموع با استفاده از فلوسایتومتر ۱۰۰۰۰ مشاهده (اسپرماتوزوا) با نرخ گذر (Flow rate) ۳۰ میکرولیتر در دقیقه برای هر نمونه ارزیابی شد. پس از به‌دست آوردن داده‌ها، همه آن‌ها براساس گروه شاهد فلوسایتومتری تصحیح شده، سلول‌های اسپرم که به‌صورت انفرادی رنگ شده بودند برای ادامه ارزیابی‌ها استفاده شدند. کلیه سلول‌های به‌هم چسبیده و ذرات ریز موجود در نمونه از مجموعه داده‌های حاصل خارج شدند. سپس برای کمی‌سازی داده‌ها از نرم‌افزار CytExpert نسخه v2.0.0.153 استفاده شد (Beckman Coulter, Inc., California, USA). کانال‌های PI و FITC چهار زیر مجموعه از اسپرم‌ها را ایجاد کردند (Husseini و همکاران، ۲۰۱۸).

اندازه‌گیری میزان تولید پراکسید هیدروژن و یون هیدروکسیل: در این پژوهش میزان تولید پراکسید هیدروژن (H_2O_2) با استفاده از پروب فلوئورسنت ۲ و ۷ دی کلرودی هیدروفلوئورزین دی استات (DCFH-DA, Sigma-aldrich, Diegem, Belgium) و هم‌چنین میزان تولید رادیکال سوپراکسید (O^{-*}) با استفاده از پروب CellROX green (Waltham, MA, USA) ارزیابی شد (Lançoni و همکاران، ۲۰۱۷؛ Maíra Bianchi Rodrigues و همکاران، ۲۰۱۵). به این منظور یک الایکوت‌های ۲۰۰ میکرولیتری به‌همراه ۱۰۰ میکرومول محلول حاوی پروب فلوئورسنت DCFH-DA و یکی دیگر با استفاده از پنج میکروکول محلول حاوی پروب CellROX green به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها دوبار با استفاده از PBS^- شستشو شده (با قدرت ۲۷۰g به‌مدت پنج دقیقه) و ۱/۵ میکرومول پروب پروپیدیوم آیداید (PI) به آن‌ها اضافه شد. پس از حدود پنج دقیقه انکوباسیون مجدد در تاریکی، نمونه‌ها به ظرف مخصوص (ظرف دارای ۹۶ چاهک) دستگاه فلوسایتومتری منتقل شدند. یک نمونه ۲۰۰ میکرولیتری رنگ‌آمیزی نشده نیز به‌عنوان گروه شاهد فلوسایتومتری به‌همراه نمونه‌ها وارد چاهک‌های ظرف فلوسایتومتری شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به‌میزان تولید رادیکال‌های آزاد، نمودار جمعیت بررسی شده برای هر ارزیابی توسط نرم‌افزار CytExpert، در چهار زیرمجموعه تقسیم می‌شود. زیرمجموعه اول (چارک راست پایینی) نشان‌دهنده بخشی از جمعیت اسپرم که زنده بوده و رنگ نگرفته‌اند (PI^-/DCF یا $PI^-/CellROX^-$). زیرمجموعه دوم (چارک راست بالایی) نشان‌دهنده جمعیت مرده که H_2O_2 یا یون سوپراکسید تولید نمی‌کنند (PI^+/DCF^- یا $PI^+/CellROX^-$). زیرمجموعه سوم (چارک چپ پایینی) شامل بخشی از جمعیت است که علی‌رغم زنده بودن تولید رادیکال‌های آزاد دارند (PI^-/DCF^+ یا $PI^-/CellROX^+$) و در نهایت آخرین زیرمجموعه (چارک بالایی چپ) نشان‌دهنده اسپرم‌های مرده‌ای هستند که رادیکال‌های آزاد تولید می‌کنند (PI^+/DCF^+ یا $PI^+/CellROX^-$). برای تجزیه و تحلیل آماری اعداد زیرمجموعه سوم که شامل اسپرم‌های زنده که H_2O_2 تولید می‌کنند، استفاده شد (Castro و همکاران، ۲۰۱۶).

ارزیابی میزان زنده‌مانی اسپرم‌های یخ‌گشایی شده: زنده‌مانی اسپرم‌های یخ‌گشایی شده با استفاده از پروب فلوئورسنت PI انجام شد. برای این ارزیابی ۲۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی اسپرم شستشو شده

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124759

به‌مدت ۵پنج دقیقه با ۱/۵ میکرومول PI در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در محفظه تاریک انکوبه شد. سپس نمونه‌ها دوبار شستشو شده و با استفاده از PBS^- رقیق شدند. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها و انتقال آن‌ها به چاهک‌ها، با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمودار مربوط به زنده‌مانی دارای دو زیر مجموعه مختلف بود. زیرمجموعه PI^- نشان‌دهنده جمعیت زنده و زیرمجموعه PI^+ نشان دهنده جمعیت مرده بودند

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های به‌دست آمده از این آزمایش با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS واکاوی شدند. هم‌چنین شاخص نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از رویه UNIVARIATE و آزمون Shapiro-Wilk انجام شد. درصورتی‌که داده‌ها نرمال نبودند با استفاده از دستور تغییر ریشه Arcsin داده‌ها نرمال شدند. در مدل آزمایش اثر تیمار و اثر گاو نر به‌ترتیب به‌عنوان متغییرهای ثابت و تصادفی درنظر گرفته شدند. پس از واکاوی نتایج به‌صورت Means ±SE بیان شدند و آزمون دانکن با سطح($P\leq ۰/۰۵$)به‌عنوان سطح معنی‌داری درنظر گرفته شد.

نتایج

نتایج اثر تنش حرارتی بر فراسنجه‌های حرکتی و ریخت‌شناسی اسپرم یخ‌گشایی شده گاوهای نر به‌ترتیب در جداول ۱ و ۲ آورده شده است. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که درصد جنبایی کل، جنبایی پیشرونده و فراسنجه درصد حرکت درمسیر مستقیم (STR) در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$). بیش‌تر از گروه تنش حرارتی بود. اما در مورد سایر فراسنجه‌های حرکتی از قبیل VCL، LIN، VAP، STR و ALH تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). نتایج ارائه شده در جدول ۲ نشان می‌دهد که درصد ناهنجاری‌های کل، درصد اسپرم‌های با دم‌های گره خورده و درصد اسپرم‌های با قطره پروتوپلاسمی سری در گروه تحت تنش حرارتی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه شاهد بود ($P\leq ۰/۰۵$). اما دو گروه تیماری تفاوت معنی‌داری در درصد اسپرم‌های با دم پیچ خورده و درصد اسپرم‌های با قطره پروتوپلاسمی دمی نشان ندادند ($P>۰/۰۵$). نتایج اثر تنش حرارتی بر ناهنجاری‌های پروتامین و وضعیت آکروزوم اسپرم یخ‌گشایی شده گاوهای نر در جدول ۳ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهند که تنش حرارتی باعث افزایش معنی‌دار ناهنجاری‌های کروماتین اسپرم گاو شده است ($P=۰/۰۰۱$). همان‌گونه که در جدول نشان‌داده‌شده است تنش حرارتی اثر معنی‌داری بر افزایش ناهنجاری‌های پروتامینی اسپرم‌هانداشت($P>۰/۰۵$).نتایج اثر تنش حرارتی بر زنده‌مانی، تولید رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل در اسپرم یخ‌گشایی شده گاوهای نر در جدول ۴ آورده شده است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تنش حرارتی به‌طور معنی‌داری باعث کاهش زنده‌مانی اسپرم‌ها پس از یخ‌گشایی می‌شود ($P\leq ۰/۰۱$). براساس نتایج اشاره شده در جدول پنج، غلظت H_2O_2 و رادیکال هیدروکسیل در گروهی که تحت تنش حرارتی قرار گرفته بود، به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود ($P\leq ۰/۰۵$).

جدول ۱: اثر تنش حرارتی بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم‌های یخ گشایی شده گاوهای نر (Means ± SE)

فراسنجه	تیمار		*P*-Value
	شاهد	تنش حرارتی	
جنبایی کل (درصد)	۴۸,۳۷^a ± ۰,۳۸	۳۳,۷۷^b ± ۲,۱۴	۰,۰۰۵
جنبایی پیش رونده (درصد)	۲۶,۷۰^a ± ۱,۲۷	۱۵,۹۱^b ± ۱,۵۸	۰,۰۰۵
سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده (میکرومتر بر ثانیه)	۱۳۷,۳۴ ± ۵,۷۹	۱۴۳,۵۲ ± ۵,۲۰	۰,۵۷۱
سرعت اسپرم در خط مستقیم (میکرومتر بر ثانیه)	۶۰,۴۳ ± ۱,۸۹	۵۹,۴۷ ± ۲,۳۳	۰,۸۴۱
میانگین سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر بر ثانیه)	۷۳,۱۸ ± ۲,۳۲	۷۵,۴۴ ± ۲,۹۲	۰,۷۰۶
معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم (درصد)	۸۱,۰۰^a ± ۰,۵۸	۷۸,۳۶^b ± ۰,۵۹	۰,۰۴۷
معیار خطی بودن حرکت اسپرم (درصد)	۴۴,۶۹ ± ۰,۷۷	۴۲,۴۱ ± ۰,۶۲	۰,۰۸۸
حداکثر دامنه حرکات جانبی (میکرومتر)	۶,۰۸ ± ۰,۲۵	۶,۶۳ ± ۰,۲۳	۰,۲۷۱
فرکانس حرکات جانبی (هرتز)	۳۱,۰۵^a ± ۰,۲۹	۲۷,۸۰^b ± ۰,۶۵	۰,۰۱

a و b) میانگین‌های دارای حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($P\leq ۰/۰۵$).

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124759

جدول ۲: اثر تنش حرارتی بر فراسنجه‌های ریخت‌شناسی اسپرم‌های یخ گشایی شده گاوهای نر (Means ± SE)

فراسنجه (درصد)	تیمار		P-Value
	شاهد	تنش حرارتی	
ناهنجاری‌های کل	۶,۸۰^{b} ± ۱,۷۱	۱۱,۳۷^{a} ± ۰,۸۶	۰,۰۳۱
دم گره خورده	۱,۹۶^{b} ± ۰,۲۶	۴,۲۴^{a} ± ۰,۳۲	۰,۰۰۴
دم پیچ خورده	۰,۲۶ ± ۰,۰۸	۰,۳۷ ± ۰,۰۶	۰,۴۳۵
قطره پروتوپلاسمی سری	۲,۱۳^{b} ± ۰,۵۹	۴,۱۳^{a} ± ۰,۳۵	۰,۰۱۹
قطره پروتوپلاسمی دمی	۲,۴۳ ± ۰,۲۸	۲,۶۱ ± ۰,۳۱	۰,۸۳۳

a و b) میانگین‌های دارای حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (P≤۰/۰۵).

جدول ۳: اثر تنش حرارتی بر ناهنجاری‌های پروتامین و وضعیت آکروزوم اسپرم یخ گشایی شده گاوهای نر (Means ± SE)

فراسنجه (درصد)	تیمار		P-Value
	شاهد	تنش حرارتی	
ناهنجاری‌های کروماتین	۱,۹۲^{b} ± ۰,۳۶	۴,۱۵^{a} ± ۰,۴۸	۰,۰۱۳
ناهنجاری‌های آکروزومی	۳۵,۷۰ ± ۱,۸۸	۳۶,۴۳ ± ۴,۶۱	۰,۹۱۸

a و b) میانگین‌های دارای حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (P≤۰/۰۵).

جدول ۴: اثر تنش حرارتی بر زنده‌مانی و میزان تولید رادیکال‌های آزاد در اسپرم یخ‌گشایی شده گاوهای نر (Means ± SE)

فراسنجه (درصد)	تیمار		P-Value
	شاهد	تنش حرارتی	
زنده‌مانی (PI^{+})	۵۳,۷۲^{a} ± ۲,۰۹	۴۱,۷۱^{b} ± ۳,۶۷	۰,۰۳۵
غلظت H_2O_2 (PI^{-}/DCF^{+})	۱۸,۱۱^{b} ± ۲,۲۲	۲۸,۷۴^{a} ± ۲,۸۷	۰,۰۱۳
غلظت رادیکال O_2^{-} ($PI^{-}/CellROX^{+}$)	۱۵,۳۶^{b} ± ۱,۴۴	۲۵,۹۷^{a} ± ۲,۹۳	۰,۰۰۸

a و b) میانگین‌های دارای حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (P≤۰/۰۵). PI: پروپیدیوم یداید، H2O2: هیدروژن پراکسید، -O2: یون هیدروکسیل

بحث

افزایش دمای بیضه در تابستان منجر به کاهش شدید کیفیت اسپرم گونه‌های مختلف همانند گاو نر (Cheng و همکاران، ۲۰۱۶؛ Rahman و همکاران، ۲۰۱۱)، انسان (Hamerezaee و همکاران، ۲۰۱۸)، موش (Pérez-Crespo و همکاران، ۲۰۰۸)، خرگوش (Safaa و همکاران، ۲۰۰۸) و قوچ (Bianchi و همکاران، ۲۰۱۶؛ Hamilton و همکاران، ۲۰۱۶) می‌گردد. به‌طور طبیعی در پستانداران اسپرم‌سازی در دمایی پایین‌تر از دمای مرکزی بدن صورت می‌گیرد. هم‌چنین، از نظر آناتومیکی ساختارهایی در بیضه پستانداران تکامل یافته است که منجر به تنظیم حرارت بهتر بیضه در دمای مختلف محیطی می‌شود. براساس نتایج حاصل از این پژوهش، نشان داده شد که تنش حرارتی طبیعی اثر واضحی بر جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده اسپرم‌های یخ‌گشایی شده داشت. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تنش حرارتی تابستانی نقش بسیار نامطلوبی بر ویژگی‌های اسپرم پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی داشته است (Orgal و همکاران، ۲۰۱۲). در این راستا De و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که درصد اسپرم‌های با حرکت سریع، LIN و VAP اسپرم‌های تازه قوچ‌هایی که در معرض تنش حرارتی قرار گرفته بودند بسیار کاهش یافته بود اما تنش حرارتی اثری بر حجم منی، غلظت اسپرم، جنبایی کل و سایر فراسنجه‌های حرکتی از قبیل VSL، VCL و STR نداشت. هم‌چنین، در پژوهشی Malama و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده اسپرم‌های منجمد شده گاوهای نر هلشتاین در فصل تابستان روندی کاهشی داشته‌اند. در مطالعه‌ای دیگر پژوهشگران گزارش کردند که افزایش دمای محیطی از حد مطلوب منجر به کاهش حجم منی، جنبایی، غلظت اسپرم و ناهنجاری‌های کل اسپرم انسان می‌شود (Hamerezaee و همکاران، ۲۰۱۸). هم‌چنین در پژوهشی که اخیراً منتشر شده است، گزارش شد که تنش حرارتی در طی تابستان منجر به کاهش زنده‌مانی اسپرم‌های منجمد شده می‌گردد (Lliamas-Luceño و همکاران، ۲۰۲۰). تنش حرارتی با اثر بر اسپرم‌هایی که در مراحل میوز و اسپرمیوژنیک از مراحل تکامل اسپرم در بیضه قرار دارند، اثر می‌گذارد. در گاوسانان این مراحل تقریباً از هفته سوم تا پنجم مراحل تکامل اسپرم اتفاق

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124759

می‌افتد. در پژوهشی Rahman و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شده است که دلیل حساسیت اسپرم به تنش حرارتی در این مراحل، عدم شکل‌گیری صحیح کروماتین اسپرم‌ها است، که می‌تواند یکی از دلایل اصلی نقص در DNA اسپرم‌ها باشد. این نقص در DNA با تغییر در شکل ظاهری هسته و در نهایت شکل اسپرم در ارتباط است که منجر به افزایش اسپرم‌های مرده و اسپرم‌های با ناهنجاری‌های ریخت‌شناختی شده و در نهایت منجر به کاهش جنبایی کل اسپرم‌ها در نمونه‌های بعد از انزال می‌گردد (Hoflack و همکاران، ۲۰۰۷). ناهنجاری‌های عمده ریخت‌شناختی که در پژوهش اخیر گزارش شد شامل ناهنجاری‌های سر (به‌ویژه ناهنجاری‌های غشای آکروزومی)، وزیکول‌های هسته‌ای و ناهنجاری‌های دمی می‌باشد. هم‌چنین، در این راستا پژوهش‌های دیگر نشان داده‌اند که ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی اسپرم منجر به کاهش فراسنجه‌های حرکتی مختلف شده‌است (Mahmoud و همکاران، ۱۹۹۸). مطابق با نتایج پژوهش‌های انجام شده، نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تنش حرارتی منجر به افزایش ناهنجاری‌های اسپرم از قبیل ناهنجاری‌های دم و هم‌چنین حضور قطرات پروتوپلاسمی که نشان از عدم بلوغ مناسب اسپرم‌ها طی دوران تکامل در بیضه است، می‌گردد. به‌نظر می‌رسد بروز ناهنجاری‌های ذکر شده سبب کاهش فراسنجه‌های حرکتی از قبیل جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده و سایر شاخصه‌های حرکتی می‌شود (Fernandes و همکاران، ۲۰۰۸). نتایج Rahman و همکاران (۲۰۱۱) نشان می‌دهد که دلیل تاثیر تنش حرارتی درصد ناهنجاری‌های اسپرم را پس از چهار هفته بیش‌تر تحت تاثیر قرار می‌دهد. آن‌ها اشاره کردند که قبل از هفته چهارم به‌دلیل این‌که اسپرم‌ها در مراحل نهایی تکامل در اپیدیدیمیس قرار داشته‌اند، بنابراین تاثیر قابل توجهی از تنش حرارتی نپذیرفتند. اما اسپرم‌هایی که در فازهای آکروزوم و گلژی مرحله اسپرمیوژنیک قرار داشتند بیش‌تر تحت تاثیر قرار گرفتند. هم‌چنین، در پژوهشی دیگر Safaa و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده است که تنش حرارتی طبیعی در تابستان منجر به کاهش غلظت اسپرم، جنبایی، زنده مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و افزایش ناهنجاری‌های اسپرم خرگوش در مقایسه با اسپرم‌های به‌دست آمده در فصل زمستان می‌گردد.

چندین فرضیه وجود دارد که می‌تواند دلیل اثرات تنش حرارتی بر ویژگی‌های کیفی اسپرم را توضیح دهند. در پژوهشی گزارش شد که آسیب به میتوکندری اسپرم‌ها طی تنش حرارتی یکی از دلایل اصلی نقش تنش حرارتی در کاهش کیفیت اسپرم پس از انزال می‌باشد (Pérez-Crespo و همکاران، ۲۰۰۸). جنبایی اسپرم به‌طور ویژه‌ای وابسته به حضور ATP است. بنابراین، هر عملی که منجر به حذف یا کاهش آزادسازی ATP گردد نقش مستقیمی در کاهش کیفیت اسپرم خواهد داشت. بخش بزرگی از ATP مورد نیاز اسپرم توسط چرخه فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری تولید می‌گردد. در مطالعه حاضر میزان تولید رادیکال آزاد پراکسید هیدروژن در اسپرم گاوهایی که تحت تنش حرارتی قرار گرفته بودند افزایش یافت. این افزایش منجر به کاهش شدید در فراسنجه‌های حرکتی و هم‌چنین افزایش ناهنجاری اسپرم‌های یخ‌گشایی شده گردید. در شرایط عادی افزایش دمای بیضه منجر به افزایش سوخت و ساز در بیضه می‌گردد که این روند منجر به افزایش نیاز بیضه به اکسیژن خواهد شد. بنابراین، ساختار بیضه با افزایش جریان خون ورودی درصدد جبران نیاز خود به اکسیژن و کاهش اثرات تنش حرارتی بر می‌آید (Paul و همکاران، ۲۰۰۹). اما چون سیستم خون‌رسانی توانایی جبران این میزان از نیاز به اکسیژن را ندارد بنابراین بافت بیضه در معرض کمبود اکسیژن ناشی از تنش حرارتی قرار می‌گیرد (Rahman و همکاران، ۲۰۱۸). شرایط بی‌هوازی بیضه باعث تغییرات وسیعی در ساختار هسته اسپرماتوسیت‌های دومین و اسپرماتیدها می‌شود. به‌ویژه این‌که تنش حرارتی منجر به تغییر در شکل و تراکم کروماتین اسپرم‌ها نیز می‌شود که در نهایت باعث کاهش توان زنده‌مانی و جنبایی اسپرم می‌شود (Fernandes و همکاران، ۲۰۰۸). بنابراین، با نارسایی به‌وجود آمده در زنجیره انتقال الکترون میتوکندری، اولین پاسخ افزایش قابل ملاحظه در میزان رادیکال‌های آزاد خواهد بود (Paul و همکاران، ۲۰۰۸، ۲۰۰۹). افزایش رادیکال‌های آزاد نیز یکی دیگر از دلایل اصلی کاهش ویژگی‌های کیفی اسپرم و هم‌چنین افزایش ناهنجاری‌های ریخت‌شناختی می‌باشد. در یک مقاله مروری پژوهشگران گزارش کردند که افزایش تقاضای اکسیژن توسط میتوکندری باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه آسیب به سلول‌های مختلف می‌گردد (Boni، ۲۰۱۹). هم‌چنین، در پژوهشی دیگر Ishii و همکاران (۲۰۰۵) گزارش شده است که تنش حرارتی منجر به افزایش رادیکال‌های آزاد و در نتیجه افزایش مرگ سلولی در موش شد که با اضافه کردند آنتی‌اکسیدان‌ها این روند مختل شد. این پژوهشگران گزارش کردند که آنتی‌اکسیدان‌های استفاده شده منجر به کاهش تولید سیتوکروم c (یکی از مهم‌ترین شناسه‌های مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی) از میتوکندری شده و در نتیجه میزان مرگ سلولی را کاهش دادند.

نتایج پژوهش پیش‌رو نشان می‌دهند که درصد ناهنجاری‌های کل، درصد اسپرم‌های با دم گرده خورده و درصد اسپرم‌های با قطرات پروتوپلاسمی در گروه تحت تنش حرارتی، نسبت به گروه شاهد افزایش یافته بود. هم‌چنین تراکم نابجای کروماتین در اسپرم گروه تحت تنش حرارتی افزایش یافته بود. تراکم کم یا نابجای کروماتین در اسپرم‌ها یکی از نشانه‌های اصلی ناهنجاری پروتامین در اسپرم است (Nasr-Esfahani و همکاران، ۲۰۰۴؛ Rahman و همکاران، ۲۰۱۱). از طرفی دیگر ناهنجاری‌های پروتامین یکی از دلایل اصلی بروز ناهنجاری‌های

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124759

ریخت‌شناختی سر در اسپرم گونه‌های مختلف به‌شمار می‌رود. مطابق با نتایج پژوهش پیش‌رو Lucio و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که تنش حرارتی القایی تراکم طبیعی کروماتین را در اسپرم گاو تحت تاثیر قرار داد که سبب افزایش درصد ناهنجاری‌های سری گردید. هم‌چنین Bianchi و همکاران(۲۰۱۶) گزارش کردند که تنش حرارتی القایی پس از ۳ هفته سبب قطعه قطعه شدند DNA، آسیب به غشای پلاسمایی و افزایش ناهنجاری‌های ریخت‌شناختی در اسپرم قوچ‌ها گردید. به‌نظر می‌رسد افزایش ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی (به‌ویژه ناهنجاری‌های مربوط به سر) در نتیجه نارسایی در متراکم‌سازی کروماتین در گامه گلژی و آکروزوم اسپرمیوژنز می‌باشد، زیرا در این مرحله از روند اسپرم‌سازی، سلول‌ها حساسیت بیش‌تری به تنش حرارتی دارند (Donnell، ۲۰۱۴).

براساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر فرض شد کاهش فراسنجه‌های حرکتی اسپرم‌های تحت تنش حرارتی به‌دلیل افزایش ناهنجاری‌های ریخت‌شناختی از قبیل ناهنجاری‌های سر باشد. اما بر خلاف این فرضیه Sabés-Alsina و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، ناهنجاری‌های آکروزومی و حضور قطرات پروتوپلاسمی اسپرم خرگوش تحت تاثیر تنش حرارتی قرار نگرفتند، اما فراسنجه‌هایی از قبیل VSL، VAP و VCL در فضل تابستان و پس از بروز تنش حرارتی افزایش یافتند (Sabés-Alsina و همکاران، ۲۰۱۶). در مطالعه‌ای دیگر همین پژوهشگران (Sabés-Alsina و همکاران، ۲۰۱۷) گزارش کردند که جنبایی کل و پیشرونده، زنده‌مانی، VAP، STR، تولید رادیکال‌های هیدروژن پراکسید و هیدروکسیل و درصد اسپرم‌های با آکروزوم یکپارچه گاوهای نر هلشتاین در فصل بهار بیش‌تر از فصل زمستان بود.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که افزایش دمای بیضه در گاوهای نر نژاد آبی بلژیکی سبب افزایش ناهنجاری‌های ریخت‌شناختی شده و در نتیجه زنده‌مانی و فراسنجه‌های حرکتی اسپرم‌ها را پس از دو هفته تحت کاهش می‌دهد. هم‌چنین تولید رادیکال‌های آزاد در اسپرم‌هایی که تحت تنش حرارتی بودند افزایش می‌یابد. علاوه بر این نتایج نشان می‌دهند که تنش حرارتی منجر به افزایش درصد اسپرم‌های با کروماتین نابجا و غشای آکروزومی آسیب دیده می‌شود.

منابع

۱. **Al-Kanaan, A.; König, S. and Brügemann, K., 2015.** Effects of heat stress on semen characteristics of Holstein bulls estimated on a continuous phenotypic and genetic scale. Livestok Science. Vol. 177, pp: 15-24.

۲. **Ashrafi, I.; Daghigh Kia, H.; Moghaddam, G. and Saberivand, A., 2017.** Comparison of extracted low-density lipoproteins from egg yolk with lecithin, and commercially extender “Andromed” in bull's semen freezability. Animal Environment. Vol. 9, pp: 49-56.

۳. **Bianchi, M.; Alves, R.; Furugen, A.; Andrade, C.; De, Paes, R.; Arruda, D.; Batissaco, L.; Florez-rodriguez, S.A.; Marcele, B.; Oliveira, M. De, Andrade, M.; Lançoni, R.; Mouro, G.; Romano, R.; Silva, V.; Diego, J.; Losano, D.A.; Rodrigues, C.; Nichi, M.; Carla, E. and Celeghini, C., 2016.** Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. Theriogenology. Vol. 86, pp: 795-805.

۴. **Boni, R., 2019.** Heat stress, a serious threat to reproductive function in animals and humans. Molecular Reproduction and Development. Vol. 2019, pp: 1-17.

۵. **Brito, L.F.C.; Silva, A.E.D.F.; Barbosa, R.T.; Unanian, M.M. and Kastelic, J.P., 2003.** Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus bulls. Animal Reproduction Science. Vol. 79, pp: 1-15.

۶. **Castro, L.S.; De, Assis, P.M.; De, Siqueira, A.F.P.; Hamilton, T.R.S.; Mendes, C.M.; Losano, J.D.A.; Nichi, M.; Visintin, J.A. and Assumpção, M.E.O.A., 2016.** Sperm Oxidative Stress Is Detrimental to Embryo Development : A Dose-Dependent Study Model and a New and More Sensitive Oxidative Status Evaluation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Vol. 2016, pp: 1-12.

۷. **Castro, L.S.; Siqueira, A.F.P.; Hamilton, T.R.S.; Mendes, C.M.; Visintin, J.A. and Assumpção, M., 2018.** Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility. Theriogenology. Vol. 107, pp: 142-148.

۸. **Cheng, Y.; Liu, S.; Zhang, Ying, Su, D.; Wang, G.; Lv, C.; Zhang, Y.; Yu, H.; Hao, L. and Zhang, J., 2016.** The effect of heat stress on bull sperm quality and related HSPs expression. Animal Biology. Vol. 66, pp: 321-333.

۹. **De Behr, V.; Hornick, J.L.; Cabaraux, J.F.; Alvarez, A. and Istasse, L., 2001.** Growth patterns of Belgian Blue replacement heifers and growing males in commercial farms. Livestok Production Science. Vol. 71, pp: 121-130.

۱۰. **De, K.; Kumar, D.; Balaganur, K.; Saxena, V.K.; Thirumurugan, P.; Mohammed, S. and Naqvi, K., 2017.** Effect of thermal exposure on physiological adaptability and seminal attributes of rams under semi-arid environment. Journal of Thermal Biology. Vol. 65, pp: 113-118.

۱۱. **Dikmen, S. and Hansen, P.J., 2009.** Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment ? Journal of Dairy Science. Vol. 92, pp: 109-116.

۱۲. **Donnell, L.O., 2014.** Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. Spermatogenesis. Vol. 4, No. 2, pp: 1-11.

۱۳. **Durairajanayagam, D.; Agarwal, A. and Ong, C., 2015.** Causes , effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. Reproductive Biomedecine Online. Vol. 30, pp: 14-27.

۱۴. **Fernandes, C.E.; Dode, M.A.N.; Pereira, D. and Silva, A.E.D.F., 2008.** Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. Theriogenology. Vol. 70, No. 9, pp: 1560-1568.

۱۵. **Habeeb, A.A.; Gad, A.E. and Atta, M.A., 2018.** Temperature-Humidity Indices as Indicators to Heat Stress of Climatic Conditions with Relation to Production and Reproduction of Farm Animals. International Journal of Biotechnology Recent Adv. Vol. 1, pp: 35-50.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124759

۱۶. **Hamerezaee, M.; Dehghan, S.F.; Golbabaei, F.; Fathi, A.; Barzegar, L. and Heidarnejad, N., 2018.** Assessment of Semen Quality among Workers Exposed to Heat Stress : A Cross-Sectional Study in a Steel Industry. Safety at Health and Work. Vol. 9, pp: 232-235.

۱۷. **Hamilton, T.R.D.S.; Mendes, C.M.; Castro, L.S. De, Assis, P.M. De, Siqueira, A.F.P.; Delgado, J.D.C.; Goissis, M.D.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.Á.; Nichi, M.; Visintin, J.A. and Assumpção, M.E.O.D.Á., 2016.** Evaluation of lasting effects of heat stress on sperm profile and oxidative status of ram semen and epididymal sperm. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Vol. 2016, pp: 1-12.

۱۸. **Hansen, P.J., 2009**. Effects of heat stress on mammalian reproduction. Philosophical Transactions of the Royal Society. Vol. 364, pp: 3341-3350.

۱۹. **Hoflack, G.; Opsomer, G.; Rijsselaere, T.; Van Soom, A.; Maes, D.; De Kruif, A. and Duchateau, L., 2007.** Comparison of Computer-assisted Sperm Motility Analysis Parameters in Semen from Belgian Blue and Holstein Friesian Bulls. Reproduction in Domestic Animals. Vol. 42, pp: 153-161.

۲۰. **Hoflack, G.; Opsomer, G.; Van Soom, A.; Maes, D.; de Kruif, A. and Duchateau, L., 2006.** Comparison of sperm quality of Belgian Blue and Holstein Friesian bulls. Theriogenology. Vol. 66, pp: 1834-1846.

۲۱. **Hussaini, S.; Zhandi, M.; Zare-Shahneh, A.; Sharafi, M.; Emamverdi, M. and Khodaeimotlagh, M., 2018**. Folw cytometric evaluation of frozen-thawed bull semen in a semen extender containing ethanol. Animal Environment. Vol. 10, pp: 47-52.

۲۲. **Ishii, T.; Matsuki, S.; Iuchi, Y.; Okada, F.; Toyosaki, S.; Tomita, Y.; Ikeda, Y. and Fujii, J., 2005.** Accelerated impairment of spermatogenic cells in sod1-knockout mice under heat stress. Free Radical Research. Vol. 39, pp: 697-705.

۲۳. **Lançoni, R.; Arruda, R.P.; De, Bianchi, M.; Alves, R. and Oliveira, L.Z., 2017.** Validation of the CellRox Deep Red ® fluorescent probe to oxidative stress assessment in equine spermatozoa Validation of the CellRox Deep Red ® fluorescent probe to oxidative stress assessment in equine spermatozoa. Animal Reproduction. Vol. 14, No. 2, pp: 437-441.

۲۴. **Leemans, B.; Gadella, B.M.; Sostaric, E.; Nelis, H.; Stout, T.A.E.; Hoogewijs, M. and Soom, A.V., 2014.** Oviduct Binding and Elevated Environmental pH Induce Protein Tyrosine Phosphorylation in Stallion Spermatozoa. Biology of Reproduction. Vol. 91, No. 1, pp: 1-12.

۲۵. **Llamas-Luceño, N.; Angrimani, D. de S.R.; de Cássia Bicudo, L.; Szymańska, K.J.; Van Poucke, M.; Demeyere, K.; Meyer, E.; Peelman, L.; Mullaart, E. and Broekhujise, M.L.W.J., 2020.** Exposing dairy bulls to high temperature humidity index during spermatogenesis compromises subsequent embryo development in vitro. Theriogenology. Vol. 141, pp: 16-25.

۲۶. **Lucio, A.C.; Alves, B.G.; Alves, K.A.; Martins, M.C.; Braga, L.S.; Miglio, L.; Alves, Bruna G, Silva, T.H.; Jacomini, J.O. and Beletti, M.E., 2016.** Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play speci fi c roles in in vitro fertilization and embryonic development. Theriogenology. Vol. 86, No. 4, pp: 924-933.

۲۷. **Mahmoud, A.M.A.; Gordts, S.; Vereecken, A.; Serneels, A.; Campo, R.; Rombauts, L. and Comhaire, F.H., 1998. P**erformance of the sperm quality analyser in predicting the outcome of assisted reproduction. International Journal Andrology. Vol. 21, pp: 41-46.

۲۸. **Maíra Bianchi Rodrigues, A.; Furugen, A.; Andrade, C.D.; Arruda, R.P.D.; Batissaco, L. and Florez, S.A., 2015.** An efficient technique to detect sperm reactive oxygen species. Biochemical Physiology. Vol. 4, No. 2, pp: 1-5.

۲۹. **Malama, E.; Zeron, Y.; Janett, F.; Siuda, M.; Roth, Z. and Bollwein, H., 2017.** Use of computer-assisted sperm analysis and fl ow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. Theriogenology. Vol. 87, pp: 79-90.

۳۰. **Murphy, E.M.; Eivers, B.; O'Meara, C.M.; Lonergan, P. and Fair, S., 2018.** Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination. Theriogenology. Vol. 108, pp: 217-222.

۳۱. **Nasr-Esfahani, M.H.; Razavi, S.; Mozdarani, H.; Mardani, M. and Azvagi, H., 2004.** Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. Andrologia Vol. 36, pp: 95-100.

۳۲. **Nizański, W.; Partyka, A. and Rijsselaere, T., 2012.** Use of Fluorescent Stainings and Flow Cytometry for Canine Semen Assessment. Reproduction in Domestic Animals. Vol. 47, pp: 215-221.

۳۳. **Orgal, S.; Zeron, Y.; Elior, N.; Biran, D.; Friedman, E.; Druker, S. and Roth, Z., 2012.** Season-Induced Changes in Bovine Sperm Motility Following a Freeze- Thaw Procedure. Journal of Reproduction and Development. Vol. 58, No. 2, pp: 212-218.

۳۴. **Paul, C.; Murray, A.A.; Spears, N. and Saunders, P.T.K., 2008.** A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. Reproduction. Vol. 136, pp: 73-84.

۳۵. **Paul, C.; Teng, S. and Saunders, P.T.K., 2009.** A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. Biology of Reproduction. Vol. 80, pp: 913-919.

۳۶. **Pérez-Crespo, M.; Pintado, B. and Gutiérrez-Adán, A., 2008.** Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. Molecular Reproduction and Development. Vol. 75, pp: 40-47.

۳۷. **Rahman, M.B.; Kamal, M.M.; Rijsselaere, T.; Vandaele, L.; Shamsuddin, M. and Van Soom, A., 2014a.** Altered chromatin condensation of heat-stressed spermatozoa perturbs the dynamics of DNA methylation reprogramming in the paternal genome after in vitro fertilisation in cattle. Reproduction Fertility and Development. Vol. 26, pp: 1107-1116.

۳۸. **Rahman, M.B.; Schellander, K.; Luceño, N.L. and Van Soom, A., 2018.** Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. Theriogenology. Vol. 113, pp: 102-112.

۳۹. **Rahman, M.B.; Vandaele, L.; Rijsselaere, T.; El-Deen, M.S.; Maes, D.; Shamsuddin, M. and Van Soom, A., 2014.** Bovine spermatozoa react to in vitro heat stress by activating the mitogen-activated protein kinase 14 signalling pathway. Reproduction Fertility and Development. Vol. 26, pp: 245-257.

۴۰. **Rahman, M.B.; Vandaele, L.; Rijsselaere, T.; Maes, D.; Hoogewijs, M.; Frijters, A.; Noordman, J.; Granados, A.; Dernelle, E.; Shamsuddin, M.; Parrish, J.J. and Van Soom, A., 2011.** Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. Theriogenology. Vol. 76, pp: 1246-1257.

۴۱. **Sabés-Alsina, M.; Johannisson, A.; Lundeheim, N.; Lopez-Bejar, M. and Morrell, J.M., 2017.** Effects of season on bull sperm quality in thawed samples in northern Spain. Veterinary Records. Vol. 2017, pp:1-7.

۴۲. **Sabés-Alsina, M.; Lundeheim, N.; Johannisson, A. and**

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124759

Morrell, J.M., 2019. Relationships between climate and sperm quality in dairy bull semen : A retrospective analysis. Journal of Dairy Science. Vol. 102, No. 6, pp: 5623-5633.

۴۳. **Sabés-Alsina, M.; Tallo-Parra, O.; Mogas, M.T.; Morrell, J.M. and Lopez-Bejar, M., 2016.** Heat stress has an effect on motility and metabolic activity of rabbit spermatozoa. Animal Reproduction Science. Vol. 173, pp: 18-23.

۴۴. **Safaa, H.M.; Emarah, M.E. and Saleh, N.F.A., 2008.** Seasonal effects on semen quality in black baladi and white New Zealand rabbit bucks. World Rabbit Science. Vol. 16, pp: 13-20.

۴۵. **Shiraishi, K.; Matsuyama, H. and Takihara, H., 2012.** Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. Urology. Vol. 19, pp: 538-550.

۴۶. **Silanikove, N. and Koluman, N., 2015.** Impact of climate change on the dairy industry in temperate zones : Predications on the overall negative impact and on the positive role of dairy goats in adaptation to earth warming. Small Ruminant Research. Vol. 123, pp: 27-34.

۴۷. **Staub, C. and Johnson, L., 2018.** Spermatogenesis in the bull. Animal. Vol. 12, pp: 27-35.

۴۸. **Yaeram, J.A.; Setchell, B.P.A. and Maddocks, S.A., 2006.** Effect of heat stress on the fertility of male mice *in vivo* and *in vitro*. Reproduction Fertility and Development. Vol. 18, pp: 647-653.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.124759

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 4, Winter 2020

Effect of artificial heat stress on Belgian blue bull's semen quality after thawing

- **Afshin Seifi Jamadi:** Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and National Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
- **Hamid Kohram*:** Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and National Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
- **Mahdi Zhandi:** Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and National Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
- **Ann Van Soom:** Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium

Received: November 2019 Accepted: February 2020

Keyword: Cryopreservation, Fertility, Free radicals, Temperature Humidity Index

Abstract

This study was aimed to evaluate whether high ambient temperature (heat stress, HS) can affect sperm quality parameters in Belgian blue bulls. For this purpose, semen samples were collected from three healthy mature Belgian blue bulls which were located in a breeding company under uniform feeding and management conditions. After semen collection, and the primary evaluations, the ejaculates with more than 60 percent total motility were subjected to the freezing process. After thawing the samples were used to assess the motion parameters, morphological abnormalities, acrosome integrity, chromatin condensation, viability, hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl ion production. The results indicated that total and progressive motility and straight-line velocity were lower in the HS group compared to the control ($P \leq 0.05$), moreover, the generation of H_2O_2, hydroxyl ions, percentage of aberrant chromatin condensation, total morphological abnormal sperm cells, spermatozoa with bent tails and proximal protoplasmic droplets were higher in the HS compared to the control ($P \leq 0.05$) while the percentage pf damaged acrosome was not differ between HS and control ($P \geq 0.05$). In conclusion, these findings show that elevated ambient temperature can decrease the quality of frozen-thawed bull spermatozoa may leading to a lower fertility rate.

* Corresponding Author's email: Hamid_kohram@yahoo.com