اثر تنش القایی هیدروژن پراکسید بر فراسنجه‌های تولیدمثلی گامت‌های نر

- **کاوان نیکدل:** گروه علوم دامی،دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **مهدی امین‌افشار*:** گروه علوم دامی،دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **عبدالله محمدی‌سنگ‌چشمه:** گروه علوم دامی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران
- **ناصر امام‌جمعه‌کاشان:** گروه علوم دامی،دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **احسان سیدجعفری:** گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷

چکیده

در این تحقیق اثرات تنش القایی ملایم هیدروژن پراکسید درگامت‌های نر بر رشد رویان‌های حاصل از روش برون‌تنی مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌منظور، نمونه‌های اسپرم در آزمایشگاه با غلظت‌های۰، ۱۰، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول بر لیتر هیدروژن پراکسید تیمار شدند و فراسنجه‌های مربوط به حرکت کل، حرکت پیش‌رونده، حرکت سریع، زنده‌مانی و کیفیت غشاء اسپرم ثبت و در گروه‌های تیماری مختلف مقایسه گردید. نتایج نشان داد که افزایش هیدروژن پراکسید تا سطح ۵۰ میکرومولار با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری ندارد و بیش از آن نیز باعث کاهش معنی‌دار در فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی و سلامت غشاء اسپرم می‌شود.

کلمات کلیدی: تنش ملایم القایی، هیدروژن پراکسید، اسپرم، گامت نر

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: aminafshar@gmail.com

مقدمه

گروه‌های فعال اکسیژن، مولکول‌های واکنش‌گری هستند که با تخریب بیومولکول‌هایی مانند DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها به‌بخش‌های مختلف سلول مانند غشای پلاسمایی آسیب وارد نموده و باعث اختلال در سلول می‌گردند (MelloFilho و همکاران، ۱۹۸۴؛ Wu و Cederbaum، ۲۰۰۳؛ Powers و Jackson، ۲۰۰۸). استرس اکسیداتیو به‌وسیله گروه‌های فعال اکسیژن مثل سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل به‌وجود می آیند که نه تنها در محیط خارج سلولی وجود دارند، بلکه به‌عنوان فراورده فرعی متابولیسم انرژی نیز طی فرایند گلیکولیز و فسفریلاسیون در میتوکندری به‌وجود می‌آیند (Guerin و همکاران، ۲۰۰۱؛ Balaban و همکاران ۲۰۰۵). علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در تولید رویان آزمایشگاهی در دو دهه اخیر، به‌نظر می‌رسد که رویان‌های تولیدشده در این شرایط به‌دلیل تفاوت‌های محیطی مثل PH، ترکیبات محیط کشت و هم‌چنین سطح گروه‌های اکسیژن آزاد، با رویان‌های طبیعی از نظر کیفیتی متفاوت باشند. مطالعات نشان داده است که شرایط محیطی غیربهینه‌ای مثل افزایش تجمع گروه‌های اکسیژن فعال تاثیر معنی‌داری بر رشد رویان خواهد داشت (Goto و همکاران، ۱۹۹۳). چرا که عدم تعادل بین غلظت گروه‌های اکسیژن فعال داخل سلولی و آنتی‌اکسیدان‌ها در میزان استرس اکسیداتیو ایجاد شده موثر بوده و احتمال می‌رود که این استرس اکسیداتیو سلامت تولیدمثل و رشد تخمک‌ها و نهایتاً رویان را به‌ویژه در مراحل اولیه تحت تاثیر قرار دهد (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۳؛ Agarwal و همکاران، ۲۰۰۵). البته تحقیقات نشان داده است که میزان گروه‌های اکسیژن فعال مانند شمشیر دولبه عمل می‌نمایند، به‌عنوان مثال در جایی می‌توانند در ایجاد سیگنال‌های کلیدی در فرایندهای فیزیولوژیک مفید و موثر باشند اما در جایی دیگر می‌توانند باعث اختلال در دستگاه تولیدمثلی گردند (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۳؛ Agarwal و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات نشان داده است که استرس اکسیداتیو بالا تحت شرایط آزمایشگاهی بر رشد اولیه رویان در نتیجه القای آپپتوز (Khurana و Niemann، ۲۰۰۰؛ Liu و Keefe، ۲۰۰۰)، تغییر در الگوی بیان ژن و متابولیسم رویانی (Harvey و همکاران، ۲۰۰۷؛ Rinaudo و همکاران، ۲۰۰۶)، تجمع لیپید و کاهش کیفیت رویان (Sudano و همکاران، ۲۰۱۱) اثر منفی می‌گذارد. استرس اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌هادر پلاسمای‌مایع‌منی ایجاد می‌شود. بنابراین مکانیسم‌های مختلف مقابله کننده با استرس اکسیداتیو یکی از عناصر کلیدی بهبود کیفیت و رشد رویان در شرایط آزمایشگاهی به‌شمار می‌رود (Takahashi، ۲۰۱۲). مطالعات نشان می‌دهد که با به‌کارگیری یک عامل تنش‌زا می‌توان فراسنجه‌های کیفی اسپرم و اووسیت را در شرایط آزمایشگاهی بهبود بخشید. این پدیده که یک تنش زیر حد کشندگی است موجب القای یک پاسخ که همراه با افزایش موقت مقاومت نسبت به تنش‌های بعدی می‌شود تقریباً در تمام سطح زندگی موجودات از باکتری‌ها گرفته تا ارگانیسم‌های چندسلولی مشاهده شده است. در سطح سلولی عکس‌العمل موجود از سه مرحله حساس شدن، ارزیابی و سپس خنثی کردن آسیب وارد شده توسط تنش و در نتیجه افزایش موقتی مقاومت به چنین آسیب‌هایی تشکیل شده است. روش‌هایی هم‌چون اعمال تنش‌های مکانیکی (استفاده از فشار هیدروستاتیک بالا) و تنش‌های اسمزی (استفاده از سدیم کلراید، قندهایی مانند تری‌هالوز وسوکروز) با سازوکارهای نه چندان مشخص که موجب فعال‌شدن پروتئین‌های‌ویژه‌ای‌می‌شوند،امروزه مورد تحقیق قرار می‌گیرند. مطالعات قبلی در گاو و موش نشان داده‌اند در معرض قرار دادن زیگوت، رویان ۹ تا ۱۶ سلولی یا بلاستوسیت در مقابل هیدروژن پراکسید اثرات زیان‌باری برروی تکوین رویان دارد و باعث تکه‌تکه شدن رویان و آپپتوز می‌گردد (Morales و همکاران، ۱۹۹۹؛ Feugang و همکاران، ۲۰۰۴). اما مطالعاتی نیز نشان داده‌اند که در صورتی‌که استرس در دوره زمانی کوتاه و تدریجی به اووسیت‌ها در دوره بلوغ وارد شود، اثرات مفیدی را به‌همراه خواهد داشت. ۳۰ تا ۱۲۰ دقیقه فشار هیدروستاتیک باعث افزایش تکوین رویان خوک بعد از فعال شدن (Pribenszky و همکاران، ۲۰۰۸) و بعد از انجماد (Du و همکاران، ۲۰۰۸) داشته است. مطالعات دیگر نشان داده‌اند که یک ساعت استرس اسمزی توسط نمک، سوکروز و ترهالوز در طول دوره بلوغ باعث افزایش کلیواژ و تولید بلاستوسیست بعد از انجماد می‌شود (Lin و همکاران، ۲۰۰۹). هیدروژن پراکسید اگزوژنوز درصورت غیر فعال بودن به گروه‌های اکسیژن بسیار فعال مثل رادیکال هیدروکسیل و گروه‌های فعال نیتروژن مثل پروکسی‌نیترات تبدیل می‌شوند (Klaunig و Kamendulis، ۲۰۰۴). با توجه به مقدمه فوق، هدف از انجام این تحقیق، بررسی و مطالعه تاثیر سطح محدودی از استرس اکسیداتیو با هیدروژن پراکسید و زیرحدکشندگی برگامت‌نر و تحریک آن به انجام واکنش دفاعی، پس از یخ‌گشایی و اثر آن بر رشد رویان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در مرکز تولیدموادژنتیکی شرکت‌نهاده‌های‌دامی جاهد واقع در محمدشهر کرج انجام شد. از سه راس گاو نر نژاد هلشتاین با استفاده از واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شد. نمونه‌های اسپرم به سرعت به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از بررسی حجم منی، غلظت اسپرم و درصد تحرک، نمونه‌های منی با یکدیگر مخلوط شد و با توجه به گروه‌های آزمایشی به پنج

بخش تقسیم شدند. گروه‌های آزمایشی به‌ترتیب شامل رقیق‌کننده آندرومد بدون هیدروژن پراکسید (شاهد)، و گروه‌های حاوی ۵۰، ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید بودند. برای فرآیند انجماد، نمونه‌های منی گروه‌های آزمایشی در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری پر و بسته‌بندی شدند. دمای پایوت‌ها سپس به ۴ درجه سانتی‌گراد رسانیده شد و پس از گذشت ۳/۵ ساعت، پایوت‌ها به دستگاه انجماد اسپرم منتقل شدند. پس از گذشت ۱۲ دقیقه، با رسیدن دمای پایوت‌ها به ۱۴۰- درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها به تانک‌های حاوی ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. ۷۲ ساعت پس از انجماد نمونه‌ها یخ‌گشایی شدند و میزان تحرک اسپرم‌ها (شامل حرکت کل و پیش‌رونده) با استفاده از سیستم نرم‌افزاری CASA (Computer Assisted Semen Analysis Animal Version 12.3 CEROS, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) در زمان‌های بلافاصله بعد از یخ‌گشایی و یک ساعت بعد از قرار گرفتن در انکوباسیون دارای دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به جهت شبیه‌سازی محیط رحم دام ماده مورد ارزیابی قرار گرفت و اطلاعات مربوط به حرکت پیش‌رونده اسپرم و حرکت کل اسپرم ثبت گردید. برای ارزیابی میزان زنده‌مانی اسپرم از رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین استفاده شد. این آزمون بر پایه میزان نفوذپذیری رنگ ائوزین-نگروزین به‌درون غشا سلولی که آسیب‌دیده می‌باشد و عدم نفوذ رنگ به‌درون غشا سلولی بیانگر سلامت غشا است. اگر سر اسپرم به رنگ قرمز و یا صورتی تیره در بیاید آن اسپرم مرده محسوب می‌شود و اگر سر آن صورتی روشن یا سفید شود زنده تلقی می‌گردد. اگر ناحیه گردن رنگ صورتی به‌خود بگیرد ولی باقی‌مانده سر رنگ نگیرد نشان‌دهنده مرگ سلول نیست، سلول مذکور زنده است و این حالت نشان‌دهنده نشست غشا در قسمت گردن آن است. برای این کار ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم روی لام قرار داده شد و سپس رنگ آماده‌شده ائوزین-نگروزین روی نمونه ریخته شد و به‌وسیله سر سمپلر نمونه اسپرم با رنگ به‌آرامی مخلوط شد سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم رنگ‌آمیزی شده برداشته شد و بر روی لام جدید قرار گرفت و با یک لام دیگر به‌آرامی گسترش داده شد. پس از خشک شدن، لام در زیر میکروسکوپ قرار داده شد و از هر لام ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و فراوانی اسپرم‌های رنگ شده و رنگ نشده محاسبه شد. برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از آزمون هاس (Hypo =Hos Osmotic Swelling Test) استفاده شد. این آزمون برپایه میزان نفوذپذیری غشا سلولی یک سلول دست‌نخورده در محیط با فشار اسمزی‌هایپواسموتیک است. قرار دادن اسپرم‌ها در محیط فشار اسمزی پایین‌تر منجر به خمیدگی در ناحیه دم اسپرم می‌شود. سلول‌های با ساختار غشا سالم که می‌توانند انواع خمیدگی را در ناحیه دم داشته باشند، به‌عنوان اسپرم سالم درنظر گرفته می‌شوند. بعد از یخ‌گشایی نمونه‌ها، محتوی پایوت‌ها به‌داخل میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتری تخلیه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس قسمت بالای میکروتیوپ که حاوی رقیق‌کننده بود جدا شد و ۲۰ میکرولیتر از منی سانتریفیوژ شده به ۲۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاس اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس از نمونه انکوبه شده سه قطره جداگانه ۱۰ میکرولیتری تهیه و با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست ارزیابی‌ها انجام شد. در هر لام ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و فراوانی اسپرم‌های با دم گره‌خورده دارای غشای یکپارچه و هم‌چنین اسپرم‌های با دم گره نخورده دارای غشای غیریکپارچه محاسبه‌شد. پس از سنجش تابعیت داده‌های حاصل از انجام این پژوهش از توزیع نرمال، در صورت نیاز به نرمال کردن داده‌ها از روش CoXBox استفاده و سپس همه داده‌ها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی (تیمارهای مندرج در جداول یک تا سه) آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. تعداد تکرارها برای هر تیمار ۵ بوده است. احتمال بروز خطای نوع اول در این آزمون ۱ درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج مربوط به فراسنجه‌های حرکتی اسپرم تحت تاثیر تیمارهای مختلف قبل از انجماد و پس از انکوباسیون در جدول ۱ نوشته شده است. بیش‌ترین میانگین حرکت در کل تیمارها، مربوط به تیمار شاهد و تیمارهایی با غلظت هیدروژن پراکسید کم‌تر از ۵۰ میکرومولار مشاهده شد ($P<0/01$). نکته حائز اهمیت این است که گروه شاهد بدون هیدروژن پراکسید با تیمارهای حاوی ۱۰ و ۵۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P\geq0/01$). افزایش غلظت بیش‌تر از ۵۰ میکرومولار (۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) هیدروژن پراکسید باعث کاهش معنی‌دار در میانگین حرکت سلول‌های اسپرم شده بود به‌طوری‌که تیمارهای آزمایشی حاوی هیدروژن پراکسید ۲۰۰ میکرو مولار کم‌ترین میانگین حرکتی را از خود نشان دادند ($P<0/01$).

اگر به نتایج جداول شماره ۲ و ۳ نیز توجه شود، تشابه زیادی با فراسنجه‌های حرکتی قابل مشاهده است چراکه تمامی این فراسنجه‌ها از نظر فیزیولوژیک با یکدیگر رابطه داشته و همه آن‌ها از دیدگاه فیزیولوژی و آماری به نوعی با یکدیگر همبستگی دارند. نتایج آماری تست رنگ آمیزی ائوزین-نکروزین نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های زنده در غلظت ۱۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید بیش‌ترین و در غلظت ۲۰۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید بدترین بوده است ($P<0/01$).

جدول ۱: فراسنجه‌های حرکتی اسپرم تحت تاثیر تیمارهای مختلف

تیمار	میانگین حرکت ±خطای استاندارد	میانگین حرکت پیش‌رونده ±خطای استاندارد	میانگین حرکت سریع ± خطای استاندارد
شاهد	۳۰/۹۵ ± ۲/۸۲ ab	۲۲/۹۸ ± ۲/۳۶ ab	۱۷/۶۷ ± ۲/۰۴ a
۱۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن	۴۳/۴۸ ± ۴/۹۶ a	۳۴/۵۵ ± ۴/۳۲ a	۲۶/۲۶ ± ۲/۹۸ a
شاهد پس از انکوباسیون	۳۴/۲۹ ± ۵/۴۲ a	۲۵/۲۴ ± ۳/۸۷ ab	۱۹/۶ ± ۳/۲۲ a
۱۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن پس از انکوباسیون	۳۶/۰۵ ± ۴/۱۱a	۲۸/۴۶ ± ۴/۵۰ ab	۲۲/۱۶ ± ۳/۸۹ a
۵۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن	۴۰/۸۱ ± ۷/۰۴ a	۲۹/۸۴ ± ۴/۷۹ ab	۲۰/۸۰ ± ۴/۰۴ a
۱۰۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن	۱۸/۲۱ ± ۴/۰۹ bc	۷/۱۱ ± ۳/۱۷ c	۲/۲۱ ± ۱/۰۶ b
۲۰۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن	۱۰/۴۸ ± ۳/۴۰ cd	۳/۹۰ ± ۲/۴۳ c	۱/۴۲ ± ۱/۲۱ b
۵۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن پس از انکوباسیون	۲۸/۲۱ ± ۴/۱۱ ab	۲۱/۱۱ ± ۳/۷۴ b	۷/۶۱ ± ۲/۳۰ b
۱۰۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن پس از انکوباسیون	۱۱/۵۶ ± ۰/۵۸ cd	۲/۸۳ ± ۰/۷۴ c	۰/۴۱ ± ۰/۰۸ b
۲۰۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن پس از انکوباسیون	۲/۸۰ ± ۱/۳۸ d	۰/۳۵ ± ۰/۱۵ c	۰/۰۵ ± ۰/۰۴ b

جدول ۲: نتایج مربوط به رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین

تیمار	اسپرم‌های رنگ نگرفته میانگین ± خطای استاندارد
شاهد	۶۶/۲۵ ± ۲/۴۲ ab
۱۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن	۷۰/۱۴ ± ۲/۸۷ a
۵۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن	۶۵/۵۰ ±۱/۵۴ ab
۱۰۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن	۶۴/۶۹ ±۱/۶۴ ab
۲۰۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن	۵۹/۰۵ ± ۳/۲۸ b

جدول ۳: نتایج مربوط به تست هاس

تیمار	اسپرم‌های با دم پیچ‌خورده میانگین ± خطای استاندارد
شاهد	۵۰/۰۶ ± ۲/۱۹ a
۱۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن	۵۲/۶۹ ± ۱/۵۰ a
۵۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن	۴۹/۹۴ ±۳/۳۵ a
۱۰۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن	۴۰/۱۸ ±۱/۰۳ b
۲۰۰ میکرومولار پراکسیدهیدروژن	۳۹/۱۱ ±۰/۹۱ b

درجدول ۳ میانگین‌نتایج حاصل از تست هاس مشاهده می‌شود. این نتایج نیز کاملاً نتایج فراسنجه‌های‌حرکتی را تایید نموده و افزایش غلظت هیدروژن پراکسید در این آزمایش نیز تا سطح ۵۰ میکرومولار بدون تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد بوده (P≥۰/۰۱) و بیش از آن یعنی غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ با غلظت‌های‌زیر ۵۰ میکرومولار ازنظر میانگین اسپرم‌هایی با دم پیچ‌خورده دارای تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۱).

بحث

بیش‌ترین میانگین حرکت در کل تیمارها، مربوط به تیمار شاهد و تیمارهایی با غلظت هیدروژن پراکسید کم‌تر از ۵۰ میکرومولار مشاهده شد (P<۰/۰۱) (جدول ۱). نکته حائز اهمیت این است که گروه شاهد بدون هیدروژن پراکسید با تیمارهای حاوی ۱۰ و ۵۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند (P≥۰/۰۱). افزایش غلظت بیش‌تر از ۵۰ میکرومولار (۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) هیدروژن پراکسید باعث کاهش معنی‌دار در میانگین حرکت سلول‌های اسپرم شده بود به‌طوری‌که تیمارهای آزمایشی حاوی هیدروژن پراکسید ۲۰۰ میکرومولار کم‌ترین میانگین حرکتی را از خود نشان دادند (P<۰/۰۱). با توجه به این‌که از نظر مقایسه‌ای، فراسنجه‌حرکت‌سریع و هم‌چنین حرکت پیش‌رونده مهم‌تر از فراسنجه حرکت بوده و نقش بیش‌تری در افزایش احتمال آبستنی خواهند داشت لذا با دقت در میانگین‌های مندرج مربوطه در جدول ۱، می‌توان استنباط نمود که غلظت هیدروژن پراکسید حداکثر تا مقدار ۵۰ میکرومولار باعث بهبود فراسنجه حرکت سریع شده است اما با افزایش هیدروژن پراکسید و بالارفتن غلظت آن از ۵۰ میکرومولار، میانگین حرکت سریع با تفاوت معنی‌دار نسبت به سایر تیمارها کاهش یافت (P<۰/۰۱). همین موضوع با روندی تقریباً مشابه در فراسنجه حرکت پیش‌رونده نیز مشاهده شد.

نتایج اماری تست رنگ‌آمیزی ائوزین نکروزین نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های زنده در غلظت ۱۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید بیش‌ترین و در غلظت ۲۰۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید بدترین بوده است (P<۰/۰۱)(جدول ۲). درجدول ۳ میانگین نتایج حاصل از تست هاس مشاهده می‌شود. این نتایج نیز کاملاً نتایج فراسنجه‌های حرکتی را تایید نموده و افزایش غلظت هیدروژن پراکسید در این آزمایش نیز تا سطح ۵۰ میکرومولار بدون تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد بوده (P≥۰/۰۱) و بیش از آن یعنی غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ با

غلظت‌های زیر ۵۰ میکرومولار از نظر میانگین اسپرم‌هایی با دم پیچ خورده دارای تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۱).

لذا این‌گونه استنباط می‌شود که افزودن هیدروژن پراکسید فقط تا سطح ۵۰ میکرومولار تاثیر معنی‌دار بهتری برفراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی و ناهنجاری‌ها داشته است اما با این وجود با تیمار شاهد یعنی‌بدون هیدروژن پراکسید تفاوتی‌نداشته است. ازطرف دیگر غلظت بیش از ۵۰ یعنی ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیز باعث بدتر شدن فراسنجه‌های حرکتی شد. این نتیجه از یک جهت می‌تواند بیان کننده این موضوع باشد که تنش ایجاد شده تا سطح ۵۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید آن‌قدر کم بوده که برای تحریک مکانیسم‌های تقویتی حرکتی اسپرم پس از انکوباسیون از قدرت کافی برخوردار نبوده است و از طرف دیگر نیز سطوح بیش‌تر هیدروژن پراکسید یعنی ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار باعث پراکسیداسیون شدید و تخریب سلولی و بدتر شدن فراسنجه‌های حرکتی و زنده‌مانی شده است. بنابراین اهمیت این تحقیق را شاید بتوان این‌گونه بیان نمود که نتایج آن منجر به یافتن دو دامنه غلظتی بالا و پایین هیدروژن پراکسید یعنی ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار بوده است. دامنه‌هایی که حد پایین آن با گروه بدون هیدروژن پراکسید تفاوت معنی‌دار نداشته و حد بالای آن نیز منجر به بدتر شدن فراسنجه‌های حرکتی شده است بنابراین پیشنهاد می‌شود که در تکمیل نتایج این پژوهش تکرار این آزمایش برای غلظت‌های بین ۵۰ تا ۱۰۰ میکرومولار هیدروژن پراکسید به‌صورت رگرسیونی انجام شود تا نقطه بهینه این غلظت بر فراسنجه‌های حرکتی تعیین شود.

البته زمان ایجاد تنش ملایم اکسیداتیو در فرایند سردسازی اسپرم نیز در پاسخ‌های مشاهده شده حائز اهمیت است. این موضوع حائز اهمیت است که تنش اکسیداتیو در چه زمانی از سردسازی و به چه‌مقدار ایجاد شده است. شرفی و همکاران (۱۳۹۴) در تحقیقی نشان دادندکه تنش ایجاد شده در زمان‌های مختلف سردسازی می‌تواند کیفیت فراسنجه‌های تولیدمثلی اسپرم گاو را تحت تاثیر قرار دهدامامدت آن تاثیری نداشت، بنابراین شایددرغلظت‌های پیشنهادی فوق زمان استفاده از عامل تنش نیز طی فرایند سردسازی بتواند به‌عنوان یک عامل موثر بر پاسخ مد نظر واقع شود.

Sharma (۲۰۱۵) نیز در تحقیقی مشابهٔ تاثیر غلظت بالای ۶۰۰ میکرومولار آب اکسیژنه در مدت زمان ۳۰ دقیقه را بر فراسنجه‌های حرکتی و تنش‌های اکسیداتیو معنی‌دار مشاهده نمودند.

منابع

۱. **شرفی، م.؛ زندی، م.؛ شاهوردی، ع.؛ شاکری، م.؛ نجاتی‌امیری، ا. و نجاتی‌جوارمی، م.، ۱۳۹۳.** اثرات مدت تنش القایی اکسیداتیو ملایم پیش از انجماد بر کیفیت اسپرم گاو بعد از فرایند انجماد/ذوب، مجله سلول و بافت. دوره ۵، صفحات ۴۰۱ تا ۴۰۸.

۲. **Agarwal, A.; Gupta, S. and Sharma, R.K., 2005.** Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod Biol Endocrinol Vol. 3, 28 p.

۳. **Agarwal, A.; Saleh, R.A. and Bedaiwy, M.A., 2003.** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril. Vol. 79, pp: 829-843.

۴. **Balaban, R.S.; Nemoto, S. and Finkel, T., 2005.** Mitochondria, oxidants and aging. Cell. Vol. 120, pp: 483-495.

۵. **Du, Y.; Lin, L.; Schmidt, M.; Bogh, I.B.; Kragh, P.M.; Sorensen, C.B.; Li, J.; Purup, S.; Pribenszky, C.; Molnar, M.; Kuwayama, M.; Zhang, X.; Yang, H.; Bolund, L. and Vajta, G., 2008.** High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. Cloning Stem Cells. Vol. 10, pp: 325-330.

۶. **Feugang, J.M.; de Roover, R.; Moens, A.; Leonard, S.; Dessy, F. and Donnay, I., 2004.** Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. Theriogenology. Vol. 61, pp: 71-90.

۷. **Goto, Y.; Noda, Y.; Mori, T. and Nakano, M., 1993.** Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. Free Radic Biol Med. Vol. 15, pp: 69-75.

۸. **Guerin, P.; El Mouatassim, S. and Menezo, Y., 2001.** Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update. Vol. 7, pp: 175-189.

۹. **Harvey, A.J.; Kind, K.L.; Pantaleon, M.; Armstrong, D.T. and Thompson, J.G., 2004.** Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. Biol Reprod. Vol. 71, pp: 1108-1119.

۱۰. **Khurana, N.K. and Niemann, H., 2000.** Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. Biol Reprod. Vol. 62, pp: 847-856.

۱۱. **Klaunig, J.E. and Kamendulis, L.M., 2004.** The role of oxidative stress in carcinogenesis. Annu Rev Pharmacol Toxicol. Vol. 44, pp: 239-267.

۱۲. **Liu, L. and Keefe, D.L., 2000.** Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. Biol Reprod. Vol. 62, pp: 1828-1834.

۱۳. **Mello Filho, A.; Hoffmann, M. and Meneghini, R., 1984.** Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. Biochemical Journal. Vol. 218, pp: 273-275.

۱۴. **Morales, H.; Tilquin, P.; Rees, J.F.; Massip, A.; Dessy, F. and Van Langendonckt, A., 1999.** Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos. Mol Reprod Dev. Vol. 52, pp: 149-157.

۱۵. **Powers, S.K. and Jackson, M.J., 2008.** Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. Physiol Rev. Vol. 88, pp: 1243-1276.

۱۶. **Pribenszky, C.; Du, Y.; Molnar, M.; Harnos, A. and Vajta, G., 2008.** Increased stress tolerance of matured pig

oocytes after high hydrostatic pressure treatment. Anim Reprod Sci. Vol. 106, pp: 200-207.

۱۷. **Rinaudo, P.F.; Giritharan, G.; Talbi, S.; Dobson, A.T. and Schultz, R.M., 2006.** Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. Fertil Steril. Vol. 86, pp: 1252-1265.

۱۸. **Sharma, A., 2015.** Investigation on the Effects of Exogenous H2O2on Sperm Motility, LPO, Catalase and SOD Levels in Seminal Plasma. Health Science Journal.Vol. 10, pp: 1-10.

۱۹. **Sudano, M.J.; Paschoal, D.M.; da Silva Rascado, T.; Magalhães, L.C.O.; Crocomo, L.F.; de Lima-Neto, J.F. and da Cruz Landim-Alvarenga, F., 2011.** Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. Theriogenology. Vol. 75, pp: 1211-1220.

۲۰. **Takahashi, M., 2012.** Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. J Reprod Dev. Vol. 58, pp: 1-9.

۲۱. **Wu, D. and Cederbaum, A.I., 2003.** Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. Alcohol Res Health. Vol. 27, pp: 277-284.