ارزیابی فلوسایتومتریک اسپرم گاو بعد از انجماد-یخ‌گشایی در رقیق‌کننده منی حاوی اتانول

- **سیدمحمدهادی حسینی**: 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
- **احمد زارع‌شحنه**: گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **محسن شرفی**: گروه علوم طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- **مجتبی امام‌وردی**: گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **مهدی خدایی‌مطلق**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۶

چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر افزودن اتانول به رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم گاو بعد از انجماد و یخ‌گشایی بوده است. در مجموع تعداد ۲٤ انزال از چهار گاو نر (شش انزال از هر گاو طی سه هفته) جمع‌آوری شد. در هر تکرار، نمونه‌های منی با هم مخلوط و سپس به دو قسمت مساوی تقسیم شده و هریک با یکی از رقیق‌کننده‌های حاوی تیمارهای آزمایشی رقیق و منجمد شدند. تیمارهای مورد استفاده در این مطالعه شامل: ۱) رقیق‌کننده فاقد اتانول به‌عنوان گروه شاهد (C) و ۲) رقیق‌کننده حاوی ۰/۲۵ درصد اتانول (E) بود. پس از یخ‌گشایی نمونه‌ها، فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل جنبایی، یکپارچگی و عملکرد غشای پلاسمایی، وضعیت زنده‌مانی و فعالیت میتوکندری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمایش حاضر نشان داد که اسپرم‌های گروه شاهد نسبت به اسپرم‌های گروه اتانول دارای جنبایی کل بالاتر (۷٦/۱۷±۲/٤۹ در مقابل ٦۸/٥۰±۱/۹٦) و میزان آپوپتوزیس کم‌تری (۱۰/۰±٦٥/۳٦ در مقابل ۱۳/۱۳±۰/۳۳) بودند (p<۰/۰٥). هم‌چنین، در سایر فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل یکپارچگی و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم و فعالیت میتوکندری، تفاوتی بین دو گروه شاهد و اتانول مشاهده نشد (p<۰/۰٥). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اتانول می‌تواند اثر منفی بر فراسنجه‌های اسپرم گاو بعد از انجماد و یخ‌گشایی بگذارد.

کلمات کلیدی: آپوپتوزیس، جنبایی، کیفیت منی، میتوکندری

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mzhandi@ut.ac.ir

مقدمه

محافظت انجمادی (Cryopreservation) به‌دلیل این‌که اجازه ذخیره‌سازی بلندمدت و انتشار بهینه ژن‌های برتر را می‌دهد، یکی از مهم‌ترین فناوری‌های زیستی در دسترس برای صنعت دام است. یکی از نتایج محافظت انجمادی، دسترسی به اسپرم بدون توجه به زمان و مکان است که باعث گسترش فناوری‌های تولیدمثلی نظیر تلقیح مصنوعی (Artificial insemination) و باروری آزمایشگاهی (Invitro fertilization) شده است (Guanasena و Critser، ۱۹۹۷). استفاده وسیع از تلقیح مصنوعی باعث شتاب در انتخاب ژنتیکی و پیشرفت در تولید شده است که مهم‌ترین آن‌ها در گاو شیری بوده است. اما از طرفی دیگر گزارش شده است که محافظت انجمادی باعث القای آسیب‌های جدی به اسپرم می‌شود که ممکن است منجر به از دست دادن جنبایی، زنده‌مانی، توانایی باروری، کاهش یکپارچگی غشای آکروزومی و آسیب به DNA شود (Aitken و همکاران، ۱۹۹۳؛ Mediros و همکاران، ۲۰۰۳؛ Vishwanath و Shannon، ۲۰۰۰). آسیب‌هایی که در خلال محافظت انجمادی در اسپرم رخ می‌دهد به عواملی از قبیل تنش سرمایی، تشکیل بلورهای یخ، تنش‌اکسیداتیو، تغییرات اسمزی و سازمان‌دهی مجدد لیپیدها و پروتئین‌ها در غشاهای سلول نسبت داده می‌شود (Watson، ۱۹۹۵؛ Bailey و همکاران، ۲۰۰۰). در سال‌های گذشته نشان داده شده است که افزودن آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند گلوتاتیون احیا شده و آسکوربیک اسید (ویتامین C) به اسپرم اسب (Baumber و همکاران، ۲۰۰۰؛ Aurich و همکاران، ۱۹۹۷)، تائورین و سیستئین به اسپرم گاو (Bilodeau و همکاران، ۲۰۰۱؛ Chen و همکاران، ۱۹۹۳؛ Foote و همکاران، ۱۹۹۳؛ Sarıozkan و همکاران، ۲۰۰۹؛ Uysal و همکاران، ۲۰۰۷) و ویتامین E به اسپرم خروس (Safa و همکاران، ۲۰۱۶)، باعث حفاظت از اسپرم‌ها در برابر تنش اکسیداتیو شده و جنبایی، زنده‌مانی و باروری بعد از یخ‌گشایی را بهبود می‌بخشد. اما استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ویتامین E که محلول در چربی هستند نیاز به حل شدن در حلال هایی مانند اتانول دارند. بنابراین احتمال می‌رود حضور حلال‌هایی مانند اتانول در رقیق کننده بتواند اسپرم را تحت تاثیر قرار دهد. در همین راستا در مطالعه‌ای که برای بررسی اثر ویتامین E بر تکوین رویان انجام گرفت، از اتانول برای حل کردن ویتامین E استفاده کردند که این امر باعث بهبود درصد بلاستوسیت‌های به‌دست آمده شد (Olson و Seidel، ۲۰۰۰). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر اثر مثبت تنش ملایم ناشی از افزودن اتانول به رقیق‌کننده منی بر جنبایی اسپرم گاو نشان داده شد (Dodaran و همکاران، ۲۰۱۵) درحالی‌که مطالعات دیگر نشان داده‌اند که اتانول باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد (Reactive oxygen species=ROS) و القای مرگ سلولی (Apoptosis) در سلول‌های عصبی تاج جمجمه موش می‌شود (Yan و همکاران، ۲۰۱۰؛ Kotch و همکاران، ۱۹۹۵). هم‌چنین، Ansari و همکاران (۱۳۸۹) نشان دادند که افزودن اتانول به رقیق‌کننده اسپرم بز اثرات مخربی روی خصوصیات حیاتی اسپرم بز دارد. از آن‌جایی‌که از اتانول به‌عنوان حلالی برای آنتی‌اکسیدان‌های مختلف استفاده می‌شود و این که گزارش‌های ضد و نقیضی در رابطه با اثر اتانول بر سلول‌ها وجود دارد هدف از مطالعه پیش‌رو بررسی اثر اتانول بر خصوصیات کیفی منی گاو بعد از انجماد و یخ‌گشایی بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری، پردازش، انجماد و یخ‌گشایی اسپرم: نمونه‌های منی با استفاده از واژن مصنوعی از چهار گاو نر بالغ نژاد هلشتاین، ۲ بار در هفته و به‌مدت ۳ هفته جمع‌آوری شد. بلافاصله بعد از جمع‌آوری منی، نمونه‌ها داخل حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌ها برای بررسی جنبایی و درصد اسپرم‌های ناهنجار تحت ارزیابی چشمی قرار گرفتند. از نمونه‌هایی برای انجماد استفاده شد که جنبایی بالاتر از ۷۰ درصد و اسپرم‌های طبیعی بالاتر از ۸۵ درصد داشتند. برای حذف اثرات فردی، نمونه‌های منی از هر چهار گاو با یکدیگر مخلوط شدند. نمونه‌های منی خام مخلوط شده و به دو قسمت مساوی تقسیم شده و هر قسمت با یکی از رقیق‌کننده تجاری اپتیدیل فاقد (C) یا حاوی ۰/۲۵ درصد اتانول (E) تا رسیدن به غلظت نهایی ۱۰۰ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر رقیق شدند. منی رقیق‌شده به‌مدت سه ساعت تا دمای چهار درجه سانتی‌گراد در کابینت سرد (IMV Technologies, L'Aigle Cedex, France)، سرد شد. سپس، نمونه‌های منی به‌داخل پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شدند و برای طی کردن بقیه مراحل انجماد درون دستگاه خودکار انجماد اسپرم (IMV Technologies, L'Aigle Cedex, France) قرار داده شدند. بعد از سپری شدن این زمان، پایوت‌ها به تانک ازت با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از گذشت ۲ هفته، نمونه‌ها برای انجام ارزیابی‌های کیفی یخ‌گشایی شدند. برای یخ‌گشایی منی، پس از خارج کردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، نمونه‌ها بلافاصله در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شدند. پس از آن نمونه‌ها به‌داخل میکروتیوپ‌های دو میلی‌لیتری ریخته و برای ارزیابی فراسنجه‌های کیفی منی بعد از انجماد مورد استفاده قرار گرفتند (Dodaran و همکاران، ۲۰۱۵).

ارزیابی جنبایی و فراسنجه‌های جنبایی: نمونه‌های اسپرم ذوب شده روی لام قرار گرفت و به زیر میکروسکوپ فاز کنتراست منتقل شد و با استفاده از سامانه آنالیز کامپیوتری اسپرم (CEROS

version 12.3; Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) که پیش از این برای ارزیابی اسپرم گاو تنظیم شده بود ارزیابی شدند (Gholami و همکاران، ۲۰۱۰). برای برآورد درصد جنبایی اسپرم، به‌طور تصادفی سه میدان دید انتخاب و پنج بررسی در هر میدان دید و در مجموع ۱۵ بررسی از هر نمونه انجام شد (Ballester و همکاران، ۲۰۰۷). فراسنجه‌هایی که توسط این سامانه ارزیابی شد شامل جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، درصد خطی بودن حرکت اسپرم (LIN یا Linearity)، راستی مسیر طی‌شده (STR یا Straightness)، سرعت در مسیر منحنی (VCL یا Curvilinear velocity)، دامنه جابجایی سر اسپرم (ALH یا Amplitude of lateral head displacement)، میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر (VAP یا Average path velocity)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL یا Straight line velocity) بودند.

ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم: برای ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. در این آزمایش اسپرم‌هایی که غشای آن‌ها دارای اختلال هستند رنگ ائوزین را به‌خود جذب می‌کنند اما اسپرم‌های با غشای سالم رنگ را جذب نمی‌کنند. برای رنگ‌آمیزی، سه میکرولیتر از نمونه اسپرم روی لام قرار داده شد و سپس سه میکرولیتر رنگ ائوزین-نیگروزین روی نمونه ریخته و با هم مخلوط شدند. بعد از آن به‌وسیله یک لام دیگر این مخلوط گسترش داده شد. بعد از این که نمونه‌ها خشک شدند، آن‌ها را زیر میکروسکوپ قرار داده و از هر اسلاید ۲۰۰ اسپرم شمرده شد و درصد اسپرم‌های رنگ‌نگرفته (غشای یکپارچه) محاسبه شد (Blom، ۱۹۵۰).

ارزیابی عملکرد غشای پلاسمایی: در این آزمایش از روش Revell و Mrode (۱۹۹۴) با کمی تغییر استفاده شد. برای انجام این تست، ۳۰ میکرولیتر از نمونه به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هاس اضافه و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. پس از گذشت این زمان، نمونه‌های انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست مورد بررسی قرار گرفت و تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای دم گره خورده (غشاء فعال) محاسبه شد.

ارزیابی زنده‌مانی و آپوتوزیس: ارزیابی میزان زنده‌مانی و آپوپتوزیس در اسپرم با استفاده از کیت AnnexinV/PI (Immune Quality Products(IQP), Groningen, The Netherlands) انجام شد. حضور فسفاتیدیل‌سرین در سطح غشا از نشانه‌های آپوپتوزیس است. آنکسین V در حضور یون کلسیم تمایل زیادی به اتصال به فسفاتیدیل سرین دارد و به‌همین دلیل فسفاتیدیل سرین می‌تواند به‌عنوان یک نشان‌گر در تشخیص آپوپتوزیس مورد استفاده قرار بگیرد. در این روش به‌طور معمول از آنکسین V متصل شده به FITC (Fluorescein isothiocyanate) و همراه با رنگ پروپیدیوم یدید (PI یا Propidium iodide) استفاده می‌شود تا بتوان با آن جمعیت‌های اسپرم‌های زنده (Viable)، اسپرم‌های آپوپتوتیک (Apoptotic) و اسپرم‌های مرده (Necrotic) را شناسایی کرد. در این روش، بعد از یخ‌گشایی نمونه‌های منی، قسمت رقیق‌کننده آن با استفاده از سانتریفیوژ جدا شد. نمونه‌ها به وسیله بافر کلسیم شسته شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر آنکسین V به نمونه‌های منی اضافه شد و نمونه‌ها در جای تاریک و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه نگه‌داری شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر PI به نمونه‌ها اضافه شد. بعد از آن، میزان جابجایی فسفاتیدیل سرین در نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (Becton Dickinson, San Khosoz, CA, USA) اندازه‌گیری شد (Sharafi و همکاران، ۲۰۱۴).

ارزیابی فعالیت میتوکندری: برای ارزیابی فعالیت میتوکندری از رنگ رودامین ۱۲۳ (R123; Invitrogen TM , Eugene, OR, USA) استفاده شد. رودامین ۱۲۳ یک پروب فلورسنت کاتیونی است که به غشای داخلی میتوکندری متصل می‌شود. باند شدن آن به پتانسیل بین غشا بستگی دارد. رودامین به‌صورت فعال وارد زنجیره تنفسی میتوکندری می‌شود و تجمع آن در میتوکندری باعث تولید فلورسنس سبز می‌شود. فقدان فلورسنس نشان‌دهنده نقص در پتانسیل غشای میتوکندری است. در این روش، نمونه‌ها یخ‌گشایی و سپس سانتریفیوژ شدند. بعد از آن پلت اسپرم با ۵۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس مخلوط شد. سپس در محلی تاریک، ۱۰ میکرولیتر رودامین به نمونه اضافه شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه در همان مکان و در دمای محیط قرار داده شد. بعد از آن ۱۰ میکرولیتر PI به نمونه اضافه شد. سپس فعالیت میتوکندری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد (Najafi و همکاران، ۲۰۱۳). نمونه‌های رودامین مثبت و پروپیدیوم یدید منفی، نمونه‌های با میتوکندری فعال هستند و نمونه‌های رودامین مثبت و پروپیدیوم مثبت، نمونه‌های با میتوکندری غیرفعال می‌باشند.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار و ۶ تکرار انجام گرفت. داده‌های آماری با نرم‌افزار SAS ۹,۱ و با رویه T-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌ها به‌صورت میانگین حداقل مربعات±میانگین خطای استاندارد نمایش داده شده‌اند. مدل آماری استفاده شده در این طرح به‌صورت زیر است:

$Y_{ij}=\mu+A_i+e_{ij}$

Y_{ij}: مشاهدات، μ: میانگین جامعه، A_i: اثر تیمار شاهد و e_{ij}: اثرات باقی‌مانده

نتایج

نتایج ارزیابی فراسنجه‌های جنبایی در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد جنبایی کل در گروه E نسبت به گروه C کم‌تر بود ($p<۰/۰۵$) اما دیگر فراسنجه‌های مربوط به جنبایی تحت تاثیر اتانول قرار نگرفت ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین، نتایج حاصل

از این پژوهش هیچ‌گونه تفاوتی بین نمونه‌های گروه‌های C و E از نظر عملکرد و یکپارچگی غشای پلاسمایی نشان نداد (p>۰/۰۵) (جدول ۲). جدول ۳ نمایانگر نتایج ارزیابی‌های فلوسایتومتری اسپرم‌های تیمار شده با اتانول و اسپرم‌های گروه شاهد است. نتایج نشان می‌دهد که نمونه‌های اسپرم گروه E نسبت به گروه C دارای مقدار بیش‌تری از اسپرم‌های آپوپتوتیک بودند (p<۰/۰۵). هم‌چنین، نتایج حاکی از آن است که دیگر فراسنجه‌های مربوط به ارزیابی‌های فلوسایتومتری تحت تاثیر تیمار اتانول قرار نگرفتند.

جدول ۱: میانگین حداقل مربعات (± انحراف معیار) جنبایی و فراسنجه‌های حرکتی اسپرم گاو در حضور (E) و عدم حضور اتانول (C)

فراسنجه / تیمار	TM (درصد)	PM (درصد)	VAP (میکرو متر بر ثانیه)	VSL (میکرو متر بر ثانیه)	VCL (میکرو متر بر ثانیه)	ALH (میکرومتر)	STR (درصد)	LIN (درصد)
شاهد (C)	۷۶/۱۷^{a}±۲/۴۹	۴±۴۴/۲	۷۶/۲±۵۲/۸۲	۵۹/۲±۵۳/۹۹	۱۲۸/۳±۹۲/۸۹	۶/۰±۳۵/۱۲	۱±۷۸/۵۳	۴۷/۱±۶۷/۴۹
اتانول (E)	۶۸/۵۰^{b}±۱/۹۶	۴۳/۱±۵/۷۷	۷۵/۰±۱۲/۷۱	۶۰/۰±۳۳/۴۸	۱۲۵/۱±۷۷/۵۹	۵/۰±۹۶/۱۳	۰±۸۱/۳۷	۴۹/۰±۸۳/۳۱

a , b) میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

TM: جنبایی کل، PM: جنبایی پیش‌رونده، LIN: درصد خطی بودن حرکت اسپرم، STR: راستی مسیر طی شده، VCL: سرعت در مسیر منحنی، ALH: دامنه جابجایی سر اسپرم، VAP: میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر، VSL: سرعت در مسیر مستقیم بودند.

جدول ۲: میانگین حداقل مربعات (± انحراف معیار) یکپارچگی و فعالیت غشاء اسپرم گاو در حضور (E) و عدم حضور اتانول (C)

تیمار / فراسنجه	یکپارچگی غشاء اسپرم (درصد)	فعالیت غشاء اسپرم (درصد)
شاهد (C)	۸۰/۵۲±۱/۸۲	۷۱/۲۶±۱/۳۹
اتانول (E)	۷۱/۲۶±۲/۱۶	۶۸/۹۴±۲/۰۵

جدول ۳: میانگین حداقل مربعات (± انحراف معیار) وضعیت آپوپتوزیس و فعالیت میتوکندری اسپرم گاو در حضور (E) و عدم حضور اتانول (C)

تیمار / فراسنجه	اسپرم‌های زنده (درصد)	اسپرم‌های آپوپتوتیک (درصد)	اسپرم‌های مرده (درصد)	فعالیت میتوکندری (درصد)
شاهد (C)	۷۹/۳۴±۰/۶۵	۱۰/۶۵^{b}±۰/۳۶	۱۰/۰۱±۰/۲۹	۷۲/۰۷±۲
اتانول (E)	۷۴/۹±۲/۶۱	۱۳/۱۳^{a}±۰/۳۳	۱۱/۹۸±۲/۴۴	۷۳/۶۶±۲/۲

a , b) میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

بحث

در این مطالعه فراسنجه جنبایی کل در گروه E به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه C کم‌تر بود اما دیگر فراسنجه‌های مربوط به جنبایی تحت تاثیر اتانول قرار نگرفت. نتایج این مطالعه با مطالعه Dodaran و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت نداشت اما Ansari و همکاران (۱۳۸۹) نتایج مشابهی را گزارش کردند. مطالعات نشان داده است که اتانول باعث تحریک تولید ROS می‌شود (Kotch و همکاران، ۱۹۹۵). در این راستا پژوهشگران گزارش کرده‌اند که افزایش لیپوپراکسیداسیون ناشی از ROS اضافی منجر به کاهش در جنبایی، زنده‌مانی و پتانسیل باروری اسپرم خوک می‌شود (Malo و همکاران، ۲۰۱۰). هم‌چنین، دیگر مطالعات نشان داده‌اند که رادیکال‌های آزاد به یکپارچگی غشا و آکروزوم آسیب می‌زند، DNA را قطعه قطعه می‌کند و در نهایت باعث کاهش و یا حتی متوقف کردن جنبایی اسپرم بعد از فرایند انجماد و یخ‌گشایی می‌شود (Mammoto و همکاران، ۱۹۹۶؛ Aumuller و Seitz، ۱۹۹۰؛ Anderson و همکاران ۱۹۹۴). سازوکار دقیق کاهش جنبایی اسپرم‌ها در حضور اتانول مشخص نیست اما احتمال می‌رود کاهش جنبایی در نمونه‌های حاوی اتانول به‌دلیل افزایش رادیکال‌های آزاد در محیط بوده است.

در این مطالعه هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های گروه‌های C و E از نظر عملکرد و یکپارچگی غشای پلاسمایی مشاهده نشد که با مطالعه Vaseghi و همکاران (۲۰۱۵) و Ansari و همکاران (۱۹۸۹) مطابقت نداشت که به‌ترتیب اثرات مثبت و اثرات منفی افزودن اتانول به رقیق‌کننده اسپرم گاو و بز را گزارش کرده بودند. علت این عدم یکنواختی می‌تواند به‌دلیل تفاوت در میزان اتانول استفاده شده در آزمایش‌های دیگران و هم‌چنین شرایط آزمایشی یا گونه متفاوت با آزمایش حاضر باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که نمونه‌های اسپرم گروه E نسبت به گروه C به‌طور معنی‌داری دارای مقدار بیش‌تری از اسپرم‌های آپوپتوتیک بودند، اما سایر فراسنجه‌های مربوط به ارزیابی‌های فلوسایتومتری تحت تاثیر تیمار اتانول قرار نگرفتند. نتایج

این مطالعه با مطالعه Dodaran و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت نداشت. آن‌ها گزارش کردند که افزودن اتانول به رقیق‌کننده اسپرم گاو با القای تنش اکسیداتیو خفیف باعث فعال شدن برخی مکانیسم‌های دفاعی در اسپرم شده و در نهایت باعث کاهش اسپرم‌های آپوپتوتیک و افزایش درصد اسپرم‌های با میتوکندری فعال می‌شود. هم‌چنین، Navarra و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که قرار دادن سلول‌های نوروبلاستوم انسانی در معرض اتانول، از مرگ سلولی ناشی از مسمومیت سلولی با پروتئین پاکتی gp۱۲۰ جلوگیری می‌کند که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی نداشت. اما Kayani و Parry (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای با موضوع سمیت آزمایشگاهی اتانول و استالدهید گزارش کردند که اتانول باعث افزایش آپوپتوز و نکروز در سلول‌های کشت شده انسانی شده است که نتایج مطالعه حاضر را تایید می‌کند.

از طرفی دیگر Donnelly و همکاران، (۱۹۹۹) اثر اتانول بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم انسان را بررسی کرده و گزارش کردند که همه سطوح استفاده شده از اتانول باعث کاهش جنبایی پیش‌رونده و برخی دیگر از فراسنجه‌های حرکتی آن‌ها شد. به‌نظر می‌رسد براساس مطالعات بررسی شده اتانول با اثر بر DNA سلول اسپرم در نهایت باعث کاهش جنبایی، زنده‌مانی و افزایش ناهنجاری‌ها می‌شود. هم‌چنین گزارش شده است که تنش اکسیداتیو عاملی کلیدی در تحریک مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است (Circu وAw، ۲۰۱۰). در این راستا Rahimipour و همکاران (۲۰۱۳) اثر اتانول بر روی اسپرم موش را بررسی کرده و گزارش کردند که اتانول باعث کاهش جنبایی، افزایش میزان ناهنجاری‌های اسپرم، مختل کردن یکپارچگی DNA و هم‌چنین باعث کاهش میزان زنده‌مانی آن‌ها می‌شود که با نتایج مطالعه پیش‌رو مطابقت داشت. هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر Vignera و همکاران (۲۰۱۳) اثرات اتانول بر سیستم تولیدمثلی نر را مرور کرده و در نهایت گزارش کردند که اتانول باعث بروز اثرات منفی بر روی اسپرماتوزوا و سایر کارکردهای دستگاه تولیدمثلی نر می‌گردد. بنابراین، با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، به‌نظر می‌رسد که تیمار اتانول با تحریک تولید بیش‌تر ROS باعث ایجاد تنش اکسیداتیو بروز آسیب به DNA و در پی آن باعث افزایش آپوپتوزیس در نمونه‌های اسپرم شده است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که احتمالاً اتانول با القای آپوپتوزیس، جنبایی اسپرم را بعد از فرایند انجماد و یخ‌گشایی کاهش می‌دهد.

منابع

۱. **انصاری، م.؛ و توحیدی، آ. و مرادی‌شهربابک، م.، ۱۳۸۹.** اثرات مخرب اتانول بر ویژگی‌های حیاتی سلول اسپرم در بز. مجله دامپزشکی و آزمایشگاه. دوره ۲، شماره ۲، صفحات ۱۵۱ تا ۱۵۶.

۲. **Aitken, R.J.; Buckingham, D. and Harkiss, D., 1993.** Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. J. Reprod. Fertil. Vol. 97, pp: 441-450.

۳. **Anderson, S.; Harkness, W.; Akin, Y.; Kaproth, M. and Killian, G., 1994.** Categorical Data Analysis of the Effect on Bull Fertility, of Butylated Hydroxytoluene Addition to Semen, Extenders Prior to Freezing. J Dairy Sci. Vol. 77, No. 8, pp: 2302-2307.

۴. **Aumuller, G. and Seitz, J., 1990.** Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. Int Rev Cytol. Vol. 121, pp: 127-231.

۵. **Aurich, J.E.; Schonherr, U.; Hoppe, H. and Aurich, C., 1997.** Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. Theriogenology. Vol. 48, pp: 185-192.

۶. **Bailey, J.L.; Blodeau, J. and Cormier, N., 2000.** Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon minireview. J. Androl. Vol. 21, pp: 1-7.

۷. **Ballester, J.; Johannisson, A.; Saravia, F.; Haard, M.; Gustafsson, H.; Bajramovic, D. and Rodriguez Martinez, H., 2007.** Post-thaw viability of bull AI-doses with low-sperm numbers. Theriogenology. Vol. 68, No. 6, pp: 934-943.

۸. **Baumber, J.; Ball, B.A.; Gravance, C.G.; Medina, V. and Davies Mora, M.C.G., 2000.** The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. J Androl. Vol. 21, No. 6, pp: 895-902.

۹. **Bilodeau, J.F.; Blanchette, S.; Gagnon, C. and Sirard, M.A., 2001.** Thiols prevent H 2 O 2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology. Vol. 56, No. 2, pp: 275-286.

۱۰. **Blom, E., 1950.** A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. Fertil Steril. Vol. 1, pp: 176-177.

۱۱. **Circu, M.L. and Aw, T.Y., 2010.** Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. Free Radic Biol Med. Vol. 48, No. 6, pp: 749-762.

۱۲. **Chen, Y.; Foote, R.H. and Brockett, C.C., 1993.** Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. Cryobiology. Vol. 30, No. 4, pp: 423-431.

۱۳. **Dodaran, H.V.; Zhandi, M.; Sharafi, M.; Nejati Amiri, E.; Nejati Javaremi, A.; Mohammadi Sangcheshmeh, A.; Shehab El, M.A.M.M. and Shakeri, M., 2015.** Effect of ethanol induced mild stress on post-thawed bull sperm quality. Cryobiology. Vol. 71, No. 1, pp: 12-17.

۱۴. **Donnelly, G.P.; McClure, N.; Kennedy, M.S. and Lewis, S.E.M., 1999.** Direct effect of alcohol on the motility and morphology of human spermatozoa. Andrologia. Vol. 31, No. 1, pp: 43-47.

۱۵. **Foote, R.H.; Chen, Y.; Brockett, C.C. and Kaproth, M.T., 1993.** Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine, or blood serum. J Dairy Sci. Vol. 76, No. 7, pp: 1908-1913.

۱۶. **Gholami, H.; Chamani, M.; Towhidi, A. and Fazeli, M.H.M. 2010.** Effect of feeding a docosahexaenoic acid enriched nutriceutical on the quality of fresh and frozen thawed semen in Holstein bulls. Theriogenology. Vol. 74, No. 9, pp: 1548-1558.

۱۷. **Gunasena, K.T. and Critser, J.K., 1997.** Utility of viable tissues ex vivo. Reprod. Tissue Bank. Sci. Princ. Acad. Press, USA. pp: 1-21.

۱۸. **Kayani, M.A. and Parry, J.M., 2010.** The in vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. Toxicity in vitro. Vol. 24, pp: 56-60.

۱۹. **Kotch, L.E.; Chen, S. and Sulik, K.K., 1995.** Ethanol induced teratogenesis: Free radical damage as a possible mechanism. Teratology. Vol. 52, No. 3, pp: 128-136.

۲۰. **La Vignera, S.; Condorelli, R.A.; Balercia, G.; Vicari, E. and Calogero, A.E., 2013.** Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature. Asian journal of andrology. Vol. 15, No. 2, pp: 221.

۲۱. **Malo, C.; Gil, L.; Gonzalez, N.; Martínez, F.; Cano, R.; De Blas, I. and Espinosa, E., 2010.** Anti oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Cryobiology. Vol. 61, No. 1, pp: 142-147.

۲۲. **Mammoto, A.; Masumoto, N.; Tahara, M.; Ikebuchi, Y.; Ohmichi, M.; Tasaka, K. and Miyake, A., 1996.** Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. Biol Reprod. Vol. 55, No. 5, pp: 1063-1068.

۲۳. **Medeiros, C.M.O.; Forell, F.; Oliveira, A.T.D. and Rodrigues, J.L., 2002.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology. Vol. 57, pp: 327-344.

۲۴. **Najafi, A.; Zhandi, M.; Towhidi, A.; Sharafi, M.; Sharif, A.A.; Khodaei Motlagh, M. and Martinez Pastor, F., 2013.** Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. Cryobiology. Vol. 66, No. 3, pp: 275-282.

۲۵. **Navarra, M.; Romano, C.; Lorenzon, T.; Rotiroti, D. and Di Renzo, G., 2001.** Ethanol exposure inhibits the cytotoxic effect induced by gp120 in CHP100 human neuroblastoma cells. Journal of Neuroscience Research. Vol. 65, pp: 354-361.

۲۶. **Olson, S.E. and Seidel, G.E., 2000.** Culture of in vitro produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. Biol Reprod. Vol. 62, No. 2, pp: 248-252.

۲۷. **Rahimipour, M.; Talebi, A.R.; Anvari, M.; Sarcheshmeh, A.A. and Omidi, M., 2013.** Effects of different doses of ethanol on sperm parameters, chromatin structure and apoptosis in adult mice. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. Vol. 170, No. 2, pp: 423-428.

۲۸. **Revell, S.G. and Mrode, R.A., 1994.** An osmotic resistance test for bovine semen. Anim Reprod Sci. Vol. 36, N0. 1, pp: 77-86.

۲۹. **Safa, S.; Moghaddam, G.; Jozani, R.J.; Kia, H.D. and Janmohammadi, H., 2016.** Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. Anim Reprod Sci. Vol. 174, pp: 100-106.

۳۰. **Sarıozkan, S.; Bucak, M.N.; Tuncer, P.B.; Ulutas, P.A. and Bilgen. A., 2009.** The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. Cryobiology. Vol. 58, No. 2, pp: 134-138.

۳۱. **Sharafi, M.; Zhandi, M. and Sharif, A.A., 2014.** Supplementation of soybean lecithin based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. Cell Tissue Bank. Vol. 16, No. 2, pp: 261-269.

۳۲. **Uysal, O.; Bucak, M.N.; Yavas, I. and Varisli, O., 2007.** Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. J Anim Vet Adv. Vol. 6, No. 2, pp: 1362-1366.

۳۳. **Vishwanath, R. and Shannon, P., 2000.** Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim. Reprod. Sci. Vol. 62, pp: 23-53.

۳۴. **Watson, P.F., 1995.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod. Fertil. Dev. Vol. 7, pp: 871-891.

۳۵. **Yan, D.; Dong, J.; Sulik, K.K. and Chen, S., 2010.** Induction of the Nrf2 driven antioxidant response by tert butylhydroquinone prevents ethanol-induced apoptosis in cranial neural crest cells. Biochem Pharmacol. Vol. 80, No. 1, pp: 144-149.