



"مقاله کوتاه"

استفاده از پرتوتابی گاما برای افزایش تحرک و زندهمانی اسپرم گاو پس از انجماد و یخ‌گشایی

پروین شورنگ^۱، مریم رهبر^۲، مهدی بهگر^۳ و فرحناز معتمدی سده^۴

۱- دانشیار، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، (نویسنده مسئول: pshawrang@aeoi.org.ir)

۲- کارشناس، شرکت نهاده‌های دامی جاهد

۳- استادیار، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای

۴- دانشیار، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۳

صفحه: ۱۳۶ تا ۱۴۱

چکیده

به منظور تعیین دز مناسب پرتوتابی گاما برای افزایش تحرک و زندهمانی اسپرم گاو پس از یخ‌گشایی و مطالعه اثرات پرتو بر مقدار مالون‌دی‌آلدئید و میزان شکست DNA اسپرم، نمونه‌های اسپرم منجمد در داخل ظرف ازت با دزهای صفر، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ گری پرتو گاما پرتوتابی شد. آنالیز کمی و کیفی اسپرم قبل و بعد از پرتوتابی با استفاده از سامانه CASA^۱ انجام شد. ویژگی‌های مورفولوژیکی و میزان زندهمانی پس از رنگ آمیزی با آنوزین-نگروزین مورد مطالعه قرار گرفت. مقدار مالون دی‌آلدئید منی با استفاده از روش تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری و شکست DNA اسپرم با استفاده از روش کامت سنجش شد. داده‌های آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS آنالیز شد. طبق نتایج به دست آمده اثر پرتوتابی بر تحرک و زندهمانی اسپرم معنی‌دار بود ($p < 0.05$). مقدار مالون‌دی‌آلدئید منی در دزهای مختلف پرتو گاما با تیمار شاهد تفاوت نداشت ($p > 0.05$). طبق نتایج کامت، فراسنجه‌های شکست DNA اسپرم‌های پرتوتابی شده، به جز دز ۰/۹ گری گاما با تیمار شاهد تفاوت نداشت ($p > 0.05$). با توجه به نتایج این پژوهش پرتوتابی با دز ۰/۷ گری گاما می‌تواند بدون اثرات منفی بر اسپرم و منی، سبب بهبود تحرک و زندهمانی اسپرم بعد از یخ‌گشایی شود.

واژه‌های کلیدی: پرتوتابی گاما، تحرک، زندهمانی، اسپرم گاو

مقدمه

انجماد و یخ‌گشایی اسپرم با ایجاد تنش‌های اکسیداتیو، شیمیایی و فیزیکی بر غشای اسپرم سبب کاهش تحرک، زندهمانی و قدرت باروری اسپرم خواهد شد (۵۶). اگرچه در رقیق‌کننده‌ها از ترکیباتی مثل گلیسرول و برخی از اسید آمینه‌ها (مثل گلوتامین، گلیسین، پرولین، آلانین و هیستیدین) برای محافظت سلول اسپرم از شوک سرمایی استفاده می‌شود ولی هنوز کاهش ۲۵ درصدی در قابلیت تحرک اسپرم گاو بعد از یخ‌گشایی مشاهده می‌شود (۱). پرتو گاما پرتو پرانرژی و یون‌ساز است و مشابه یک بسته پرانرژی (فوتون) عمل می‌کند. برای تعیین مقدار انرژی منتقل شده از پرتوهای یون‌ساز به ماده تحت پرتو، از کمیت دز استفاده می‌شود. واحد دز در سیستم بین‌المللی، گری (Gy) است که معادل جذب یک ژول انرژی در کیلوگرم ماده تحت پرتو (J/Kg) است (۱۴).

درباره اثرات مثبت پرتوتابی بر کیفیت اسپرم حیوانات آزمایشگاهی (موش و رت) گاو و سایر دام‌ها گزارش‌هایی منتشر شده است (۱۵، ۳، ۱۰). تاتینو و همکاران (۱۵) با مطالعه اثرات پرتوهای یون‌ساز روی کروموزوم اسپرم در دو نژاد مختلف همستر (چینی و طلایی) گزارش کردند که پرتوهای یون‌ساز با ایجاد رادیکال‌های آزاد واکنشگر سبب ایجاد شکست‌های تکررشته‌ای و متعاقب آن شکست‌های دو رشته‌ای می‌شود.

بررسی نسبی میزان مهاجرت DNA، راه ساده‌ای برای اندازه‌گیری میزان شکست‌های DNA در یک سلول است.

اگرچه روش‌های متفاوتی برای بررسی میزان شکست‌های DNA وجود دارد؛ ولی روش کامت نسبت به سایر روش‌ها مزیت‌هایی دارد. از جمله مزایای این روش این است که امکان بررسی صدمات در سلول‌های تکی وجود دارد و قادر به آشکار کردن حداقل آسیب DNA است (۱۱).

روش ارزیابی کامت، یک روش سریع، حساس و کم‌هزینه است که برای ارزیابی آسیب DNA استفاده می‌شود. در این روش ابتدا نمونه بر روی لام الکتروفورز می‌شود و پس از رنگ‌آمیزی فلورسنت و تصویربرداری با میکروسکوپ فلوروسنت، از نرم‌افزار Comet score برای برآورد فراسنجه‌های آسیب به DNA شامل DNA in tail % و Tail moment^۲ استفاده می‌شود. کامت (Comet) در مشاهدات شامل سر (Head) بعلاوه دم (Tail) است. مقدار Tail moment با استفاده از نرم‌افزار و رابطه زیر محاسبه می‌شود.

$$\text{Tail moment} = \text{Tail length (px)} \times \% \text{ DNA in tail.}$$

در این رابطه، طول دم فراسنجه‌ای است که بر اساس شدت نور (پیکسل) بوسیله نرم‌افزار برآورد می‌شود (۴).

پرتوتابی با تغییر پوشش‌های محافظتی و برداشته شدن تدریجی آن از سطح اسپرم سبب آشکار شدن کانال‌های کلسیم و محل گیرنده‌ها و در نهایت افزایش تحرک و باروری اسپرم می‌شود (۷). لوبات و همکاران (۷) گزارش کردند که پرتو لیزر با اثرات تحریک نوری و تحریک غشای سلولی روی انتقال کلسیم به داخل اسپرم گاو مؤثر است. این محققین با

نیگروزیل در ۳ درصد تری-سدیم سیترات دی هیدرات (محلول) مخلوط شد. سپس یک قطره (۵ میکرولیتر) از مخلوط آماده شده را روی لام گرم شده قرار داده و گسترش تهیه شد. بعد از خشک شدن در هوا، نمونه اسلاید زیر میکروسکوپ (بزرگنمایی $400 \times$) بررسی شد. ۲۰۰ اسپرم برای سرهای غیر رنگ آمیزی شده، اسپرم در حالت زنده و نیز برای سرهای رنگ آمیزی شده (به طور کامل یا جزئی) اسپرم در حالت مرده، شمارش شد (۲).

پس از رنگ آمیزی نمونه ها با آئوزین- نگرزین، وضعیت مورفولوژیکی نمونه های اسپرم از نظر درصد اسپرم های طبیعی، بدون سر، دارای سر غیرطبیعی، دارای بدنه غیرطبیعی، دارای دم غیرطبیعی، دارای قطره سیتوپلاسمیک پروکسیمال، دارای قطره سیتوپلاسمیک دیستال قبل و بعد از پرتوتابی مورد مطالعه قرار گرفت.

تعیین مقدار مالون دی آلدیید: برای تعیین مقدار مالون دی آلدیید از روش تیوباریتوریک اسید استفاده شد (۱۲). در این روش یک مولکول تیوباریتوریک اسید با دو مولکول مالون دی آلدیید واکنش داده و رنگ صورتی نمایان می شود. محلول های مورد نیاز در این تست شامل محلول ۰/۶۷ درصد تیوباریتوریک اسید، محلول ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید، EDTA و BHT (Butylated hydroxytoluene) است. برای تهیه محلول ۰/۶۷ درصد تیوباریتوریک اسید ابتدا مقدار ۰/۱۳۴ گرم تیوباریتوریک اسید در ۲۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر ریخته و برای ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد سپس با ورتکس حل شد.

برای تهیه محلول ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) مقدار ۳ گرم تری کلرواستیک اسید در ۳۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل شد.

برای تهیه محلول BHT مقدار ۰/۲ گرم BHT در ۱۰ میلی لیتر اتانول حل شد و برای تهیه محلول EDTA از ۰/۳۷ گرم EDTA در ۱۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر استفاده شد. برای اندازه گیری مقدار مالون دی آلدیید ابتدا نمونه ها رقیق شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از هر نمونه با ۰/۵ میلی لیتر EDTA ، ۰/۵ میلی لیتر BHT و ۱ میلی لیتر TCA به هر فالكون اضافه شد. لوله های فالكون در $936 \times g$ برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس در لوله های آزمایش درب دار به ۱ میلی لیتر از محلول بالای فالكون ۲ میلی لیتر TBA اضافه شد. لوله ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از خنک شدن با استفاده از اسپکتروفتومتر جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه گیری شد. با استفاده از منحنی استاندارد و با توجه به مقادیر جذب نوری، غلظت مالون دی آلدیید (نانومول در میلی لیتر منی) محاسبه شد. رسم نمودار استاندارد با استفاده از غلظت های مختلف مالون دی آلدیید خالص در برابر مقدار جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر انجام شد.

تعیین میزان شکست DNA: برای تعیین میزان آسیب کروماتین از روش کامت استفاده شد (۴). برای این منظور ابتدا محلول های مورد نیاز تهیه سپس پوشش دار کردن لام با آگارز انجام شد. محلول های مورد استفاده شامل محلول

استفاده از تکنیک فیلتراسیون نشان دادند که در سلول های اسپرمی پرتوتابی شده با لیزر، غلظت یون های کلسیم در سیتوپلاسم اسپرماتوزوا افزایش یافته و نقش تنظیم کنندگی در کنترل حرکت اسپرم و واکنش اکروزوم دارد. سیستم هایی که در اسپرماتوزوا غلظت یون کلسیم درون سلولی را تنظیم می کنند شامل میتوکندری، پمپ های کلسیم وابسته به انرژی غشایی و کانال های کلسیمی است. پرتو لیزر به وسیله آنزیم های میتوکندریایی جذب می شود و با تحریک پورفیرین ها و سیتوکروم های میتوکندریایی، واکنش های احیا را در زنجیره انتقال الکترون فعال می کند. این فعال سازی می تواند سبب تغییراتی در غلظت یون های کلسیم در سلول شود (۸).

هدف مطالعه حاضر تعیین دز مناسب پرتوتابی گاما و مطالعه اثرات آن بر کیفیت اسپرم جهت افزایش تحرک و زنده ماندن اسپرم گاو پس از یخ گشایی بود.

مواد و روش ها

پرتوتابی نمونه های اسپرم: تعداد ۳۰ پایوت ۰/۵ میلی لیتری حاوی اسپرم منجمد از شرکت نهاده های دامی جاهد تهیه شد و در دمای -196°C درجه سلسیوس نیتروژن مایع جهت پرتوتابی گاما به گروه پژوهشی دزیمتری و مونیتورینگ پرتوها (پژوهشکده کاربرد پرتوها؛ پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای؛ سازمان انرژی اتمی) منتقل شد.

با توجه به پیشینه مطالعات انجام شده، پرتوتابی با دز بیشتر از ۱ گری گاما سبب آسیب DNA خواهد شد (۱۳)؛ بنابراین پرتوتابی نمونه های اسپرم منجمد با دزهای ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ گری پرتو گاما با استفاده از سامانه پرتوتابی Picker V9 با نرخ $302/56$ گری بر ساعت در آب در $SSD=80$ و اندازه میدانی 10×10 سانتی متر مربع انجام شد. تعداد تکرار برای هر دز شامل ۵ پایوت بود. پایوت های اسپرم در حین پرتوتابی داخل ظرف ازت قرار داشتند و تا زمان انجام آزمایشات ارزیابی کیفیت اسپرم درون تانک ازت نگهداری شد.

تعیین غلظت و درصد تحرک اسپرم بعد از یخ گشایی:

برای ارزیابی کیفیت اسپرم پرتوتابی شده و مقایسه آن با نمونه پرتوتابی نشده از نظر تحرک و زنده ماندن، پایوت های اسپرم در بن ماری 37°C درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه یخ گشایی شدند. آنالیز کمی و کیفی اسپرم شامل تعیین غلظت، درصد اسپرم های دارای تحرک، حرکت پیش رونده، حرکت دایره وار، حرکت سریع، حرکت آهسته، حرکت درجا و عدم تحرک قبل و بعد از پرتوتابی با استفاده از سامانه کاسا^۱ انجام شد. برای این منظور ۴ مایکرولیتر از اسپرم یخ گشایی شده روی یک لام از قبل گرم شده گذاشته شد و با یک لامل پوشانده شد و سه مشاهده از سه مکان مختلف به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شد.

تعیین ویژگی های مورفولوژیکی و میزان زنده ماندن اسپرم: برای تعیین میزان زنده ماندن اسپرم ۲۰ میکرولیتر نمونه منجمد- یخ گشایی شده را روی اسلایدی که قبلاً گرم شده بود قرار داده و با ۱۰۰ میکرولیتر ترکیب رنگ آمیزی سوپراویتال (۱ درصد (W/V) آئوزین B، ۵ درصد (W/V)

1- Source Sample Distance

2- Progressive motility

3- CASA: Computer Assisted Semen Analysis (12500/0000 AndroVision® Modul Concentration & Motility)

پس از الکتروفورز لام‌ها در محلول خنثی‌سازی یا PBS به مدت ۱۵ دقیقه شستشو شد.

پس از مرحله خنثی‌سازی هر ژل (لامل) با محلول رنگ سایبر گرین^۲ رنگ‌آمیزی شد و بعد از نیم ساعت با میکروسکپ فلورسنت مشاهده و عکس برداری شد. در هر لام دو ژل (لامل) و در هر ژل ۱۰۰ سلول مورد بررسی قرار گرفت. با کمک نرم‌افزار Comet score فراسنجه‌های آسیب به DNA شامل DNA in tail % و Tail moment^۳ مورد ارزیابی قرار گرفت (۴).

طرح آزمایشی، طرح کاملاً تصادفی و مدل آماری $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$ بود. در این مدل Y_{ij} : مقدار هر مشاهده، μ : میانگین، T_i : اثر تیمار i و e_{ij} : خطای آزمایش است. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS آنالیز شد و از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ برای مقایسه میانگین استفاده شد.

نتایج و بحث

غلظت و درصد تحرک اسپرم بعد از یخ‌گشایی: غلظت اسپرم نمونه‌های پرتوتابی شده گاما با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$). آنالیز داده‌های درصد تحرک اسپرم تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های پرتوتابی شده با نمونه شاهد نشان داد ($P < 0/05$). پرتوتابی گاما در دزهای ۰/۳ و ۰/۵ گری سبب افزایش تحرک اسپرم پس از یخ‌گشایی در مقایسه با گروه شاهد شد. درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده تحت تأثیر پرتوتابی گاما قرار نگرفت ($P > 0/05$). پرتوتابی سبب افزایش درصد اسپرم‌های دارای حرکت دایره‌ای شد. درصد اسپرم‌های دارای حرکت سریع در نمونه‌های پرتوتابی شده گاما تفاوتی با نمونه شاهد نداشت ($P > 0/05$).

درصد اسپرم‌های دارای حرکت آهسته و حرکت درجا در نمونه‌های پرتوتابی شده گاما نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد. پرتوتابی گاما سبب کاهش درصد اسپرم‌های بدون حرکت شد ($P < 0/05$). بیشترین تأثیر پرتو گاما بر تحرک اسپرم در دز ۰/۳ گری بود. دز ۰/۳ گری پرتو گاما سبب افزایش ۱۷ درصدی تحرک اسپرم و کاهش ۴۱ درصدی اسپرم‌های بدون حرکت شد.

افزایش تحرک اسپرم می‌تواند به دلیل ایجاد تحرک در اسپرم‌های بدون حرکت باشد. پرتوتابی با تغییر پوشش‌های محافظتی و برداشته شدن تدریجی آن از سطح اسپرم سبب آشکار شدن کانال‌های کلسیم و محل گیرنده‌ها و در نهایت افزایش تحرک و باروری اسپرم می‌شود (۷).

لایزیس، محلول (بافر) الکتروفورزی، محلول (بافر) خنثی‌کننده و محلول PBS بود.

برای تهیه محلول استوک لایزیس بافر ۱۹/۴۶ گرم NaCl، ۲۴/۳۷ گرم EDTA و ۲۵/۱ گرم Tris داخل ارلن با ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با هم‌زن مغناطیسی همراه با گرمادهی مخلوط شد و با اضافه کردن چند قطره NaOH ۱ نرمال pH آن روی ۹/۵ تنظیم شد. حجم محلول با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیگر به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای تهیه محلول کاری ۹۹ میلی‌لیتر از محلول استوک با ۱ میلی‌لیتر Triton X-100 و یک گرم نمک سدیم لاریل سارکوزینات^۱ مخلوط شد.

برای تهیه بافر الکتروفورز ۲۴/۶ گرم استات سدیم و ۱۲/۱ گرم تریس-HCl را در یک لیتر آب مقطر حل نموده و pH روی ۸/۳ تنظیم شد.

برای تهیه بافر خنثی‌کننده ۴۸/۵ گرم Tris در ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد pH محلول با HCl روی ۷/۵ تنظیم و با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیگر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

برای تهیه محلول PBS نیز ۸ گرم NaCl، ۲ گرم KCl، ۱۴۴/۱ گرم Na_2HPO_4 ، ۲۴/۰ گرم KH_2PO_4 وزن و مقدار ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و هم زده شد. pH محلول با اضافه کردن چند قطره HCl و ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی ۷/۵ تنظیم شد.

برای پوشش‌دار کردن لام‌ها حداقل ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش آگارز نقطه ذوب معمولی ۰/۸ درصد تهیه و لام‌ها را درون بشر فروبری نموده و سپس پشت لام‌ها با دستمال خشک شد و در دمای اتاق و دور از گرد و خاک به صورت افقی قرار داده شد تا خشک شود.

برای آماده‌سازی نمونه‌های اسپرم، آگارز نقطه ذوب پایین (LMPA) ۰/۷ درصد درون PBS تهیه و سلول‌های اسپرم با آگارز LMPA مخلوط شد. برای این منظور نمونه‌های اسپرم سانتریفیوژ و پس از تخلیه سوپرناتانت با ۵۰۰ μ l PBS رقیق‌سازی شده و این سوسپانسیون سلولی به نسبت ۱:۵ (۳۰ μ l: ۱۵۰ μ l) با آگارز LMPA مخلوط شد. سپس ۶۵ میکرولیتر از این مخلوط روی لام پوشش‌دار قرار داده شد و با لامل پوشانده شد. جهت سفت شدن ژل آگارز لام‌ها مدت ۱۰ دقیقه درون یخچال قرار داده شد. سپس لامل به آرامی برداشته شد و لام‌ها به مدت یک شبانه روز درون جار حاوی محلول لایزیس در یخچال قرار داده شد (۴).

برای انجام الکتروفورز، لام‌ها با آب مقطر یا بافر الکتروفورزی به آرامی شستشو شد سپس لام‌ها درون تانک الکتروفورز حاوی بافر الکتروفورزی قرار گرفته و با شرایط $V/cm \cdot 6$ و ۱۲ میلی‌آمپر به مدت یک ساعت الکتروفورز شد.

1- Sodium lauryl sarcosinate

2- CinnaGen DNA Safe Stain, Cat. No: EP5082

3- Tail moment = Tail length (px) $\times$ % DNA in tail

جدول ۱- غلظت ($10^9/ml$) و درصد تحرک اسپرم قبل و بعد از پرتوتابی گاما (گری)

Table 1. Concentration ($10^9/ml$) and sperm motility pre-and post-gamma irradiation (Gy)

غلظت	تحرک	حُرکت پیشرونده	حُرکت دایره‌وار	حُرکت سریع	حُرکت آهسته	حُرکت درجا	عدم تحرک
شاهد (قبل از رتوتابی)	۳۹/۸	۷۰/۲۱ ^c	۶۴/۷۶	۱/۸۱ ^d	۵۷/۷۸	۵/۱۴ ^c	۲۹/۸ ^a
۰/۱ گری	۳۷/۴	۷۹/۰۶ ^{abc}	۶۷/۷۶	۳/۰۶ ^{ab}	۵۷/۶۷	۷/۰۳ ^{ab}	۲۰/۹۴ ^{abc}
۰/۳ گری	۳۲/۹	۸۲/۱۶ ^a	۶۵/۷۰	۲/۳۳ ^d	۵۵/۵۸	۷/۸۱ ^a	۱۷/۸۴ ^c
۰/۵ گری	۳۴/۰	۸۰/۴۸ ^{ab}	۶۷/۵۴	۴/۱۶ ^a	۵۸/۸۴	۵/۵۶ ^{bc}	۱۹/۵۲ ^{bc}
۰/۷ گری	۳۷/۳	۷۵/۰۴ ^{abc}	۶۶/۴۱	۲/۵۱ ^d	۵۷/۹۷	۵/۹۰ ^{bc}	۲۴/۹۶ ^{abc}
۰/۹ گری	۳۵/۶	۷۹/۶۱ ^{ab}	۶۴/۸۷	۱/۵۷ ^d	۵۶/۱۹	۷/۰۹ ^{ab}	۲۰/۳۹ ^{bc}
اشتباه معیار	۸/۱۱	۹/۲۸۰	۸/۹۲۲	۱/۵۵۳	۸/۶۰۲	۱/۶۱۴	۹/۲۸۰

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) می‌باشد.

ویژگی‌های مورفولوژیکی و میزان زنده‌مانی اسپرم:

پرتوتابی گاما درصد اسپرم‌های طبیعی را تحت تأثیر قرار داده سبب افزایش ۱۰ درصدی اسپرم‌های طبیعی شد ($P < 0.05$). درصد اسپرم‌های بدون سر و دارای سر غیرطبیعی تحت تأثیر پرتوتابی گاما قرار نگرفت و نمونه‌های پرتوتابی شده تفاوتی با تیمار شاهد نداشت ($P > 0.05$). درصد اسپرم‌های دارای بدنه غیرطبیعی ابتدا تا دز ۰/۵ گری تحت تأثیر پرتوتابی گاما افزایش و با افزایش دز پرتوتابی به ۰/۷ و ۰/۹ گری درصد اسپرم‌های دارای بدنه غیرطبیعی کاهش پیدا کرد ($P < 0.05$).

تغییرات درصد اسپرم‌های طبیعی در نمونه‌های پرتوتابی شده با گاما می‌تواند به دلیل اثر پرتو در ایجاد مقاومت در اسپرم‌ها به تغییرات مورفولوژیکی باشد. این پدیده که در دزهای پایین گاما مشاهده می‌شود پدیده هورمسیس^۱ نام دارد. تتوری هورمسیس بیان می‌کند که دزهای کم پرتوهای یون‌ساز می‌تواند سازوکارهای ترمیمی را در سلول زنده فعال کند که در غیاب پرتوها فعال نمی‌شود. این سازوکارهای ترمیمی قادرند سلول زنده را محافظت کنند (۹).

مطالعاتی جهت بررسی اثرات پرتوهای یون‌ساز روی کروموزوم اسپرم در دو نژاد مختلف همستر (چینی و طلایی) توسط تاتینو و همکاران (۱۵) انجام شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد: که اثرات پرتوهای گاما (۱/۱۰، ۲/۱۵، ۲/۹۵، ۴/۰۱ گری) و پرتو ایکس (۰/۹۱، ۱/۸۲ و ۳/۶۳ گری) اختلاف عمده‌ای را در ساختمان کروموزومی اسپرم‌ها ایجاد نکرد.

مقدار مالون دی آلدئید: مقدار مالون دی آلدئید در دزهای صفر، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ گری به ترتیب ۰/۰۰۴، ۰/۰۰۴، ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۶، ۰/۰۰۴ و ۰/۰۰۵ نانومول در ۱۰۰

جدول ۲- درصد اسپرم‌های زنده، طبیعی و غیرطبیعی قبل و بعد از پرتوتابی گاما (گری)

Table 2. Viability, normal and abnormal sperm (%) pre-and post-gamma irradiation (Gy)

طبیعی	بدون سر	سر غیرطبیعی	بدنه غیرطبیعی	قطره سیتوپلاسمیک پروکسیمال	قطره سیتوپلاسمیک دیستال	زنده‌مانی
شاهد (قبل از پرتوتابی)	۸۴/۸ ^d	۱/۶	۱/۰	۵/۴ ^{bc}	۴/۶ ^{ab}	۲/۰
۰/۱	۸۳/۸ ^d	۱/۰	۱/۰	۷/۶ ^{ab}	۳/۲ ^{ab}	۲/۰
۰/۳	۸۳/۲ ^d	۲/۶	۱/۲	۶/۶ ^{ab}	۴/۰ ^{ab}	۱/۲
۰/۵	۸۱/۶ ^d	۲/۰	۰/۲	۱۱/۶ ^a	۳/۶ ^{ab}	۰/۴
۰/۷	۸۷/۶ ^{ab}	۱/۲	۱/۴	۳/۲ ^{bc}	۲/۲ ^d	۲/۲
۰/۹	۹۳/۲ ^a	۱/۰	۱/۰	۱/۲ ^c	۱/۶ ^d	۱/۲
اشتباه معیار	۵/۴۵	۱/۸۵	۱/۲۴	۳/۶۹	۳/۵۰	۱/۸۰

عدم درج حروف در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$) و حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) می‌باشد

جدول ۳- فراسنجه‌های شکست DNA اسپرم قبل و بعد از پرتوتابی گاما (گری)

Table 3. DNA strand breaks parameters pre-and post-gamma irradiation (Gy)			
Tail Moment ^۱	%DNA in Tail	کامت مشاهده شده (درصد)	شاهد (قبل از پرتوتابی)
۲/۱۴ ^b	۳/۱۱ ^b	۲/۸۶ ^b	۰/۱
۲/۱۰ ^d	۲/۸۴ ^d	۲/۶۰ ^d	۰/۳
۷/۷۲ ^b	۹/۱۸ ^d	۳/۲۰ ^d	۰/۵
۹/۷۱ ^d	۱۰/۳۳ ^d	۶/۹۵ ^{ad}	۰/۷
۱۲/۵۹ ^{ad}	۱۳/۲۸ ^{ad}	۸/۴۳ ^{ad}	۰/۹
۱۷/۳۶ ^a	۱۹/۰۸ ^a	۹/۵۶ ^a	
۷/۶۸ ^c	۸/۹۵ ^c	۶/۲۵ ^c	اشتباه معیار

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) است.

منابع

- Amirat-Briand, L., D. Bencharif, O. Vera-Munoz, H. Bel Hadj Ali, S. Destrumelle, S. Desherces, E. Schmidt, M. Anton and D. Tainturier. 2009. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: preliminary results. *Theriogenology*, 71: 1209-1214.
- Balestri, F., M. Gianneccchini, F. Sgarrella, M.C. Carta, M.G. Tozzi and M. Camici. 2007. Purine and pyrimidine nucleosides preserve human astrocytoma cell adenylate energy charge under ischemic conditions. *Neurochemistry International*, 50: 517-523.
- Firestone, R.S., N. Esfandiari, S.I. Moskovtsev, E. Burstein, G.T. Videna, C. Librach, Y. Bentov and R.F. Casper. 2012. The effects of low-level laser light exposure on sperm motion characteristics and DNA damage. *Journal of Andrology*, 33(3): 469-73.
- Frenzilli, G., M. Bernardeschi and R. Barale. 2014. Alkaline versus neutral version of Comet assay in human leukocytes using 9 compounds. *Journal of Translational Toxicology*, 1(1): 60-71.
- Holt, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 3-22.
- Khoramzadeh, L., S. Tabatabaei Vakili, M. Mamouei, J. Fayazi and M. Zarei. 2019. Effect of different levels of vitamin C and Zinc on sperm quality characteristics of Arabi ram. *Research on Animal Production*, 10(23): 92-99 (In Persian).
- Lubart, R., H. Friedmann, T. Levinshal, R. Lavie and H. Breitbart. 1992. Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. *J Photochem Photobiol B*, 15(4): 337-41.
- Lubart, R., H. Friedmann, M. Sinyakov, N. Cohen and H. Breitbart. 1997. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine*, 21(5): 493-9.
- Mattson, M.P. 2008. Hormesis Defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1): 1-7.
- Ocana-querro, J.M. and R. Gomez-Villamandos. 1997. Biological effects of helium-neon laser irradiation on acrosome reaction in bull sperm cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 40: 294-298.
- Olive P.L. and J.P. Banath. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1: 23-9.
- Pinho, R.A., M.E. Andrades, M.R. Oliveira, A.C. Pirola, M.S. Zago, P.C. Silveira, F. Dal-Pizzol and J.C. Moreira. 2006. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biology International*, 30(10): 848-853.
- Satish Kumar, A., K. Zaheer, D. Upadhy, G. Kalthur and P. Kumar. 2009. Ability of deoxyribonucleic acid-damaged sperm to withstand freeze-thaw-induced damage during cryopreservation. *Fertility and Sterility*, 92(3): 959-63.
- Shawrang, P., M. Mortaheb, M. Behgar, F. Motamedi-sede and H. Askari. 2018. Application of Gamma irradiation for eliminating bacterial contamination of bovine colostrums. *Research on Animal Production*, 9(19): 26-31 (In Persian).
- Tateno, H., Y. Kamiguchi, M. Shimada and K. Mikamo. 1996. Difference in type of radiation-induced structural chromosome aberrations and their incidences between Chinese and Syrian hamster spermatozoa. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 350: 339-348.

“Short Paper”

Application of Gamma Irradiation to Increase the Motility and Viability of Bovine Sperm after Freezing and Thawing

Parvin Shawrang¹, Maryam Rahbar², Mehdi Behgar³ and Farahnaz Motamedi-Sede⁴

1- Associate Professor, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute,
Atomic Energy Organization of Iran, (Corresponding author: pshawrang@aeoi.org.ir)

2- NDJ Company

3- Assistant Professor, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute,
Atomic Energy Organization of Iran

4- Associate Professor, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute,
Atomic Energy Organization of Iran

Received: April 28, 2019

Accepted: April 22, 2020

Abstract

This study was conducted to determine the suitable dose of gamma rays for increasing sperm motility and viability after thawing and to assess its effects on malondialdehyde concentration and the rate of sperm DNA strand breaks. Sperm samples in liquid nitrogen were irradiated at doses of zero, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 0.9 Gy. The sperm quality and quantity parameters were evaluated before and after irradiation using CASA system. Sperm morphology and viability were evaluated using Eosin-Nigrosin staining. Malondialdehyde concentration was determined based on thiobarbituric acid method and DNA strand breaks analyzed by Comet assay. Data were analyzed based on randomized complete block design by SAS Software. The results showed that irradiation influenced ($P < 0.05$) on motility and viability of sperms. The semen malondialdehyde concentration had no significant differences among treatments ($P > 0.05$). Based on the Comet assay result, DNA strand breaks parameters had no significant differences with the control group, except at dose of 0.9 Gy. The results of this study demonstrated that gamma irradiation at dose of 0.7 Gy could enhance the motility and viability of sperms after thawing without negative effect on semen and sperm quality.

Keywords: Gamma irradiation, Motility, Viability, Bovine sperm