دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"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 مسوول: 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

به‌منظور 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[1] انجام شد. ویژگی‌های مورفولوژیکی و میزان زنده‌مانی پس از رنگ آمیزی با ائوزین- نگروزین مورد مطالعه قرار گرفت. مقدار مالون دی‌آلدهید 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 به‌دست آمده اثر پرتوتابی بر تحرک و زنده‌مانی اسپرم معنی‌دار بود (p< ۰/۰۵). مقدار مالون‌دی‌آلدئید منی در دزهای مختلف پرتو گاما با تیمار شاهد تفاوت نداشت (p>۰/۰۵). طبق نتایج کامت، فراسنجه‌های شکست DNA اسپرم‌های پرتوتابی شده، به‌جز دز ۰/۹ گری گاما با تیمار شاهد تفاوت نداشت (p>۰/۰۵). باتوجه 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 (۵،۶). اگرچه در رقیق‌کننده‌ها از ترکیباتی مثل گلیسرول و برخی از اسید آمینه‌ها (مثل گلوتامین، گلایسین، 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 تک‌رشته‌ای 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 براورد فراسنجه‌های آسیب به DNA شامل %DNA in tail و Tail moment[2] استفاده می‌شود. کامت (Comet) در مشاهدات شامل سر (Head) بعلاوه دم (Tail) است. مقدار moment Tail با استفاده از نرم‌افزار و رابطه زیر محاسبه می‌شود.

Tail moment = Tail length (px) × % 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

1- Computer Assisted Semen Analysis

2- Tail moment = Tail length (px) × % DNA in tail.

استفاده از تکنیک فیلتراسیون نشان دادند که در سلول‌های اسپرمی پرتوتابی شده با لیزر، غلظت یون‌های کلسیم در سیتوپلاسم اسپرماتوزوا افزایش یافته و نقش تنظیم‌کنندگی در کنترل حرکت اسپرم و واکنش اکروزوم دارد. سیستم‌هایی که در اسپرماتوزوا غلظت یون کلسیم درون سلولی را تنظیم می‌کنند شامل میتوکندری، پمپ‌های کلسیم وابسته به انرژی غشایی و کانال‌های کلسیمی است. پرتو لیزر به‌وسیله آنزیم‌های میتوکندریایی جذب می‌شود و با تحریک پورفیرین‌ها و سیتوکروم‌های میتوکندریایی، واکنش‌های احیا را در زنجیره انتقال الکترون فعال می‌کند. این فعال‌سازی می‌تواند سبب تغییراتی در غلظت یون‌های کلسیم در سلول شود (۸).

هدف مطالعه حاضر تعیین دز مناسب پرتوتابی گاما و مطالعه اثرات آن بر کیفیت اسپرم جهت افزایش تحرک و زنده‌مانی اسپرم گاو پس از یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها

پرتوتابی نمونه‌های اسپرم: تعداد ۳۰ پایوت ۰/۵ میلی‌لیتری حاوی اسپرم منجمد از شرکت نهاده‌های دامی جاهد تهیه شد و در دمای ۱۹۶- درجه سلسیوس نیتروژن مایع جهت پرتوتابی گاما به گروه پژوهشی دزیمتری و مونیتورینگ پرتوها (پژوهشکده کاربرد پرتوها؛ پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای؛ 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 نمونه‌های 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 ۳۰۲/۵۶ گری بر ساعت در آب در SSD=80[1] و اندازه میدانی ۱۰×۱۰ سانتی‌متر مربع انجام شد. تعداد تکرار برای هر دز شامل ۵ پایوت بود. پایوت‌های 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 یخ‌گشایی:

برای ارزیابی کیفیت اسپرم پرتوتابی شده و مقایسه آن با نمونه پرتوتابی نشده از نظر تحرک و زنده‌مانی، پایوت‌های اسپرم در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه یخ‌گشایی شدند. آنالیز کمی و کیفی اسپرم شامل تعیین غلظت، درصد اسپرم‌های دارای تحرک، حرکت پیش رونده[2]، حرکت دایره‌وار، حرکت سریع، حرکت آهسته، حرکت درجا و عدم تحرک قبل و بعد از پرتوتابی با استفاده از سامانه کاسا[3] انجام شد. برای این منظور ۴ مایکرولیتر از اسپرم یخ‌گشایی شده روی یک لام از قبل گرم شده گذاشته شد و با یک لامل پوشانده شد و سه مشاهده از سه مکان مختلف به‌عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شد.

تعیین ویژگی‌های مورفولوژیکی و میزان زنده‌مانی اسپرم: برای تعیین میزان زنده‌مانی اسپرم ۲۰ میکرولیتر نمونه منجمد-یخ‌گشایی شده را روی اسلایدی که قبلاً گرم شده بود قرار داده و با ۱۰۰ میکرولیتر ترکیب رنگ‌آمیزی سوپراویتال (۱ درصد (W/V) ائوزین B، ۵ درصد (W/V) نیگروزین 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 × ۴۰۰) بررسی شد. ۲۰۰ اسپرم برای سرهای غیر رنگ‌آمیزی شده، اسپرم در حالت زنده و نیز برای سرهای رنگ‌آمیزی شده (به‌طور کامل یا جزئی) اسپرم در حالت مرده، شمارش شد (۲).

پس از رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با ائوزین- نگروزین، وضعیت مورفولوژیکی نمونه‌های اسپرم از نظر درصد اسپرم‌های 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 دی‌آلدهید: برای تعیین مقدار مالون دی‌آلدهید از روش تیوباربیتوریک اسید استفاده شد (۱۲). در این روش یک مولکول تیوباربیتوریک اسید با دو مولکول مالون دی‌آلدهید واکنش داده و رنگ صورتی نمایان می‌شود.

محلول‌های مورد نیاز در این تست شامل محلول ۰/۶۷ درصد تیوباربیتوریک اسید، محلول ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید، BHT (Butylated hydroxytoluene) و EDTA است. برای تهیه محلول ۰/۶۷ درصد تیوباربیتوریک اسید ابتدا مقدار ۰/۱۳۴ گرم تیوباربیتوریک اسید در ۲۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر ریخته و برای ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد 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 میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد.

برای تهیه محلول BHT مقدار ۰/۲ گرم BHT در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول حل شد و برای تهیه محلول EDTA از ۰/۳۷ گرم EDTA در ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر استفاده شد.

برای اندازه‌گیری مقدار مالون دی‌آلدهید ابتدا نمونه‌ها رقیق شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه با ۰/۵ میلی‌لیتر EDTA ، ۰/۵ میلی‌لیتر BHT و ۱ میلی‌لیتر TCA به هر فالکون اضافه شد. لوله‌های فالکون در g× ۹۳۶ برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس در لوله‌های آزمایش درب دار به ۱ میلی‌لیتر از محلول بالای فالکون ۲ میلی‌لیتر TBA اضافه شد. لوله‌ها به‌مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از خنک شدن با استفاده از اسپکتروفتومتر جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از منحنی استاندارد و با توجه به مقادیر جذب نوری، غلظت مالون دی‌آلدهید (نانومول در میلی‌لیتر منی) محاسبه شد. رسم نمودار استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف مالون‌دی‌آلدئید 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 محلول‌های مورد نیاز تهیه سپس پوشش‌دار کردن لام با آگارز انجام شد. محلول‌های مورد استفاده شامل محلول

1- Source Sample Distance
2- Progressive motility
3- CASA: Computer Assisted Semen Analysis (12500/0000 AndroVision® Modul Concentration & Motility)

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

برای تهیه محلول استوک لایزیس بافر ۱۴۶/۱۹ گرم NaCl، ۳۷/۲۴ گرم EDTA و ۱/۲۵ 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[1] 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، ۱/۴۴ گرم Na_2HPO_4، ۰/۲۴ 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 ۰/۸درصد 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 به‌صورت 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 این‌منظور نمونه‌های اسپرم سانتریفیوژ و پس از تخلیه سوپرناتانت با PBS ۵۰۰ µl رقیق‌سازی شده و این سوسپانسیون سلولی به نسبت ۱:۵ (۳۰µl:۱۵۰µl) 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 به‌مدت 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/cm۰/۶ و ۱۲ میلی‌آمپر به‌مدت یک ساعت الکتروفورز شد.

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

پس از مرحله خنثی‌سازی هر ژل (لامل) با محلول رنگ سایبر گرین[2] 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[3] مورد ارزیابی قرار گرفت (۴).

طرح آزمایشی، طرح کاملاً تصادفی و مدل آماری $Yij = \mu + Ti + eij$ بود. در این مدل Yij: مقدار هر مشاهده، µ: میانگین، Ti: اثر تیمار i و eij: 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 به‌دلیل ایجاد تحرک در اسپرم‌های بدون حرکت باشد. پرتوتابی با تغییر پوشش‌های محافظتی و برداشته‌شدن تدریجی آن از سطح اسپرم سبب آشکار شدن کانال‌های کلسیم و محل گیرنده‌ها و در نهایت افزایش تحرک و باروری اسپرم می‌شود (۷).

1- Sodium lauryl sarcosinate
2- CinnaGen DNA Safe Stain, Cat. No: EP5082
3- Tail moment = Tail length (px) × % 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	حرکت پیشرونده	حرکت دایره‌وار	حرکت سریع	حرکت آهسته	حرکت درجا	عدم تحرک
شاهد (قبل از رتوتابی)	۳۹/۸	۷۰/۲۱^{C}	۶۴/۷۶	۱/۸۱^{D}	۵۷/۷۸	۵/۱۴^{C}	۵/۴۵^{d}	۲۹/۸^{d}
۰/۱ گری	۳۷/۴	۷۹/۰۶^{aDC}	۶۷/۷۶	۳/۰۶^{aD}	۵۷/۶۷	۷/۰۳^{aD}	۱۱/۲۸^{DC}	۲۰/۹۴^{aDC}
۰/۳ گری	۳۲/۹	۸۲/۱۶^{a}	۶۵/۷۰	۲/۳۲^{D}	۵۵/۵۸	۷/۸۱^{a}	۱۶/۴۸^{a}	۱۷/۸۴^{c}
۰/۵ گری	۳۴/۰	۸۰/۴۸^{aD}	۶۷/۵۴	۴/۱۶^{a}	۵۸/۸۴	۵/۵۶^{DC}	۱۱/۹۲^{aDC}	۱۹/۵۲^{DC}
۰/۷ گری	۳۷/۳	۷۵/۰۴^{aDC}	۶۶/۴۱	۲/۵۱^{D}	۵۷/۹۷	۵/۹۰^{DC}	۸/۶۴^{cd}	۲۴/۹۶^{aDC}
۰/۹ گری	۳۵/۶	۷۹/۶۱^{aD}	۶۴/۸۷	۱/۵۷^{D}	۵۶/۱۹	۷/۰۹^{aD}	۱۴/۷۲^{aD}	۲۰/۳۹^{DC}
اشتباه معیار	۸/۱۱	۹/۲۸۰	۸/۹۲۲	۱/۵۵۳	۸/۶۰۲	۱/۶۱۴	۵/۱۰۱	۹/۲۸۰

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) 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<۰/۰۵). درصد اسپرم‌های بدون سر و دارای سر غیرطبیعی تحت تأثیر پرتوتابی گاما قرار نگرفت و نمونه‌های پرتوتابی شده تفاوتی با تیمار شاهد نداشت (p>۰/۰۵). 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<۰/۰۵).

تغییرات درصد اسپرم‌های طبیعی در نمونه‌های پرتوتابی شده با گاما می‌تواند به‌دلیل اثر پرتو در ایجاد مقاومت در اسپرم‌ها به تغییرات مورفولوژیکی باشد. این پدیده که در دزهای پایین گاما مشاهده می‌شود پدیده هورمسیس[1] نام دارد. تئوری 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).

مطالعه‌ای 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 و 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 آلدهید: مقدار مالون‌دی‌آلدئید در دزهای صفر، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ گری به‌ترتیب ۰/۰۰۴، ۰/۰۰۴، ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۶، ۰/۰۰۴ و ۰/۰۰۵ نانومول در ۱۰۰ میلی‌لیتر بود و تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های پرتوتابی شده و شاهد وجود نداشت (p>۰/۰۵). در دزهای کم پرتوهای یون‌ساز تولید پراکسیدها در محصول پرتوتابی شده کمتر مشاهده شده است. تاتینو و همکاران (۱۵) گزارش کردند که دزهای ۱/۱۰، ۲/۱۵، ۲/۹۵ و ۴/۰۱ گری پرتوهای گاما و دزهای ۰/۹۱، ۱/۸۲ و ۳/۶۳ گری پرتو ایکس تغییری در مقدار پراکسیدهای نمونه‌های اسپرم دو نژاد همستر ایجاد نکرد.

میزان شکست DNA: پرتوتابی گاما با دزهای زیر ۰/۷ گری تأثیری بر درصد اسپرم‌های دارای DNA آسیب دیده نداشت و تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد نداشت (p>۰/۰۵). پرتوتابی با دز ۰/۹ گری گاما سبب افزایش درصد اسپرم‌های دارای DNA آسیب دیده به ۹/۵۶ درصد شد (p<۰/۰۵).

پرتوهای یون‌ساز با ایجاد رادیکال‌های آزاد واکنشگر سبب ایجاد شکست‌های تک‌رشته‌ای و متعاقب آن شکست‌های دو رشته‌ای می‌شود (۱۵). فراسنجه‌های شکست DNA اسپرم در دزهای ۰/۹ گری گاما، ۱/۲ گری ایکس و ۹ ژول بر سانتی‌متر مربع لیزر نسبت به نمونه پرتوتابی نشده افزایش نشان داد. فایستن و همکاران (۳) گزارش کردند که پرتوتابی لیزر با دز ۷ ژول بر سانتی‌متر مربع بدون آسیب DNA، تحرک اسپرم گاو را افزایش داد.

طبق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، برای بهبود تحرک و زنده‌مانی اسپرم بعد از یخ‌گشایی، پرتوتابی با دز ۰/۷ گری گاما مناسب است و دز ۰/۹ گری سبب آسیب DNA می‌شود.

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	بدون‌سر	سر غیرطبیعی	بدنه غیرطبیعی	دم غیرطبیعی	قطره سیتوپلاسمیک پروکسیمال	قطره سیتوپلاسمیک دیستال	زنده‌مانی
شاهد (قبل از پرتوتابی)	۸۴/۸^{D}	۱/۶	۱/۰	۵/۴^{DC}	۴/۶^{aD}	۲/۰	۰/۶	۸۱/۲^{D}
۰/۱	۸۳/۸^{D}	۱/۰	۱/۰	۷/۶^{aD}	۳/۲^{aD}	۲/۰	۱/۴	۸۳/۴^{aD}
۰/۳	۸۳/۲^{D}	۲/۶	۱/۲	۶/۶^{aD}	۴/۰^{aD}	۱/۲	۱/۲	۸۲/۸^{D}
۰/۵	۸۱/۶^{D}	۲/۰	۰/۲	۱۱/۶^{a}	۳/۶^{aD}	۰/۴	۰/۶	۸۴/۶^{aD}
۰/۷	۸۷/۶^{aD}	۱/۲	۱/۴	۳/۲^{DC}	۲/۲^{D}	۲/۲	۲/۲	۸۶/۱^{a}
۰/۹	۹۳/۲^{a}	۱/۰	۱/۰	۱/۲^{C}	۱/۶^{D}	۱/۲	۰/۸	۸۲/۷^{aD}
اشتباه معیار	۵/۴۵	۱/۸۵	۱/۲۴	۳/۶۹	۳/۵۰	۱/۸۰	۱/۶۳	۴/۳۷

عدم درج حروف در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار (p>۰/۰۵) و حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشد

1- Hormesis theory

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)

	کامت مشاهده شده (درصد)	٪DNA in Tail	Tail Moment[1]
شاهد (قبل از پرتوتابی)	۲/۸۶[b]	۳/۱۱[b]	۲/۱۴[b]
۰/۱	۲/۶۰[D]	۲/۸۴[D]	۲/۱۰[D]
۰/۳	۳/۲۰[D]	۹/۱۸[D]	۷/۷۲[D]
۰/۵	۶/۹۵[aD]	۱۰/۳۲[D]	۹/۷۱[D]
۰/۷	۸/۴۲[aD]	۱۳/۲۸[aD]	۱۲/۵۹[aD]
۰/۹	۹/۵۶[a]	۱۹/۰۸[a]	۱۷/۳۶[a]
اشتباه معیار	۶/۳۵۷	۸/۹۵۲	۷/۶۸۴

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) است.

منابع

1. 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.
2. Balestri, F., M. Giannecchini, 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.
3. 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.
4. 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.
5. Holt, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science, 62: 3-22.
6. 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).
7. 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.
8. 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.
9. Mattson, M.P. 2008. Hormesis Defined. Ageing Research Reviews, 7(1): 1-7.
10. Ocana-quero, 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.
11. 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.
12. 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.
13. Satish Kumar, A., K. Zaheer, D. Upadhya, 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.
14. 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).
15. Tateno, H., Y. Kamiguchi, M. Shimada and K. Mikamo.1996. Difference intype of radiation-induced structural choromosome aberrations and theirincidences between Chinese and Syrian hamster spermatozoa. MutationRasearch /Funndamental 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 Shawrang[1], Maryam Rahbar[2], Mehdi Behgar[3] and Farahnaz Motamedi-Sede[4]

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