بررسی رابطه بین میزان تحرک و رنگ‌آمیزی حیاتی با واکنش اسپرم‌های منجمد گاوی به آزمایش هیپواسموتیک

حامد مهدیون[۱]، قدرت‌الله محمدی[۲*]، سعد گورانی‌نژاد[۳] و غلامحسین خواجه[۴]

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۶

خلاصه

ارزیابی اسپرم‌های منجمد گاوی به منظور ارزیابی میزان باروری اسپرم‌ها از ارزش بالایی برخوردار است. هدف از این مطالعه بررسی رابطه بین میزان تحرک و میزان واکنش اسپرم‌ها به رنگ‌آمیزی حیاتی با میزان واکنش اسپرم‌های منجمد به محلول‌های رقیق شده هیپواسمول و یافتن بهترین رقت محلول هیپواسمول برای ارزیابی غشاء پلاسمایی اسپرم‌های منجمد گاوی است. در این مطالعه ضمن بررسی میزان تحرک اسپرم‌ها و تعداد اسپرم‌های زنده از آب مقطر و محلول‌های دکستروز- نمکی و نمکی با رقت‌های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌اسمول به منظور ارزیابی غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها استفاده گردید. برای این آزمایش، تعداد ۳۰ عدد پایوت اسپرم منجمد گاو نژاد هلشتاین خریداری و آزمایش‌های رنگ‌آمیزی ساختاری جوهر هندی، رنگ‌آمیزی حیاتی، میزان تحرک و آزمایش تورم هیپواسموتیک روی آنها انجام گردید. نتایج حاصله نشان می‌دهد که میزان نسبت اسپرم‌های منجمد واکنش داده به آب مقطر اختلاف معنی‌داری با رقت‌های دیگر داشت و تفاوت معنی‌داری بین نسبت اسپرم‌های واکنش داده به محلول‌های رقیق شده و محلول‌های ایزو اسمول ۳۰۰ میلی‌اسمول مشاهده گردید. اما اختلاف معنی‌داری بین محلول‌های رقیق شده مشاهده نشد، اما نسبت اسپرم‌های واکنش داده به محلول دکستروز- نمکی رقیق شده ۵۰ میلی‌اسمول از دیگر محلول‌های رقیق شده بیشتر بود. بنابراین برای بررسی وضعیت غشاء پلاسمایی اسپرم‌های منجمد می‌توان از آب مقطر و از محلول رقیق شده ۵۰ میلی‌اسمول دکستروز- نمکی استفاده نمود. همچنین نتایج نشان می‌دهد که ارتباط مثبت و معنی‌داری بین درصد تحرک و میزان پاسخ اسپرم‌ها به محلول‌های هیپواسمول وجود دارد اما ارتباط معنی‌داری بین تعداد اسپرم‌های زنده و تعداد اسپرم‌های واکنش داده به محلول‌های هیپواسمول وجود ندارد بنابراین می‌توان بیان داشت که آزمایش های تعیین درصد تحرک و هیپواسموتیک برای ارزیابی اسپرم‌های منجمد ارزشمند می‌باشند.

کلمات کلیدی: اسپرم‌های منجمد گاوی، آزمایش تورم هیپواسموتیک، تحرک، رنگ‌آمیزی حیاتی

مقدمه

آزمایش تورم هیپواسموتیک به منظور ارزیابی و پیش‌بینی میزان باروری اسپرم‌ها استفاده می‌گردد. بررسی‌ها نشان می‌دهند که پس از آزمایش تحرک، آزمایش تورم هیپواسموتیک یکی از بهترین روش‌های ارزیابی و پیش‌بینی میزان باروری اسپرم‌های زنده است (Nagy et al. 1999). این آزمایش در ابتدا برای ارزیابی وضعیت غشاء پلاسمایی اسپرم‌های انسان استفاده گردید (Jeyendran et al. 1984) اما پس از آن برای ارزیابی میزان نفوذ اسپرم‌های انسان به داخل تخمک فاقد زوناپلوسیدا استفاده شد. امروزه از این آزمایش به منظور ارزیابی سلامت دم و تحرک اسپرم‌ها در حیوانات اهلی نیز استفاده می‌گردد. با توجه به کیفیت و دقت بالای آزمایش تورم هیپواسموتیک، امروزه این روش به یکی از مهمترین شاخص‌های ارزیابی اسپرم‌ها تبدیل شده است.

[۱] دانش‌آموخته دکتری‌عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران، اهواز
[۲*] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز E-mail: Ghmohammadi9@yahoo.com (نویسنده مسئول)
[۳] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز
[۴] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز

برای انجام این آزمایش از محلول‌های هیپواسمول مختلفی با رقت‌های متفاوت استفاده می‌گردد (Martinez 2004) و اغلب تعیین نوع محلول هیپواسمول با آزمایش‌های مکرر به دست می‌آید و در گونه‌های مختلف متفاوت است.

یکی از کاربردهای دیگر آزمایش تورم هیپواسموتیک این است که به عنوان مکمل بعضی دیگر از آزمایش‌ها به کار می‌رود. مثلاً در رنگ‌آمیزی حیاتی بعضی از اسپرم‌ها سر بی‌رنگ اما دم رنگی دارند، آزمایش هیپواسموتیک نشان می‌دهد اسپرم‌هایی که در رنگ‌آمیزی حیاتی دم رنگی دارند در این آزمایش دمشان چه وضعیتی دارد اگر دمشان بدون تورم و مستقیم باشد نشان‌دهنده نابارور بودن این اسپرم‌هاست. اما اگر دمشان متورم یا پیچیده باشد نشان‌دهنده سالم بودن غشاء پلاسمایی اسپرم‌هاست (Bahamondes et al. 2001).

آزمایش میکروسکوپی تحرک از مهمترین آزمایش‌های ارزیابی باروری اسپرم‌هاست (Ball and Peter 2004) بنابراین مدت‌های طولانی آزمایش ارزیابی میزان تحرک به عنوان یک آزمایش اصلی برای ارزیابی کیفیت اسپرم‌ها مطرح بود (Kjaestad et al. 2004) اما بعد مشخص گردید با آزمایش بررسی وضعیت غشاء پلاسمایی و تحرک، بهتر می‌توان میزان باروری اسپرم‌ها را ارزیابی نمود (Henkel et al. 1993). با توجه به اینکه غشاء پلاسمایی اسپرم نقش مهمی در فرآیند لقاح دارد، در نتیجه معیوب بودن غشاء پلاسمایی سبب شکست در عمل لقاح تخمک و اسپرم می‌گردد (Jeyendran et al. 1984). بنابراین یکی از بهترین آزمایش‌هایی که به وسیله آن می‌توان وضعیت غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها را انجام داد، آزمایش تورم هیپواسموتیک است (Samardžija et al. 2008). در ابتدا این آزمایش برای ارزیابی اسپرم‌های انسان استفاده گردید (Jeyendran et al. 1984) ولی بعد برای ارزیابی کیفیت اسپرم سگ (Kumi-Diaka 1993). گاو (Samardžija et al. 2008)، قوچ (Watson and Duncan 1988)، خوک (Rodriguez-Gil and Rigau 1996) و نریان (Vidament et al. 1998) انجام گردید. اساس آزمایش تورم هیپواسموتیک بر پایه واکنش غشاء پلاسمایی سلول‌های اسپرم به محلول هیپواسموتیک می‌باشد (Cabrita et al. 1999). در این آزمایش، محلول هیپواسمول از غشاء پلاسمایی اسپرم عبور کرده و سلول سعی می‌کند تا یک توازنی بین فضای داخل سلول و بیرونی برقرار کند. بنابراین دم اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالم و فعال دارند متورم می‌گردد در نتیجه به آنها HOS مثبت می‌گویند ولی اسپرم‌هایی که غشاء پلاسمایی ناسالم دارند متورم نشده و دمشان حالت مستقیم دارد و به آنها HOS منفی اطلاق می‌گردند (Jeyendran et al. 1984). میزان اسمولاریته محلول هیپواسمول باید به قدری باشد تا علاوه بر اینکه باعث تحریک غشاء پلاسمایی گردد، سبب لیز شدن غشاء پلاسمایی اسپرم نشود (Rota et al. 2008).

یکی از روش‌های تعیین تعداد سلول‌های زنده و مرده، استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی است. برای این منظور از رنگ ائوزین B استفاده می‌شود. در رنگ‌آمیزی حیاتی از ترکیب رنگ‌های ائوزین و نگروزین برای تعیین تعداد سلول‌های مرده استفاده می‌شود. اصول رنگ‌آمیزی حیاتی بر اساس رنگ‌های مخصوصی مثل ائوزین B است که به داخل سلول‌های اسپرم مرده نفوذ کرده و آنها را به رنگ قرمز در می‌آورد اما سلول‌های زنده، رنگ مزبور را به‌خود نمی‌گیرند. اما یکی مهمترین عیب‌های رنگ‌آمیزی حیاتی این است که یک آزمایش کیفی است و نتایج آن زمانی ارزشمند است که نتایج حاصل از آن با آزمایش‌های دیگر مانند تحرک و تورم هیپواسموتیک تایید گردد (محمدی و همکاران ۱۹۹۰).

هدف از این آزمایش ارزیابی میزان واکنش اسپرم‌های منجمد به محلول‌های مختلف هیپواسمول و آب مقطر و بررسی میزان ارتباط این آزمایشات با آزمایشات درصد تحرک و میزان زنده بودن اسپرم‌ها است.

مواد و روش کار

تعداد ۳۰ عدد پایوت اسپرم منجمد گاو هلشتاین از شرکت جاهد (کرج، ایران) خریداری گردید. برای انجام آزمایشات پایوت‌های منجمد به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری تا از حالت انجماد خارج شوند (Correa et al. 1997).

آزمایش بررسی ساختار اسپرم‌ها

برای بررسی ساختار اسپرم‌ها ۲۵ میکرولیتر اسپرم ذوب شده را با ۵۰ میکرولیتر جوهر هندی مخلوط و پس از ۶۰ ثانیه تیمار، گسترش تهیه گردید (محمدی و همکاران ۱۹۹۰، Hackett and Macpherson 1965). وضعیت ساختار دم اسپرم‌ها با درشت نمایی ۴۰۰ با استفاده از میکروسکوپ CX31 الیمپوس مشاهده و حداقل ۲۰۰ اسپرم بررسی شدند.

آزمایش تورم هیپواسموتیک

برای انجام این آزمایش از آب مقطر و دو نوع محلول هیپواسمول نمکی و دکستروز- نمکی با رقت‌های مختلف استفاده گردید. از دو نوع محلول نمکی و دکستروز- نمکی با رقت‌های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌اسمول تهیه گردید. ۲۰ میکرولیتر از منی ذوب شده با ۲۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسمول در یک میکروتیوب مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سلسیوس تیمار شدند (Correa and Zavos 1994, Jeyendran et al. 1984). سپس ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از مخلوط‌ها روی یک لام تمیز قرار داده و روی آن یک لامل گذاشته تا هم از خشک شدن سریع گسترش جلوگیری گردد و هم یک لایه نازک از گسترش مرطوب تهیه شود. لام‌ها را با درشت نمایی ۴۰۰ (میکروسکوپ CX31 الیمپوس) مشاهده و وضعیت مورفولوژی حداقل ۲۰۰ اسپرم بررسی و درصد اسپرم‌هایی که به محلول‌های هیپواسمول واکنش داده بودند محاسبه شدند. میزان اسپرم‌های با دم پیچیده که با آزمایش جوهر هندی محاسبه شده بودند از تعداد اسپرم‌هایی که با محلول هیپواسمول واکنش داده و دمشان تغییر حالت داده بود کسر و نسبت هر کدام محاسبه گردید.

آزمایش واکنش آب مقطر

۲۰ میکرولیتر اسپرم ذوب شده به ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر در یک میکروتیوب مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سلسیوس تیمار گردیدند (Lomeo and Giambérsio 1991). حداقل ۲۰۰ اسپرم بررسی و وضعیت غشاء پلاسمایی و واکنش اسپرم‌ها به آب مقطر نیز مانند حالت قبل بررسی گردید.

آزمایش تحرک

برای انجام این آزمایش، ۵۰ میکرولیتر اسپرم منجمد ذوب شده را با ۵۰ میکرولیتر سرم نمکی نرمال ۳۷ درجه سلسیوس درون یک میکروتیوب مخلوط کرده و پس از ۵ دقیقه تیمار، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط را روی لام ۳۷ درجه سلسیوس، گذاشته و روی آن یک لامل قرار داده سپس با درشت نمایی ۴۰۰ (میکروسکوپ CX31 الیمپوس)، درصد تحرک اسپرم‌ها بررسی گردید (محمدی و همکاران ۱۹۹۰).

آزمایش رنگ‌آمیزی حیاتی

در این آزمایش با استفاده از روش محمدی و همکاران در سال ۱۳۹۰ آزمایش رنگ‌آمیزی حیاتی انجام گردید. بدین منظور ۳۰ میکرولیتر مخلوط رنگ ائوزین-نگروزین را به درون یک میکروتیوب ریخته و به بن ماری ۳۷ درجه سلسیوس منتقل گردید سپس ۲۰ میکرولیتر اسپرم منجمد ذوب شده به آن اضافه شده و پس از ۶۰ ثانیه تیمار، از مخلوط حاصله ۱۰ میکرولیتر برداشته روی یک لام تمیز قرار داده گسترش تهیه و فوری خشک گردید (محمدی و همکاران ۱۹۹۰).

آنالیز آماری

نتایج حاصل از آزمایش‌های هیپواسموتیک با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست LSD با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 ارزیابی گردیدند. میزان ارتباط بین آزمایشات مختلف هم با استفاده آزمایش همبستگی پیرسون با سطح معنی‌دار (P<۰/۰۵) ارزیابی گردیدند.

نتایج

خلاصه نتایج حاصل از این مطالعه در جدول‌های ۱ و ۲ بیان گردیده است. بر اساس نتایج حاصله، نسبت اسپرم‌های واکنش داده به محلول‌های مختلف متفاوت است و بیشترین نسبت واکنش در آب مقطر مشاهده گردید (جدول ۱). در آب مقطر درصد اسپرم‌های متورم ۹/۱۵±۳۷/۸۷ با گستره ۱۶ تا ۵۶. میزان واکنش اسپرم‌ها به آب مقطر به طور معنی‌داری با سایر محلول‌های هیپواسمول و ایزواسمول تفاوت داشت (P<۰/۰۵).

میزان واکنش اسپرم‌ها به محلول‌های هیپواسمول محلول‌های دکستروز- نمکی و نمکی در رقت‌های مختلف ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌اسمول تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (p>۰/۰۵). اما تفاوت معنی‌داری بین نسبت واکنش اسپرم‌ها به محلول‌های هیپواسمول با محلول‌های ایزواسمول ۳۰۰ میلی‌اسمول مشاهده گردید (P<۰/۰۵).

درصد اسپرم‌های واکنش داده در محلول‌های رقت ۵۰ میلی‌اسمول به ترتیب ۶/۸۶±۳۰/۱۸ برای دکستروز- نمکی، ۵/۶۷±۲۵/۱۸ برای محلول نمکی، رقت ۷۵ میلی‌اسمول دکستروز- نمکی و نمکی به ترتیب ۵/۶۷±۲۸/۵۹ و ۶/۶۸±۲۶/۵۳، برای محلول‌های ۱۰۰ دکستروز- نمکی و نمکی به ترتیب ۸/۹۴±۲۸/۱۲ و ۸/۴۱±۲۸/۲۳ و محلول ایزواسمول ۳۰۰ میلی‌اسمول دکستروز- نمکی و نمکی به ترتیب ۱/۲۲±۵/۸ و ۱/۴۹±۵/۳۰ مشاهده گردید.

جدول ۱: اثرات محلول‌های مختلف با فشار اسمزی متفاوت بر روی غشای پلاسمایی اسپرم‌های منجمد

نسبت اسپرم‌های متورم (درصد)	نوع محلول	میزان فشار اسمزی (mOsm/L)
۹/۱۵±۳۷/۸۷	آب مقطر [a]	۰
۶/۸۶±۳۰/۱۸	دکستروز- نمکی [b]	۵۰
۵/۶۷±۲۵/۱۸	نمکی [b]	
۷/۸۳±۲۸/۵۹	دکستروز- نمکی [b]	۷۵
۶/۶۸±۲۶/۵۳	نمکی [b]	
۸/۹۴±۲۸/۱۲	دکستروز- نمکی [b]	۱۰۰
۸/۴۱±۲۸/۲۳	نمکی [b]	
۱/۲۲±۵/۸	دکستروز- نمکی [c]	۳۰۰
۱/۴۹±۵/۳۰	نمکی [c]	

حروف مشابه در ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است (P>۰/۰۵).

نتایج حاصله نشان می‌دهد که نسبت واکنش اسپرم‌ها به محلول دکستروز- نمکی با فشار اسمزی ۵۰ میلی‌اسمول با گستره ۲۶/۶۵ تا ۳۳/۷۱ بیشتر از سایر محلول‌های رقیق شده بود اما با آنها تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). نتایج نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین محلول‌های رقیق شده دکستروز- نمکی و نمکی مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). میزان تحرک اسپرم‌های منجمد ذوب شده ۲۴/۵ درصد در حالی که میزان اسپرم‌های زنده در رنگ‌آمیزی حیاتی ۲۷/۳ درصد به دست آمد.

بررسی آماری نشان می‌دهد که یک همبستگی مثبت معنی‌داری بین درصد تحرک با تعداد اسپرم‌های واکنش داده به محلول‌های هیپو اسمول (P<۰/۰۵) وجود دارد اما ارتباط معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های زنده در رنگ‌آمیزی حیاتی با تعداد اسپرم‌های واکنش داده به محلول‌های هیپو اسمول مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

جدول ۲: بررسی میزان ارتباط بین تحرک و اسپرم‌های زنده با محلول‌های هیپواسمول

محلول هیپو اسمول	تحرک	اسپرم‌های زنده
آب مقطر	۰/۷۸۸ *	۰/۳۲۳
دکستروز–نمکی ۵۰ میلی‌اسمول	۰/۷۶۶ *	۰/۲۷۶
نمکی ۵۰ میلی‌اسمول	۰/۷۲۳ *	۰/۱۸۶
دکستروز–نمکی ۷۵ میلی‌اسمول	۰/۷۳۵ *	۰/۱۳۵
نمکی ۷۵ میلی‌اسمول	۰/۷۱۵ *	۰/۱۴۵
دکستروز–نمکی ۱۰۰ میلی‌اسمول	۰/۶۹۵ *	۰/۱۳۳
نمکی ۱۰۰ میلی‌اسمول	۰/۶۹۴ *	۰/۱۱۴
دکستروز– نمکی ۳۰۰ میلی‌اسمول	۰/۱۹۳	۰/۰۸۹
نمکی ۳۰۰ میلی‌اسمول	۰/۱۸۸	۰/۰۷۹

* بیانگر وجود ارتباط مثبت معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵).

بحث

با توجه به اینکه در طی روند انجماد و ذوب شدن احتمال آسیب دیدن غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها زیاد است و وجود غشاء پلاسمایی سالم، خصوصاً در ناحیه آکروزوم برای انجام لقاح ضروری است، بنابراین انجام آزمایش واکنش تورم هیپواسموتیک روی اسپرم‌های منجمد لازم است (Januskauskas and Zilinskas 2002).

بررسی‌ها نشان می‌دهند که آزمایش تورم هیپواسموتیک یکی از بهترین آزمایش‌ها برای بررسی غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها خصوصاً اسپرم‌های منجمد است (Correa et al. 1997).

بر اساس نتایج به دست آمده در مورد واکنش اسپرم‌های انسان به آزمایش واکنش تورم هیپواسموتیک، آزمایش تورم هیپواسموتیک نسبت به دیگر آزمایش‌ها مانند تحرک، تعداد اسپرم و پارامترهای مروفولوژیکی می‌تواند بهتر وضعیت باروری اسپرم‌ها را بیان کند اما این حالت باید در مورد دام‌ها نیز بررسی گردد. با این حال آزمایش تورم هیپواسموتیک با اینکه آزمایشی ساده و ارزان می‌باشد اما نتایج آن زمانی ارزشمند است که به همراه دیگر آزمایش‌های آنالیز اسپرم انجام گیرد (Correa and Zavos 1994).

در طی انجماد و ذوب شدن اسپرم‌ها اغلب غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها آسیب می‌بیند بنابراین ارزیابی غشاء پلاسمایی و یافتن محلولی مناسب برای ارزیابی غشاء پلاسمایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مطالعات پیشین و این مطالعه بیان می‌دارند که آزمایش تورم هیپواسمول از بهترین آزمایشات برای ارزیابی غشاء پلاسمایی اسپرم‌هاست. بر این اساس اسپرم‌ها وقتی در مجاورت محیط هیپواسمول قرار می‌گیرند استرسی ناشی از ورود مقدار زیادی آب به آنها وارد شده و در نتیجه متورم و افزایش حجم می‌دهند (Zavous 1990). غشاء پلاسمایی که در ناحیه دم است نسبت به غشاء پلاسمایی ناحیه سر سست‌تر به فیبرهای دم چسبیده است بنابراین بهتر به محلول هیپواسمول واکنش نشان می‌دهد بنابراین با توجه به نظر Jeyendran و همکاران در سال ۱۹۸۴ دم‌های واکنش داده می‌تواند نشان‌دهنده سلامت غشاء ناحیه سر نیز باشد.

با این حال اسپرم‌ها طی انجماد و ذوب شدن دچار تغییراتی در کانال‌های یونی، پارگی غشاء پلاسمایی و از دست دادن مقدار زیادی از پروتئین‌های غشایی می‌گردند. بنابراین ممکن است با توجه به نوع رقیق کننده، میزان گلیسرول و شرایط نگهداری، میزان پاسخ اسپرم‌ها به محیط‌های مختلف، متفاوت باشد (Quintela et al. 2010). در این مطالعه، میزان واکنش اسپرم‌های منجمد گاوی به محلول‌های مختلف و با رقت‌های مختلف ارزیابی گردید.

در این مطالعه از آب مقطر و محلول‌های مختلف دکستروز– نمکی، نمکی با رقت‌های مختلف برای ارزیابی اسپرم‌های منجمد استفاده گردید. واکنش اسپرم‌ها به محلول‌های مختلف و رقت‌های مختلف متفاوت بود. میزان واکنش اسپرم‌های منجمد گاوی به آب مقطر بیشتر از محلول‌های رقیق شده بود. اختلاف در واکنش اسپرم‌های منجمد به محلول ایزواسمول با آب مقطر و محلول‌های رقیق شده نیز معنی‌دار بود اما اختلاف میزان واکنش اسپرم‌ها در محلول‌های رقیق شده معنی‌دار نبود و

اختلاف بین محلول‌های رقیق شده دکستروز- نمکی با نمکی نیز معنی‌دار نبود با این حال نسبت واکنش اسپرم‌ها به محلول دکستروز- نمکی با فشار اسمزی ۵۰ میلی‌اسمول بیشتر از بقیه بود.

در مطالعه Correa و Zavos در سال ۱۹۹۴ نسبت واکنش اسپرم‌های منجمد گاوی واکنش داده به محلول رقیق شده با رقت ۱۰۰ میلی‌اسمول بیشتر از رقت‌های ۵۰، ۷۵، ۱۲۵، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌اسمول بود. اما در این مطالعه از آب مقطر استفاده نشده بود. مطالعات Rota و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان می‌دهد که مناسب‌ترین محلول برای آزمایش تورم هیپواسموتیک اسپرم‌های گاو، محلول فروکتوز-سیترات سدیم ۱۰۰میلی‌اسمول می‌باشد.

بر اساس مطالعه Tsai و همکاران در سال ۱۹۹۷ محیط مناسب برای آزمایش واکنش تورم هیپواسموتیک اسپرم‌های انسان استفاده از محلول ۱۵۰ میلی‌اسمول نمکی است. اما بر اساس مطالعه Bahamondes و همکاران در سال ۲۰۰۱ تفاوت معنی‌داری بین استفاده از محلول ۱۵۰ میلی‌اسمول فروکتوز-سیترات سدیم و آب مقطر مشاهده نگردید.

آزمایشات انجام گرفته روی منی تازه و منجمد سگ‌ها نشان می‌دهد که میزان نسبت واکنش اسپرم‌های تازه به آب مقطر بیشتر از محلول فروکتوز ۶۰ میلی‌اسمول می‌باشد (Quintela et al. 2010).

آزمایشات انجام گرفته روی اسپرم‌های منجمد گاومیش نشان می‌دهد که از میان محلول ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌اسمول سیترات سدیم و فروکتوز، میزان واکنش اسپرم‌ها به محیط ۵۰ میلی‌اسمول بیشتر از سایر محیط‌ها مشاهده گردید (Romitto et al. 2010).

مطالعات انجام گرفته روی اسپرم‌های نریان با استفاده از محلول‌های فروکتوز، ساکارز و سیترات سدیم و با رقت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌اسمول نشان می‌دهد که محیط مناسب برای انجام آزمایش تورم هیپواسموتیک برای ارزیابی اسپرم‌های نریان، محلول ۱۰۰ میلی‌اسمول فروکتوز می‌باشد (Eshleman and Pinto 2010, Mansour 2009, Nie and Wenzel 2001).

در مطالعه Neild و همکاران در سال ۱۹۹۹ مشاهده گردید که محیط مناسب برای انجام آزمایش تورم هیپو اسموتیک روی اسپرم‌های تازه و منجمد نریان استفاده از محلول‌های فروکتوز، ساکارز و لاکتوز با رقت‌های ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ میلی‌اسمول است.

بر اساس آزمایش‌هایی که روی اسپرم‌های بز انجام گردید از محلول‌های سیترات سدیم و فروکتوز با رقت‌های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰، ۲۵۰، ۲۹۰ و ۳۰۰ میلی‌اسمول انجام گردید و محیط مناسب برای ارزیابی اسپرم‌های تازه بز با استفاده از آزمایش تورم هیپواسموتیک ۱۲۵میلی‌اسمول سیترات سدیم و فروکتوز است (Fonseca 2005).

با توجه به مطالعه حاضر، نتایج به دست آمده در این مطالعه با نتایج حاصل از آزمایش‌های Rota و همکاران در سال ۲۰۰۰ و Correa و Zavos در سال ۱۹۹۴ متفاوت بود که علت آن می‌تواند تفاوت در نوع رقیق کننده، میزان گلیسرول و شرایط نگهداری باشد.

در این مطالعه میزان واکنش اسپرم‌ها به آب مقطر بیشتر از محلول‌های رقیق شده مشاهده گردید. بنابراین نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات Quintela و همکاران در سال ۲۰۱۰ هم‌خوانی دارد. در این حالت اسپرم‌ها به آب مقطر نسبت به محلول‌های رقیق شده واکنش بیشتری نشان می‌دهد.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، میزان واکنش اسپرم‌ها به محیط قندی بیشتر از محیط‌های نمکی مشاهده گردید که با نتایج حاصل از مطالعات Neild و همکاران در سال ۱۹۹۹، Nei و Wenzel در سال ۲۰۰۱، Mansour در سال ۲۰۰۹، Eshleman و Pinto در سال ۲۰۱۰ هم‌خوانی دارد. علت تفاوت اختلاف در میزان پاسخ اسپرم‌ها به محیط قندی نسبت به نمکی ممکن است ناشی از تفاوت میزان انتقال آب از غشاء پلاسمایی باشد (Neild et al. 1999).

بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر یک همبستگی مثبت معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های واکنش داده به آزمایش تورم هیپواسموتیک و درصد تحرک اسپرم‌ها مشاهده گردید (P<۰/۰۵) که نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج حاصل از مطالعات Samardzija و همکاران در سال ۲۰۰۹، Nur و همکاران در سال ۲۰۰۵ و Zavous در سال ۱۹۹۴ هم‌خوانی دارد. اما ارتباط معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های واکنش داده به محلول هیپواسمول با رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین نگروزین مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) و نتایج حاصل از این تحقیق مشابه نتایج حاصل از مطالعات Zavous در سال ۱۹۹۴ و Bahamondes و همکاران در سال ۲۰۰۱ می‌باشد.

بر اساس این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که از آب مقطر و محلول‌های مختلف رقیق کننده ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌اسمول می‌توان برای ارزیابی غشاء پلاسمایی اسپرم‌های منجمد گاوی استفاده کرد و آب مقطر می‌تواند جایگزین بهتری برای محلول‌های مختلف رقیق شده باشد.

ارزیابی غشاء پلاسمایی با استفاده آزمایش تورم هیپواسموتیک یکی از مهمترین روش‌های ارزیابی توانایی باروری اسپرم‌ها می‌باشد (Vazquez et al. 1997, Zavous 1990) و چون بر اساس مطالعات متعدد ارتباط مثبت و معنی‌داری بین درصد تحرک و درصد اسپرم‌های واکنش داده به محلول‌های هیپواسمول وجود دارد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که می‌توان از ترکیب آزمایش‌های تحرک و هیپواسموتیک برای ارزیابی اسپرم‌های منجمد گاوی استفاده نمود. همچنین چون رنگ‌آمیزی حیاتی یک آزمایش کیفی است و بستگی به عوامل متعددی مثل شرایط محیطی دارد و نتایج آن زمانی ارزشمندتر خواهد بود که به وسیله دیگر آزمایش‌های مانند تحرک و یا تورم هیپواسموتیک تایید گردد (محمدی و همکاران ۱۹۹۰) به نظر می‌رسد که این آزمایش به تنهایی نمی‌تواند برای ارزیابی اسپرم‌های منجمد ذوب شده گاوی مناسب باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه از محل اعتبار پژوهانه اختصاص یافته از طرف معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گردیده است بدینوسیله مراتب تشکر خود را اعلام می‌دارد.

منابع

محمدی قدرت‌الله، مهدیون حامد، گورانی‌نژاد سعد، خواجه غلامحسین و مشکورزاده محمد (۱۹۹۰). بهینه‌سازی آزمایشات ارزیابی اسپرم‌های منجمد گاو. مجله دامپزشکی و آزمایشگاه، ۳(۲)، ۱۳۵-۱۴۶.

Bahamondes L., Fazano F., de Lucio M.A., Neves P.A., Bottcher Luiz F. and Lorenzetti G.B. (2001). Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the hypoosmotic test. Andrologia 33: 75-77.

Ball P.J.H. and Peter A.R. (2004) Reproduction in Cattle. Third ed. Blackwell Publishing, UK.

Brito L.F.C., Silva A.E.D.F., Rodrigues L.H., Vieira F.V., Deragon L.A.G. and Kastelic J.P. (2002). Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. Theriogenology 58, 1175-1176.

Cabrita E., Alvarez R., Anel E. and Herraez M.P. (1999). The hypoosmotic sweelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. Animal Reproduction Science, 55:279-287.

Correa J.R. and Zavos P.M. (1994). The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. Theriogenology 42:351-360.

Correa J.R., Pace M.M. and Zavos P.M. (1997). Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility. Theriogenology, 48: 721-731.

Eshleman K.C. and Pinto C.R.F. (2010). Simplifying the determination of sperm membrane integrity in stallions with the hypoosmotic swelling test. Animal Reproduction Science 121, 203–204.

Fonseca J.F., Torres C.A.A., Maffili V.V., Borges A.M., Santos A.D.F., Rodrigues M.T. et al. (2005). The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. Animal Reproduction, 2(2):139-144.

Hackett A.J. and Macpherson J.W. (1965). Some staining procedures for spermatozoa: A review. The Canadian Veterinary Journal, 6(3): 55-62.

Henkel R., Muller C., Miska W., Gips H. and Schill W.B. (1993). Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization *in vitro*. Human Reproductio, 8:2128-2132.

Januskauskas A. and Zilinskas H. (2002). Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. Veterinaija ir zootechnika, 17(39): 17-25.

Jeyendran R.S., Van Der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G. and Zaneveld L.J.D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. Journal of Reproduction Fertility, 70:219-228.

Kjaestad H., Ropstad E. and Andersen Berg K. (1993). Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. Acta Veterinary Scandinavy, 34:299-303.

Kumi-Diaka J. (1993). Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. Theriogenology, 39:1279-1289.

Lomeo A.M. and Giambérsio A.M. (1991). Water-test: a simple method to assess sperm-membrane integrity. International Journal of Andrology, 14:278-282.

Mansour M.M. (2009). Modification of Hypo-Osmotic Swelling Test to Evaluate the Integrity of Stallion Sperm Plasma Membrane. Global Veterinaria, 3 (4):302-307.

Martinez A.I.P. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. Animal Reproduction Science 82-83, 209-224.

Nagy Sz., Hazes G., Ball Papp A., Ivancsics J., Szasz F., Szasz Jr.F. et al. (1999), Evaluation of Sperm Tail Membrane Integrity By Light Microscopy. Thariogenology 52, 1153-1159.

Neild D., Chaves G., Flores M., Mora N., Beconi M. and Aguero A. (1999). Hypo-osmotic Test in equine spermatozoa. Theriogenology, 51: 721-727.

Nie G.J. and Wenzel J.G.W. (2001). Adaptation of the hypo-osmotic swelling test to assess functional. Theriogenology, 55: 1005-1018.

Nur Z., Dogan I., Gunay U. and Soylu M.K. (2005). Relationships between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the semen of Saanen goat bucks. Bull Veterinary Inst. Pulawy, 49:183-187.

Quintela A.T., Oliveira I.R.S., Souza A.O., Gusmão A.L. and Silva A.R. (2010). Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. Animal Reproduction, 7(2):70-74.

Rodriguez-Gil J.E. and Rigau T. (1996). Effects of ouabain on the response to osmotic changes in dog and boar spermatozoa. Theriogenology. 45:873-883.

Romitto G.C., Zuge R.M., Barnebe R.C. and Barnabe V.H. (2001). Standardization of the hypoosmotic swelling test as a method to evaluate frozen-thawed buffalo semen in a yolk-glycine extender. Proceeding of VI World Buffalo Congress, 210-216.

Rota A., Penzo N., Vincenti L. and Mantovani R. (2000). Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing *in vitro* fertility of bovine spermatozoa. Theriogenology. 53, 1415-1420.

Samardžija M., Dobranić T., Krušlin S., Cergolj M., Karadjole M., Prvanović N. et al. (2008). The use of the hypoosmotic swelling test and supravital staining in evaluation of sperm quality in boars. Veterinarski Arhiv 78:279-287.

Samardzua M., Karadjole M., Cergolj M., Tomaskovic A., Dobranic T., Getz I. et al. (2005). Vergleich zweier Aufbereitungsmethoden des Bullenspermas zur In-vitro-fertilization. Tierärztl. Umschau 60, 193-199.

Tsai Y.L., Liu1 J., Garcia J.E., Katz E., Compton G. and Baramki T.A. (1997). Establishment of an optimal hypo-osmotic swelling test by examining single spermatozoa in four different hypoosmotic solutions. Human Reproduction, 12(5):1111–1113.

Watson P.F. and Duncan A.E. (1988). Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. Cryobiology, 25:131-142.

Zavos P.M. (1990). Hypoosmotic swelling test (HOS)/ functional integrity of sperm membrane. Journal of Associatioted Reproductive Technology and Andrology, 2:21S-216.

Vazquez J.M., Martinez E.A., Martinz P., Garcia-Artiga C. and Roca J. (1997). Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. Theriogenology, 47: 913-922.

Vidament M., Cognard E., Yvon J.M., Sattler M., Palmer E. and Magistrini M. (1998). Evaluation of stallion semen before and after freezing. Reproduction of Domestic Animals, 33:271-277.

Determination of relationship between motility rate and vital staining with reaction of frozen-thawed bull sperm to hypoosmotic swelling test

Mahdion H.[1], Mohammadi G.[2], Gooraninejad S.[3] and Khadjeh Gh.[4]

Received: 21.04.2012 Accepted: 26.12.2012

Abstract

Evaluation of bull frozen-thawed spermatozoa is valuable to determination of fertility rate. The objective of this study was to determination of relationship between motility and vital staining with reaction rate of frozen-thawed bull sperm to hypoosmol solutions and determination of the best medium and dilution for evaluation of plasma membrane of bull frozen sperm. In this study we have examined the motility and lived sperms rate, we have used of distilled water, dextrose-NaCl and NaCl medium with 50, 75, 100 and 300 mOsm/L dilutions. For the present study we have bought 30 Holestian bull frozen-thawed sperm payote. The examinations of Indian ink, vital staining, motility and hypoosmotic test were used to evaluate the payotes. The results have showed that proportion of reacted sperm to DW more than other solutions ($p<0.05$). Proportion of reacted sperm to hypoosmol solutions were more than isoosmol solution ($p<0.05$). proportion of reacted sperm to 50 mOsmol/L of dextrose-NaCl was more than other hypoosmol solutions with no significant differences ($p>0.05$). In conclusion, this study demonstrated that distilled water can efficiently use for evaluation of the functional integrity of the plasma membrane of frozen–thawed bull sperm and 50 mOsmol/L of dextrose-NaCl was a good hypoosmotic media to evaluate plasma membrane of frozen sperm. Based on the results, the positive correlation was observed between motility and hypoosmotic Swelling test but no correlation between hypoosmotic Swelling test and lived sperm rates. So, motility and hypoosmotic Swelling test are valuable examinations for evaluation of bull frozen-thawed sperms.

Key words: Frozen bull sperm, Hypoosmotic swelling test, Motility, Vital staining

1- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
2- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
3- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
4- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran