تحقیقات تولیدات دامی

سال هشتم/شماره چهارم/زمستان ۱۳۹۸ (۸-۱)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

اثر ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت بر انجماد اسپرم قوچ

فریبا بشارتی[۱]، محمد روستائی علی مهر[۲*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۰۲)

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر حفاظتی ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت بر اسپرم طی انجماد با استفاده از پنج راس قوچ انجام شد. انزال‌ها (n=۳۰) به صورت سه روز یک بار در شش نوبت جمع‌آوری شد. در هر نوبت، انزال‌ها تجمیع و به ۱۲ قسمت مساوی تقسیم شدند. مقدار ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۵ یا ۰/۱ درصد هیدروکسی آپاتیت و ۳، ۵ یا ۷ درصد گلیسرول به هر بخش اضافه شد. نمونه‌ها منجمد شده و برای دو هفته ذخیره شدند. سپس تعداد دو پایوت از هر تکرار (جمعاً ۱۴۴ پایوت)، یخ-گشایی شد و به مدت شش ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. میزان تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشای اسپرم و سلامت آکروزوم طی ساعات صفر، ۳ و ۶ پس از یخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر متقابل ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت، گلیسرول و زمان بر فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده معنی‌دار نبود ($P>0/05$). زنده‌مانی اسپرم و سلامت آکروزوم تحت تاثیر سطوح مختلف ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت قرار نگرفت ($P>0/05$). تحرک کل و پیش‌رونده اسپرم در سطح ۰/۰۱ (به ترتیب ۲۱/۸ و ۱۷/۸٪) و ۰/۱٪ (به ترتیب ۲۱/۵ و ۱۷/۷٪) ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت تفاوتی نشان نداد ($P>0/05$). بیشترین تحرک کل (۲۴/۸٪) و پیش‌رونده (۲۱/۰٪) در سطح ۰/۰۲ درصد ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت مشاهده شد ($P<0/05$). سلامت غشا در سطح ۰/۰۲ ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت (۵۲/۷٪) بیشتر از سایر سطوح بود ($P<0/05$). بنابراین افزودن ۰/۰۲ درصد ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت به رقیق‌کننده منی قوچ سبب بهبود کیفیت اسپرم در روند انجماد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسپرماتوزوآ، انجماد، قوچ، نانو هیدروکسی آپاتیت

* نویسندهٔ مسئول: roostaei@guilan.ac.ir

doi: 10.22124/ar.2020.15346.1483

مقدمه

امروزه استفاده از روش تلقیح مصنوعی جهت بهبود باروری و افزایش نرخ زایش در گله دام‌های تولید کننده اجتناب‌ناپذیر است. از طرفی کاربرد این روش در بعضی از دام‌ها از جمله گوسفند با محدودیت‌هایی همراه است. حساسیت اسپرم گوسفند به سرما و دراز بودن گردن رحم در میش، سبب شده است که باروری حاصل از تلقیح اسپرم منجمد در مهبل میش کمتر از ۲۰٪ باشد (Windsor, 1997). تلقیح مصنوعی میش‌ها با اسپرم منجمد زمانی با نتایج رضایت‌بخش همراه است که انتقال اسپرم پس از یخ‌گشایی به شاخ رحم، از راه لاپاروسکوپی انجام گیرد (Roostaei-Ali Mehr *et al*., 2013). صرف نظر از وقت‌گیر و تهاجمی بودن روش تلقیح اسپرم در شاخ رحم، این روش نیاز به امکانات و افراد متخصص دارد. از این رو دامپرورها تمایل زیادی جهت استفاده از تلقیح اسپرم در شاخ رحم نشان نمی‌دهند.

آسیب‌های مخربی بر اسپرم در روند انجماد و یخ‌گشایی وارد می‌شود (Chatterjee *et al*., 2001). اسپرم قوچ در مقایسه با سایر دام‌ها حساسیت بیشتری به تغییرات دما از خود نشان می‌دهد (Mui˜no-Blanco *et al*., 2008). شواهد نشان می‌دهد که تشکیل بلورهای یخ در هنگام انجماد سلول بسیار مخرب هستند (Karlsson and Toner, 1996). به خوبی روشن شده است که سرما محافظ‌ها می‌توانند با خارج کردن یا جایگزین شدن آب داخل سلول، مانع تشکیل بلور یخ در داخل سلول شوند (Hao and Liu, 2011). به علاوه، تسریع در کاهش دما در هنگام انجماد اجازه تشکیل بلورهای برنده (مرُف) را نمی‌دهد (Klotz *et al*., 2009). بنابراین در صورتی که هدایت حرارتی در محیط‌های نگهدارنده سلول افزایش یابد، می‌تواند سبب کاهش ایجاد بلورهای برنده و آثار مخرب انجماد بر سلول شود.

مرسوم‌ترین سرما محافظ در انجماد اسپرم قوچ، گلیسرول است (Salamon, Maxwell, 2000). تلاش‌های زیادی برای نگهداری بلندمدت اسپرم قوچ با استفاده از سایر سرما محافظ‌ها، افزودن مواد مکمل مانند آنتی‌اکسیدان‌ها و افزایش میزان کلسترول غشا انجام شده است (Roostaei-Ali Mehr and Noori, 2013, Motamedi-Mojdehi *et al*., 2014; Roostaei-Ali Mehr and Parisoush, 2016). اگر چه نتایج بدست آمده تا حدودی نشان‌دهنده بهبود کیفیت اسپرم قوچ بعد از انجماد است، ولی هنوز کیفیت قابل قبول بدست نیامده است. لذا بهبود روش انجماد اسپرم قوچ ضروری به نظر می‌رسد.

نانوذرات موادی هستند که بلور آنها حدود ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است (Masciangiol *et al*., 2003). اندازه کوچک و مساحت سطحی بالای نانوذرات سبب افزایش فعالیت شیمیایی آنها شده است (Goddard *et al*., 2002). از این رو نانوذرات کاربرد گسترده‌ای در فرآیند تولید داروها، واکسن و تشخیص یا درمان انواعی بیماری‌ها پیدا کرده‌اند (Chen and Schluesener, 2008). بعضی از نانوذرات در مقادیر کم برای مهره‌داران سمّی هستند (Albrecht *et al*., 2009)، ولی شواهد نشان می‌دهد که ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت با فرمول Ca5(PO4)3OH سمّی نیستند و با محیط زیست کاملاً سازگار هستند (Goyal *et al*., 2009). ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت بسیار سازگار با بافت‌های موجودات زنده است و به همین دلیل در دندانپزشکی به عنوان ماده ترمیم‌کننده دندان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Nie *et al*., 2019). از طرفی مشخص شده که ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت بر فعالیت حاملین غشا و نقل و انتقال مواد از غشا اثر می‌گذارند (Goyal *et al*., 2009). به علاوه، حضور نانو ذرات در مایعات سبب افزایش هدایت گرمایی می‌شود (Han *et al*., 2008). بنابراین استفاده از نانوذرات در روند انجماد ممکن است سبب بهبود کیفیت سلول بعد از یخ‌گشایی شود. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت بر کیفیت اسپرم منجمد قوچ بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق با استفاده از پنج راس قوچ تالشی در سن چهار تا پنج سال و یک راس میش با سن سه سال در اوایل پاییز سال ۱۳۹۷ انجام شد. روزانه g ۱۳۰۰ یونجه خشک، g ۵۹۰ جو، g ۶۲۰ کاه در دو وعده خوراک صبح و شب در اختیار قوچها قرار گرفت. در طول آزمایش، نمک و آجر لیسیدنی (مکمل مواد معدنی) به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار داده شد.

نمونه‌های منی (در مجموع ۳۰ انزال) از قوچها به صورت سه روز یک بار در شش نوبت به کمک واژن مصنوعی استریل و حضور میش فحل (محمدی و روستائی علی - مهر، ۱۳۹۳) جمع‌آوری شد. بلافاصله انزال‌ها به نسبت ۲

به ۱ با رقیق‌کننده تریس-گلوکز [۳/۶۳۴ گرم تریس-(هیدروکسی‌متیل)-آمینومتان، ۱/۹۹۶ گرم اسید سیتریک مونوهیدرات، ۱۵٪ زرده تخم‌مرغ و ۲۵۰mg از جنتامایسین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH=۷] هم دما رقیق شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های منی در آزمایشگاه از نظر تحرک پیش‌رونده و غلظت اسپرم بر اساس توضیحات زیر مورد بررسی قرارگرفتند: نمونه‌هایی که تحرک پیش‌رونده کمتر از ۸۰٪ و غلظت کمتر از $۱۰^{۹}\times$ ۲/۵ داشتند از آزمایش حذف شدند. در هر نوبت نمونه-گیری، انزال‌ها تجمیع و با رقیق‌کننده تریس-گلوکز تا غلظت mL / سلول $۱۰^{۹}$ × ۱/۲ رقیق شدند. بعد نمونه به ۱۲ قسمت مساوی تقسیم شد. مقدار ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۵ یا ۰/۱ درصد هیدروکسی آپاتیت (Sigma-Aldrich, USA) و ۳، ۵ یا ۷ درصد گلیسرول به هر بخش اضافه شد. غلظت نهایی تخم‌مرغ و اسپرم به ترتیب به ۱۵٪ و $۱۰^{۶}\times$۶۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر رسید.

نمونه‌ها در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری بسته‌بندی شده و انتهای هر کدام با پودر پلی ونیل الکل مسدود شدند. نمونه‌ها به دستگاه سردکننده (Test Chamber EG53AH, KATO, Japan) منتقل شد، با سرعت ۰/۲۵ تا ۴ درجه سلسیوس بر دقیقه سرد شدند و دو ساعت دیگر در همین دما برای رسیدن به تعادل نگهداری شدند. سپس پایوت‌ها به مدت ۱۳ دقیقه به فاصله چهار سانتی-متر از سطح نیتروژن مایع قرار داده شد و سپس در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. نمونه‌ها به مدت دو هفته در تانک نیتروژن مایع ذخیره شدند.

تعداد دو پایوت از هر تکرار (جمعاً ۱۴۴ پایوت)، به مدت ۲۰ ثانیه در ظرف آب ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند و سپس به مدت شش ساعت در همین دما و ۵٪ CO_2 نگهداری شدند. میزان تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشای اسپرم و سلامت آکروزوم طی ساعات صفر، ۳ و ۶ پس از یخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی تحرک نمونه‌ها با استفاده از سیستم CASA (Animal Version 6.51HFT CASA, Iran)، دوربین (Samsung, Techwin, CO LTD, SCB-2000, Korea)، میکروسکوپ فازکنتراست (GX Microscopes, Australia)، چنبر (Sperm Processor, India) و صفحه گرم انجام شد. تنظیم و انجام بررسی تحرک اسپرم بر اساس روش Roostaei-Ali Mehr and Parisoush (2016) انجام شد.

برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم از محلول هایپواسموتیک (۰/۷۳۵ گرم سیترات سدیم دی‌هیدرات و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH=۷) با اسمولاریته ۱۰۰ mOsm استفاده شد. مقدار ۵ µL منی با ۵ µL از محلول هایپواسموتیک مخلوط و درون انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس ۲۰۰ عدد اسپرم حداقل در پنج میدان دید زیر میکروسکوپ نوری با عدسی شئی ۴۰ بررسی شد. اسپرم‌های دارای دم متورم به عنوان پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌های با دم بدون تورم به عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی ناسالم) در نظر گرفته شدند.

ارزیابی زنده‌مانی اسپرم با استفاده از رنگ هوخست بیس بنزامید H33258 (AppliChem, Germany) بر اساس روش de Leeuw *et al.* (2009) انجام شد. به طور خلاصه حجم مساوی از نمونه و محلول ۲ درصد گلوتار آلدهید در بافر فسفات (۱۳۷ mMسدیم کلرید، ۲/۷ mM پتاسیم کلرید، ۸/۱ mM سدیم هیدروژن فسفات، ۱/۵ mM پتاسیم هیدروژن فسفات، pH=۷) مخلوط و ثابت شد. مقدار ۲۰µL از محلول رنگ هوخست بیس بنزآمید در ۱۵۴ mM سدیم کلرید و ۱۵ mM تری سدیم سیترات pH=۷) به نمونه اضافه شد و بعد از پنج دقیقه در دمای اتاق، ۵ µL از نمونه روی لام قرار داد شده و با گذاشتن لامل روی آن با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر UW با عدسی شئی ۴۰، ۲۰۰ عدد اسپرم در شرایط نور بسیار کم بررسی شد. اسپرم‌های با تلالوء آبی رنگ به عنوان پاسخ منفی (مرده) و اسپرم‌های بدون رنگ به عنوان پاسخ مثبت (زنده) در نظر گرفته شدند.

ارزیابی سلامت غشای آکروزوم با استفاده از رنگ آلکسافلور ۴۸۸- PNA (Molecular Probes, USA) و بر اساس روش Varisly *et al.* (2009) انجام شد. از هر نمونه روی لام گسترش تهیه شد. گسترش‌ها پس از خشک شدن با استفاده از متانول مطلق ثابت و در دمای اتاق خشک شدند. سپس رنگ آلکسافلور ۴۸۸ (۱۰ µg/mL) روی نمونه‌ها ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در محل تاریک و مرطوب نگهداری شدند. پس از این مرحله، گسترش‌ها با استفاده از بافر

فسفات (PBS) شسته شد. در شرایط نور بسیار کم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر WB با عدسی شئی ۴۰، تعداد ۱۰۰ عدد اسپرم بررسی شد. آکروزوم‌های با رنگ یکدست، شفاف و با حاشیه مشخص به عنوان پاسخ مثبت (سالم) و آکروزوم‌های با رنگ پراکنده و با حاشیه نامشخص به عنوان پاسخ منفی (آسیب دیده) در نظر گرفته شدند.

نتایج بدست آمده از تحرک، زنده‌مانی، سلامت آکروزوم اسپرم و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل ۴×۳ به صورت داده‌های تکرار شده در زمان تجزیه و تحلیل شدند. تجزیه داده‌ها با استفاده از رویه MIXED نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد. سطح خطا برای بیان تفاوت معنی‌دار نیز پنج درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر مستقل ذرات نانو هیدروکسی‌آپاتیت و گلیسرول و زمان نگهداری اسپرم پس از یخ‌گشایی بر ویژگی‌های حرکت اسپرم قوچ در جدول ۱ نمایش داده شده است. بیشترین تحرک کل و پیش‌رونده در سطح ۰/۰۲ درصد ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت مشاهده شد ($P<$۰/۰۵). تحرک کل و پیش‌رونده اسپرم در سطح ۰/۰۱ و ۰/۱ تفاوتی نشان ندادند ($P>$۰/۰۵). سرعت منحنی (VCL) در سطح ۵٪ گلیسرول از سطح ۳٪ گلیسرول بیشتر بود ($P<$۰/۰۵).

زنده‌مانی اسپرم و سلامت آکروزوم تحت تاثیر سطوح مختلف ذرات نانو هیدروکسی‌آپاتیت قرار نگرفت (جدول ۲، $P>$۰/۰۵). سلامت غشا در سطح ۰/۰۲ ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت بیشتر از سایر سطوح بود ($P<$۰/۰۵). اثر متقابل ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت، گلیسرول و زمان بر فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده معنی‌دار نبود ($P>$۰/۰۵).

بحث

نتایج بدست آمده نشان داد که افزودن ۰/۰۲ درصد نانو هیدروکسی آپاتیت به منی قوچ سبب حفظ بیشتر تحرک کل و پیش‌رونده اسپرم در روند انجماد و یخ‌گشایی شد. حرکت از شاخص‌های مهم فیزیولوژی اسپرم است که نیازمند تبادلات یونی، انرژی، حفظ پتانسیل غشا، فعالیت طبیعی میتوکندری و سلامت تمام اجزای سلولی است (Evans *et al*., 2001). دو پدیده بیودینامیک در روند انجماد و یخ‌گشایی سبب آسیب به سلول می‌شود: ۱- تشکیل بلور یخ در داخل سلول و ۲- از دست دادن بیش حد آب یا دهیدراتاسیون (Yang *et al*., 2011). این دو پدید تحت تاثیر میزان جابجایی آب از غشا در دماهای زیر صفر قرار می‌گیرند (Yi and Zhao, 2014). هنگام انجماد سلول با استفاده از روش کاهش تدریجی دما، زمان کافی برای خروج آب از سلول فراهم می‌شود، ولی سلول به شدت دچار دهیدراتاسیون خواهد شد (Mazur, 1984).

جدول ۱- اثر مستقل ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت، گلیسرول و زمان بر تحرک اسپرم منجمد قوچ (میانگین حداقل مربعات±خطای استاندارد)

Table 1. Main effect of nano hydroxyapatite, glycerol and incubation time on the frozen-thawed ram sperm motility [least squares means (LSM) ± SE]

Variables	Level	Total motility (%)	Progressive motility (%)	Curvilinear velocity (µm/s)	Average path velocity (µm/s)	straight-line velocity (µm/s)
Nano hidroxyapatit (%)	0.01	21.8^{b}±0.81	17.8^{b}±0.75	28.4±1.98	16.4±1.18	11.2±0.94
	0.02	24.8^{a}±0.82	21.0^{a}±0.75	30.9±1.98	17.6±1.18	12.3±0.94
	0.05	19.22^{c}±0.81	15.5^{c}±0.75	26.0±1.98	14.7±1.18	10.0±0.94
	0.1	21.5^{b}±0.81	17.7^{b}±0.75	27.9±1.98	16.2±1.18	11.2±0.94
Glycerol (%)	3	20.9±0.70	17.4±0.65	25.0^{b}±1.71	14.7±1.02	10.0±0.82
	5	23.1±0.70	19.1±0.65	31.1^{a} ±1.71	17.8±1.02	12.3±0.82
	7	21.5±0.70	17.5±0.65	28.8^{ab}±1.71	16.3±1.02	11.2±0.82
Time (h)	0	30.2^{a}±0.70	26.0^{a}±0.65	38.0^{a}±1.71	22.9^{a}±1.02	16.5^{a}±0.82
	3	21.7^{b}±0.70	17.7^{b}±0.65	27.7^{b}±1.71	15.9^{b}±1.02	10.9^{b}±0.82
	6	13.6^{c}±0.70	10.4^{c}±0.65	19.2^{c}±1.71	9.9^{c}±1.02	6.1^{c}±0.82

$^{a-c}$ LSM within the same column with different superscripts differ significantly (P<0.05)

جدول ۲- اثر مستقل ذرات نانو هیدروکسی‌آپاتیت، گلیسرول و زمان بر زنده‌مانی، سلامت غشا و سلامت آکروزوم اسپرم منجمد قوچ (میانگین حداقل مربعات±خطای استاندارد)

Table 2. Main effect of nano hydroxyapatite, glycerol and incubation time on the viability, membrane integrity and acrosome integrity of froze-thawed ram sperm [least squares means (LSM) ± SE]

Variables	Level	Sperm viability (%)	Membrane integrity (%)	Acrosome integrity (%)
Nano hidroxyapatit (%)	0.01	51.2±0.75	48.1^{b}±1.09	26.7±0.40
	0.02	49.6±0.75	52.7^{a}±1.09	26.1±0.40
	0.05	49.4±0.75	48.4^{b}±1.09	25.6±0.40
	0.1	49.7±0.75	49.3^{b}±1.09	25.50.40
Glycerol (%)	3	51.3±0.65	50.8±0.86	26.6±0.35
	5	49.5±0.65	48.9±0.86	25.5±0.35
	7	49.2±0.65	49.1±0.86	25.9±0.35
Time (h)	0	58.0^{a}±0.65	58.9^{a}±0.86	30.4^{a}±0.35
	3	50.9^{b}±0.65	49.0^{b}±0.86	26.1^{b}±0.35
	6	41.5^{c}±0.65	40.9^{c}±0.86	21.5^{c}±0.35

$^{a-c}$ LSM within the same column with different superscripts differ significantly (P<0.05)

به علاوه، استفاده از سرعت کم در کاهش دما، احتمال تشکیل بلورهای برّنده (مرف) در خارج سلول را زیاد می‌کند و شاید به همین دلیل روش‌های سرد کردن تدریجی مورد استقبال قرار نگرفتند (Klotz *et al*., 2009). از طرفی، در هنگام انجماد با استفاده از روش سریع کاهش دما، سرعت بیش از حد کاهش دما مانع از خروج آب از سلول شده و در نتیجه سبب افزایش بلورهای یخ در داخل سلول می‌شود (Toner, 1993). بنابراین سرعت جابجایی آب از غشا سلول در دماهای زیر صفر ارتباط نزدیکی با تشکیل بلورهای کشنده در داخل سلول دارد (Karlsson and Toner, 1996). مشخص شده است که در هنگام انجماد سلول با استفاده از روش سریع کاهش دما، افزودن ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت سبب تسریع در جابجایی آب از غشای سلول می‌شود (Yi and Zhao, 2014). به علاوه، شواهد نشان می‌دهد که حضور ذرات نانو در هنگام انجماد سلول سبب افزایش هدایت حرارتی و بهبود خواص سرما محافظ‌ها می‌شود (Han *et al*., 2008). همچنین، مشخص شده است که هیدروکسی آپاتیت سبب کاهش تشکیل کریستال‌های یخ در فرآیند انجماد و یخ‌گشایی می‌شود (Li *et al*., 2013). بنابراین به نظر می‌رسد افزودن هیدروکسی‌آپاتیت به رقیق‌کننده منی قوچ با کاهش آسیب‌های روند انجماد-یخ‌گشایی سبب بهبود کیفیت اسپرم منجمد قوچ شده است.

نتایج نشان داد که میزان تحرک کل و پیش‌رونده اسپرم در سطح ۰/۰۵ درصد هیدروکسی آپاتیت کمتر از سایر سطوح بود. همچنین میزان این دو فراسنجه در سطوح ۰/۰۱ و ۰/۱ درصد هیدروکسی آپاتیت تفاوتی با هم نداشتند. اگر چه ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت با بهبود جابجایی آب از غشا در دماهای زیر صفر مانع از تشکیل بلورهای کشنده داخل سلول می‌شوند، ولی غلظت زیاد ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت می‌تواند اسمولاریتی محیط اطراف سلول را تغییر دهد و اثر مخرب بر سلول بگذارد (Hao and Liu, 2011). به علاوه، مشخص شده است میزان تسریع در جابجایی آب از غشا در دماهای زیر صفر رابطه مستقیمی با غلظت ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت ندارد (Yi and Zhao, 2014). بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از غلظت ۰/۰۲ درصد ذرات نانو هیدروکسی-آپاتیت در روند انجماد اسپرم قوچ، احتمالاً با فراهم کردن شرایط بهینه برای جابجای آب از غشا، دو پدیده مخرب تشکیل بلورهای یخ داخل سلول و دهیدراتاسیون سلول را در حداقل ممکن حفظ می‌کند.

در این تحقیق میزان سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در سطح ۰/۰۲ درصد ذرات نانو هیدروکسی‌آپاتیت بیشتر از سایر سطوح بود. به علاوه، سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در سایر سطوح تفاوتی را نشان نداد. شواهد نشان می‌دهد که ذرات نانو از راه مکانیسم اندوسیتوز وارد سلول می‌شوند و روند اندوسیتوز نیز تحت تاثیر عوامل مختلف از جمله دما تغییر می‌کند (Sudhakaran *et al*., 1982). شواهد میکروسکوپیک نشان داده است که ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت می‌توانند به سطح غشای سلول متصل شوند (Zhu *et al*., 2004). از طرفی بیان شده است که ناخالصی‌ها در غلظت‌های زیاد ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت ممکن است احتمال تشکیل هسته‌های لازم برای تشکیل بلور یخ را زیاد کنند (Toner, 1993; Yi and

Zhao, 2014). به نظر می‌رسد تجمع ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت در سطح غشا سبب حمایت از غشای اسپرم در روند انجماد شده است. همچنین، غلظت ۰/۰۲ درصد ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت مناسب‌ترین غلظت برای حفظ عملکرد غشای اسپرم قوچ در روند انجماد است.

نتیجه‌گیری کلی

افزودن ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت به رقیق‌کننده منی قوچ سبب بهبود کیفیت اسپرم در روند انجماد می‌شود. به علاوه، مناسب‌ترین غلظت ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت برای انجماد اسپرم قوچ، ۰/۰۲ درصد است.

فهرست منابع

محمدی آ.، و روستائی علی مهر م. ۱۳۹۳. اثر افزودن زرده تخم مرغ به رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ و شوک سرما بر ذخیره‌سازی اسپرم پوشش‌دار شده قوچ تالشی به صورت مایع در سرما. تحقیقات تولیدات دامی، ۳(۴): ۹۹-۱۰۸.

Albrecht C., Scherbart A. M., Berlo D. V., Braunbarth C. M., Schins R. P. F. and Scheel J. 2009. Evaluation of cytotoxic eVects and oxidative stress with hydroxyapatite dispersions of diVerent physicochemical properties in rat NR8383 cells and primary macrophages. Toxicology in Vitro, 23: 520-530.

Chatterjee S., de Lamirande E. and Gagnon C. 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. Molecular Reproduction & Development, 60: 498-506.

De Leeuw A. M., Den Daas G. H. E. and Woelders H. 1991. The fix vital stain method simultaneous determination of viability and acrosomal and status of bovine spermatozoa. Journal of Andrology, 12: 112-118.

Goddard W. A., Brenner D. W., Lyshevski S. E. and Lafrate G. J. 2002. Hand book of nanoscience engineering and technology. USA CRC Press. Pp 22-47.

Goyal A. K., Khatri K., Mishra N., Mehta A., Vaidya B., Tiwari S., Paliwal R., Paliwal S. and Vyas S. 2009. Development of self-assembled nanoceramic carrier constructs for vaccine delivery. Journal of Biomaterials Application, 24: 65-84.

Han X. Manoel H. B. Wilson C. and Critser J. K. 2008. Effect of nanoparticles on the nucleation and devitrification temperatures of polyol cryoprotectant solutions. Microfluid Nanofluid, 4: 357-361.

Hao B. and Liu B. 2011. Thermal properties of PVP cyroprotectants with nanoparticles. Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine, 2: 021015.

Hsin Y. H., Chen C. F., Huang S., Shih T. S., Lai P. S. and Chueh P. J. 2008. The apoptotic eVect of nanosilver is mediated by a ROS-and JNKdependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIHsTS cells. Toxicology Letters, 179: 130-139.

Karlsson J. O. M. and Toner M. 1996. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. Biomaterials, 17: 243-256.

Klotz S., Bove L. E., Strässle T., Hansen T. C. and Saitta A. M. 2009. The preparation and structure of salty ice VII under pressure. Nature Materials, 8: 405-409.

Li W., Zhou X., Dai J., Zhang D., Liu B., Wang H. and Xu L. 2013. Effect of hydroxyapatite nanoparticles on MII- stage porcine oocytes vitrification and the study of its mechanism. Audiology, 30: 789-793.

Masciangioli T. and Zhang W. 2003. Environmental technologies at the nanoscale. Environmental Science and Technology, 37: 102.

Mazur P. 1984. Freezing of living cells—mechanisms and implications. American Journal of Physiology, 247: 125-142.

Motamedi-Mojdehi R., Roostaei-Ali Mehr M. and Rajabi-Toustani R. 2014. Effect of different levels of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on cryosurvival of ram spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals, 49: 65-70.

Mui˜no-Blanco T., Pérez-Pé R. and Cebrián-Pérez J. A. 2008. Seminal plasmaproteins and sperm resistance to stress. Reproduction in Domestic Animals, 4: 18-31.

Nie L., Zhang H., Ren A., Li Y., Fu G., Cannon R. D., Ji P., Wu X. and Yang S. 2019. Nano-hydroxyapatite mineralized silk fibroin porous scaffold for tooth extraction site preservation. Dental Materials, 35: 1397-1407.

Roostaei-Ali Mehr M. and Noori H. 2013. Effect of different levels of L-Glutamine and glycerol on freezing of ram spermatozoa. Small Ruminant Research, 115: 103-107.

Roostaei-Ali Mehr M. and Parisoush P. 2016. Effect of different levels of silymarin and caproic acid on storage of ram semen in liquid form. Reproduction in Domestic Animals, 51: 569-574.

Roostaei-Ali Mehr M., Chambary B. and Ghavi Hossein-Zadeh N. 2013. Effect of different diluents and storage time on field fertility of cooled ram semen after vaginal insemination. Small Ruminant Research, 115: 82-85.

Salamon S. and Maxwell W. M. C. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science, 62: 77-111.

Sudhakaran P. R., Prinz R. and Vonfigura K. 1982. Effect of temperature on endocytosis and degradation of sulfated proteoglycans by cultured skin fibroblasts. Journal of Biosciences, 4: 413-418.

Toner M. 1993. Nucleation of ice crystals inside biological cells. Advances in Low-Temperature Biology, JAI Press Ltd., London, UK.

Varisly O., Uguz C., Agca C. and Agca Y. 2009. Motility and acrosomal integrity comparision between electroejaculated and epididimal ram sperm after exposure to a range of anisosmotic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. Animal Reproduction Science, 110: 256-268.

Windsor D. P. 1997. Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination of Merino ewes. Animal Reproduction Science, 47: 21-29.

Yang G., Veres M., Szalai G., Zhang A. L., Xu L. X. and He X. M. 2011. Biotransport phenomena in freezing mammalian oocytes. Annals of Biomedical Engineering, 39: 580-591.

Yi J. and Zhao G. 2014. Effect of hydroxyapatite nanoparticles on biotransport phenomena in freezing HeLa Cells. Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine, 5: 041003-1- 041003.

Zhu S. H., Huang B. Y., Zhou K. C., Huang S. P., Liu F., Li Y. M., Xue G. and Long, Z. G. 2004. Hydroxyapatite nanoparticles as a novel gene carrier. Journal of Nanoparticle Research, 6: 307-311.

Animal Production Research

Vol. 8, No. 4, 2019 (1-8)

University of Guilan

Research paper

Effect of nano-hydroxyapatite on freezing ram spermatozoa

F. Besharati[1], M. Roostaei-Ali Mehr[2*]

1. MSc. Graduated, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: 22-12-2019 – Accepted: 21-02-2020)

Abstract

This experiment was designed to evaluate the protective effect of nano-hydroxyapatite against freezing damages on spermatozoa using five rams. Ejaculates (N=30) were collected with three-day intervals between sessions for six times. Ejaculates were pooled and split into 12 parts at each session. The amount of 0.01, 0.02, 0.05 or 0.1% nano-hydroxyapatite and 3, 5 or 7% glycerol were added. Samples were frozen and stored for two weeks. After that two straws from each treatment for each replication (totally 144 straws) were thawed and incubated at 37 ° C for 6 h. Sperm motility, viability, membrane integrity and acrosome integrity were evaluated at 0, 3 and 6 h after thawing. Results showed that there was no interaction between nano-hydroxyapatite, glycerol and incubation time (P>0.05). Sperm viability and acrosome integrity were not affected by different levels of nano-hydroxyapatite particles (P>0.05). There was no difference between the level of 0.01 and 0.1% nano-hydroxyapatite particles on the total (21.8 and 21.5%, respectively) and progressive sperm motility (17.8 and 17.7 %, respectively; P>0.05). Total and progressive sperm motility was the highest (24.8 and 21.0%, respectively) in the level of 0.02% nano-hydroxyapatite particles (P<0.05). Membrane integrity was higher in the level of 0.02% nano-hydroxyapatite particles (52.7%) than other levels (P<0.05). Therefore, the addition of 0.02% nano-hydroxyapatite particles to the ram semen extender improved the quality of frozen spermatozoa.

Keywords: Spermatozoa, Freezing, Ram, Nano-hydroxyapatite particles

*Corresponding author: roostaei@guilan.ac.ir

doi: 10.22124/ar.2020.15346.1483