تولیدات دامی

دوره ۱۷ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۴

صفحه‌های ۳۸۰-۳۷۱

اثر اضافه‌کردن نانوذرات روی بر شاخص‌های کیفیت اسپرم گاو بعد از فرایند انجماد_یخ‌گشایی

رعنا جهان‌بین[۱]، پریسا یزدان‌شناس[۱]، مهدی امین‌افشار[۲*]، عبدالله محمدی سنگ‌چشمه[۳]، حمید ورناصری[۴]، محمد چمنی[۵]، محمدحسن نظران[۶]، محمدرضا بختیاری‌زاده[۷]

۱. کارشناس ارشد، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

۴. استادیار، مرکز نهاده‌های دامی جاهد، تهران، ایران

۵. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۶. شرکت صدور احرار شرق، تهران ایران

۷. استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

تاریخ وصول مقاله:۱۳۹۳/۸/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۱۴

چکیده

این تحقیق به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های گوناگون نانوذرات روی بر شاخص‌های کیفی منی گاو پس از فرایند انجماد_یخ‌گشایی انجام شد. از چهار گاو نر هلشتاین به مدت چهار هفته و هر هفته دو نوبت اسپرم‌گیری شد. نمونه‌های منی پس از اضافه‌کردن مقادیر صفر، $۱۰^{-۶}$، $۱۰^{-۵}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۳}$، و $۱۰^{-۲}$ مولار نانوذرات روی به رقیق‌کنندهٔ بایوکسل، منجمد و پس از ۷۲ ساعت یخ‌گشایی شدند. میزان تحرک اسپرم با نرم‌افزار کاسا (Computer Assisted Sperm Analysis; CASA) ارزیابی شد. میزان زنده‌مانی، یکپارچگی غشا، مورفولوژی، و میزان فعالیت میتوکندریایی اسپرم‌ها در نمونه‌های اسپرم مربوط به بیشترین و کمترین غلظت‌های نانوذرات روی با همراه گروه شاهد ارزیابی شدند. تفاوت در میزان تحرک اسپرم، میزان زنده‌مانی، و درصد اسپرم با ظاهر غیرطبیعی بین غلظت‌های آزمایشی معنی‌دار نبود. داده‌های حاصل از فلوسایتومتری و آزمون هاس نشان داد که یکپارچگی غشا و فعالیت میتوکندریایی اسپرم در گروه‌های $۱۰^{-۶}$ و $۱۰^{-۲}$ مولار نانوروی در مقایسه با گروه شاهد بیشتر بود ($P<۰/۰۵$). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با اضافه‌کردن نانوذرات روی به رقیق‌کنندهٔ اسپرم گاو یکپارچگی غشا و فعالیت میتوکندریایی اسپرم بیشتر می‌شود.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌اکسیدان، اسپرم، فعالیت میتوکندریایی، کیفت منی، نانوذرات روی.

* نویسنده مسئول Email: aminafshar@gmail.com

مقدمه

ذخیره‌سازی بهینهٔ اسپرم به‌صورت منجمد امری ضروری در جهت افزایش بازده استفاده از فناوری تلقیح مصنوعی است (۱۴). عموماً فرایند انجمادیخ‌گشایی با کاهش زنده‌مانی و تحرک اسپرم همراه است (۲۵)، به‌طوری‌که قدرت باروری اسپرم‌های منجمد نصف اسپرم‌های تازه است (۱۲). بروز تأثیرات نامطلوب بر میزان تحرک، غشای پلاسمایی، DNA، و میتوکندری اسپرم، در طی فرایند انجمادیخ‌گشایی اسپرم محتمل است (۳). بنابراین استفاده از رقیق‌کنندهٔ مناسب که بتواند اسپرم‌ها را در برابر آسیب‌های انجمادیخ‌گشایی محافظت کند و زنده‌مانی و تحرک اسپرم را پس از یخ‌گشایی حفظ کند، گام مهمی در راستای افزایش بازده تلقیح مصنوعی خواهد بود.

با نگهداری اسپرم در دمای بسیار کم تولید گونه‌های فعال اکسیژن که تأثیر مخربی بر سلول اسپرم دارند، افزایش می‌یابد. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند در کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژنی مؤثر باشد و سبب بهبود خصوصیات اسپرم شود (۳۱). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به‌طور گسترده برای جلوگیری از کاهش زنده‌مانی و تحرک اسپرم در رقیق‌کننده‌های اسپرم گونه‌های متفاوت استفاده شده‌اند (۷).

روی نقش فیزیولوژیک بسیار مهمی بر عملکرد سلول‌های اسپرم دارد که شامل تأثیر بر تحرک و نگهداری مورفولوژی طبیعی آنهاست. کاهش سطح روی موجب کاهش کیفیت اسپرم و مایع منی می‌گردد و شانس باروری کاهش می‌یابد (۸ و ۲۰). این عنصر به‌دلیل خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، نقش مهمی در مهار گونه‌های فعال اکسیژن دارد. عنصر روی همچنین نقش ویژه‌ای در عملکرد طبیعی بیضه‌ها و عملکرد فیزیولوژیکی اسپرم‌ها دارد و کاهش مقدار آن باعث کاهش حجم بیضه‌ها، ظهور نامناسب صفات ثانویه جنسی، و اختلال در عمکرد لوله‌های اسپرم‌ساز می‌شود (۶، ۱۷، ۲۱، و ۲۴). کمبود روی در بدن با اختلال در سازوکار تدافعی و تهاجمی آنتی‌اکسیدان‌ها بازده اثر آنها را کاهش می‌دهد. همچنین کمبود روی با اختلال در سازوکار بازسازی DNA و سبب حساس‌شدن سلول اسپرم در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌شود (۲۲ و۳۲). همچنین روی برای نگهداری اطلاعات مولکولی بسیاری از آنزیم‌ها، RNA، DNA و نیز پروتئین‌ها لازم است (۴).

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثر غلظت‌های گوناگون نانوذرات روی در رقیق‌کنندهٔ منی بر شاخص‌های کیفیت اسپرم مانند میزان تحرک، میزان زنده‌مانی، یکپارچگی غشای مورفولوژی، و میزان فعالیت میتوکندریایی، بعد از فرایند انجمادیخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در مرکز نهاده‌های دامی جاهد واقع در محمدشهر کرج انجام شد. از چهار گاو نژاد هلشتاین به‌مدت چهار هفته و هر هفته دو نوبت با استفاده از واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شد. نمونه‌های منی به‌سرعت به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از بررسی حجم منی، غلظت اسپرم، و درصد تحرک، نمونه‌های منی با یکدیگر مخلوط شد و باتوجه به گروه‌های آزمایشی به شش بخش تقسیم شدند. گروه‌های آزمایشی به‌ترتیب شامل رقیق‌کنندهٔ بایوکسل بدون ذرات نانوروی (شاهد) و گروه‌های رقیق‌کنندهٔ بایوکسل حاوی $۱۰^{-۶}$، $۱۰^{-۵}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۳}$، و $۱۰^{-۲}$ مولار نانوروی بودند. بیشتر ارزیابی‌های انجام‌شده در مطالعهٔ حاضر، به‌دلیل عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار در سایر گروه‌ها، فقط در سه گروه (گروه شاهد، غلظت $۱۰^{-۲}$، و $۱۰^{-۶}$) انجام گرفته است. پودر نانوذرات روی در دو میلی‌لیتر آب مقطر حل شد، سپس به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از آن در ۵۰ میلی‌لیتر محیط حل شد، به این ترتیب غلظت $۱۰^{-۲}$ حاصل شد.

سپس به مقدار ۵ میلی‌لیتر از محیط دارای غلظت $۱۰^{-۲}$ مولار نانوذرات روی با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانیده شد تا غلظت $۱۰^{-۳}$ مولار نانوذرات روی حاصل شد. این روند تا زمان ایجاد غلظت $۱۰^{-۶}$ انجام شد.

برای فرایند انجماد، نمونه‌های منی گروه‌های آزمایشی با غلظت $۱\times ۱۰^{۹} \leq$ اسپرم در میلی‌لیتر در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری پر و بسته‌بندی شدند. سپس دمای پایوت‌ها به ۴ تا ۶ درجهٔ سانتی‌گراد رسانیده شد و پس از گذشت ۳/۵ ساعت، پایوت‌ها به دستگاه انجماد اسپرم منتقل شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، با رسیدن دمای پایوت‌ها به ۱۴۰- درجهٔ سانتی‌گراد، نمونه‌ها به ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجهٔ سانتی‌گراد انتقال یافتند. ۷۲ ساعت پس از انجماد نمونه‌ها یخ‌گشایی شدند و میزان تحرک اسپرم‌ها (شامل حرکت کل و پیشرونده) با نرم‌افزار کاسا (CEROS, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA Version 12.3 Animal) ارزیابی شد.

میزان زنده‌مانی اسپرم، یکپارچگی غشا، مورفولوژی، و میزان فعالیت میتوکندریایی اسپرم‌ها در نمونه‌های اسپرم مربوط به بیشترین ($۱۰^{-۲}$ مولار نانوروی) و کمترین ($۱۰^{-۶}$ مولار نانوروی) غلظت‌های نانوذرات روی به‌همراه گروه شاهد ارزیابی شدند. از رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین برای ارزیابی میزان زنده‌مانی اسپرم استفاده شد. برای این کار ۱۰ میکرولیتر از نمونهٔ اسپرم روی لام قرار داده شد و سپس رنگ آماده‌شدهٔ ائوزین-نگروزین روی نمونه ریخته شد و به‌وسیلهٔ سر سمپلر نمونهٔ اسپرم با رنگ به‌آرامی مخلوط شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونهٔ اسپرم رنگ‌آمیزی‌شده برداشته شد و روی لام جدید قرار گرفت و با یک لام دیگر به‌آرامی گسترش داده شد. پس از خشک‌شدن، لام در زیر میکروسکوپ قرار داده شد و از هر لام ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و فراوانی اسپرم‌های رنگ‌شده و رنگ‌نشده محاسبه شد. اسپرم‌هایی که هستهٔ آن‌ها رنگ نگرفته یا فقط بخشی از گردن آنها رنگ گرفته بود به‌عنوان اسپرم زنده درنظر گرفته شد.

برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از آزمایش هاس استفاده شد. این آزمایش براساس اسمولاریتهٔ محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. فروکتوز و سیترات سدیم به‌ترتیب به میزان ۰/۹ گرم ۰/۴۹ گرم در۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر از اجزای تشکیل‌دهندهٔ محیط هاس هستند که اسمولاریتهٔ ۱۰۰ میلی اسمول در کیلوگرم برای محیط هایپواسمتیک هاس ایجاد می‌کنند. بعد از یخ‌گشایی نمونه‌ها محتوی پایوت‌ها به داخل میکروتیوب دو میلی‌لیتری تخلیه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس قسمت بالای میکروتیوب که حاوی رقیق‌کننده بود، جدا شد و ۲۰ میکرولیتر از منی سانتریفیوژشده به ۲۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاس اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس از نمونهٔ انکوبه‌شده سه قطرهٔ جداگانه ۱۰ میکرولیتری تهیه و با میکروسکوپ فازکنتراست ارزیابی شد. در هر لام ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و فراوانی اسپرم‌های با دم گره‌خوردهٔ دارای غشای یکپارچه و همچنین اسپرم‌های با دم گره‌نخوردهٔ دارای غشای غیریکپارچه محاسبه شد.

برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی، ۳۰ میکرولیتر از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۳۰۰ میکرولیتر محلول هانکوک اضافه شد. سپس یک قطره از این محلول همراه اسپرم روی لام قرار گرفت و توسط یک لامل پوشانده شد. از هر لام ۲۰۰ اسپرماتوزوئید زیر میکروسکوپ معکوس شمارش شد تا فراوانی اسپرم‌های غیرطبیعی شامل اسپرم‌های با آکروزوم غیرطبیعی برای هر گروه تعیین شود.

از رودامین-۱۲۳ و پروپیدیم یدید برای ارزیابی فعالیت میتوکندری استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از رودامین-۱۲۳ (۰/۰۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر آب مقطر) به ۵۰۰ میکرولیتر

نمونهٔ رقیق مایع منی (۵۰×۱۰^{۶} اسپرم/ میلی‌لیتر) اضافه شد و نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) در تاریکی انکوبه شدند. سپس به‌مدت سه دقیقه با دور g ۵۰۰ سانتریفیوژ شدند و پلت اسپرم با ۵۰۰ میکرولیتر بافر تریس مجدداً به حالت معلق درآمد. قبل از بررسی فلوسایتومتری نیز پروپیدیوم یدید به نمونه‌ها اضافه شد. رنگ رودامین-۱۲۳ دارای کاتیون فعال در میتوکندری سلول‌های زنده به‌علت انتقال غشایی بالقوهٔ میتوکندریایی انباشته شد.

آزمایش‌ها در پنج تکرار اجرا و داده‌ها در هر مرحله در نرم‌افزار Excel پردازش و با نرم‌افزار آماری SAS و رویهٔ GLM برای مدل ۱ تجزیه و میانگین‌ها با آزمون توکی مقایسه شد:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \qquad (۱)$$

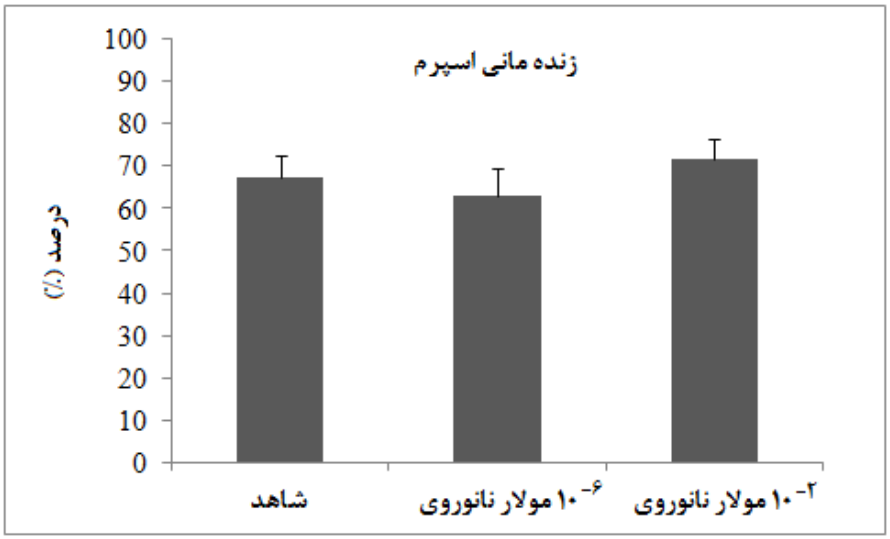
در این رابطه: Y_{ij} مقدار عملکرد صفت وابستهٔ نمونهٔ jام در تیمار iام، μ میانگین جامعه، T_i اثر تیمار، و e_{ij} تأثیرات خطای آزمایشی است.

نتایج و بحث

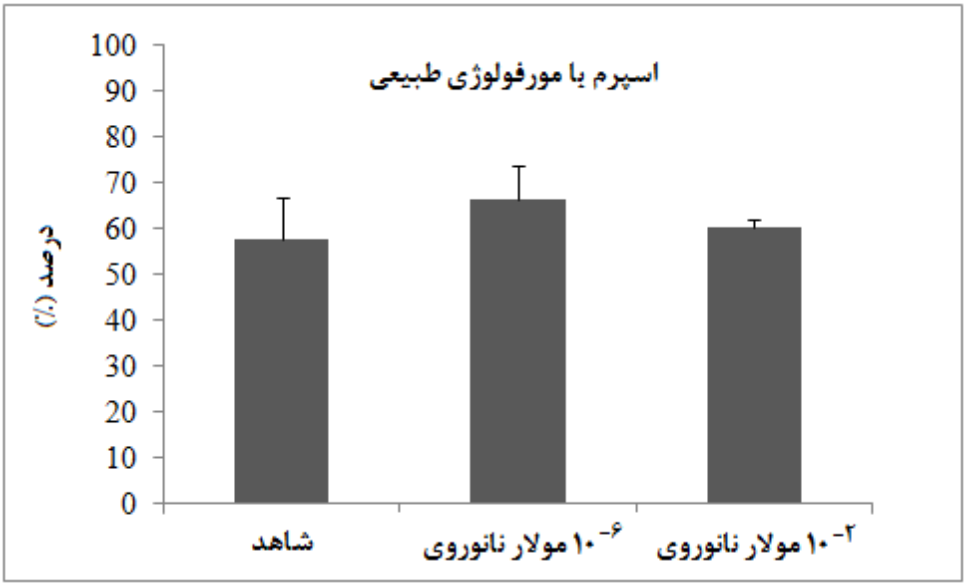
اثر غلظت‌های گوناگون نانوذرات روی بر حرکت کل و حرکت رو به جلو اسپرم گاو معنی‌دار نبود (جدول ۱). تفاوتی در زنده‌مانی و مورفولوژی اسپرم گاو پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی در بین تیمارهای متفاوت مشاهده نشد (شکل‌های ۱ و ۲).

جدول ۱. میانگین (± خطای استاندارد) تحرک اسپرم گاو پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی

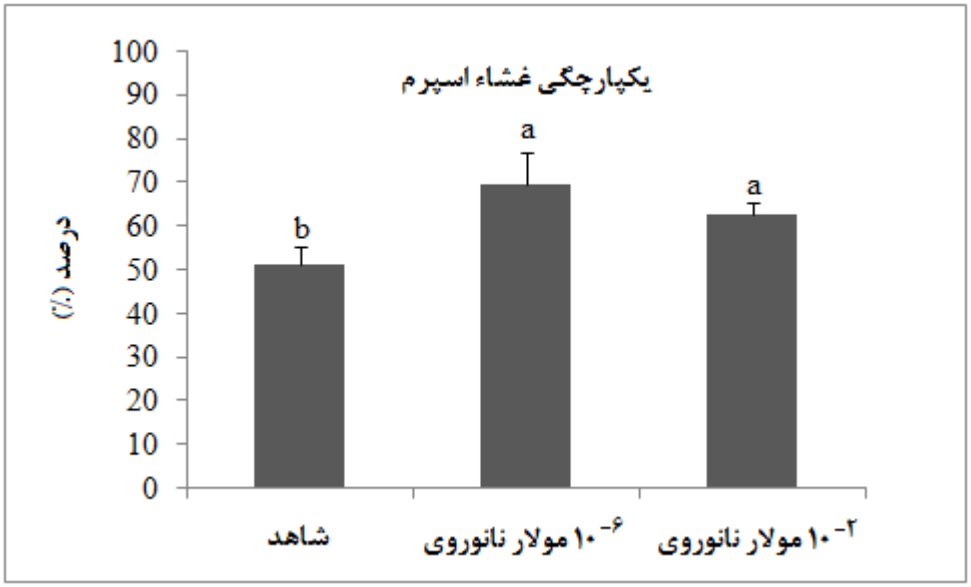
صفات بررسی‌شده	مولار نانو روی					
	شاهد	$۱۰^{-۶}$	$۱۰^{-۵}$	$۱۰^{-۴}$	$۱۰^{-۳}$	$۱۰^{-۲}$
حرکت کل (درصد)	۴۸/۶ ± ۶/۵	۵۶/۸ ± ۷/۸	۵۹/۸ ± ۷/۲	۵۹/۰ ± ۷	۴۹/۶ ± ۶/۸	۵۹/۵ ± ۵/۷
حرکت رو به جلو (درصد)	۳۴/۵ ± ۴/۵	۴۰/۱ ± ۵/۵	۴۱/۲ ± ۶/۲	۴۵/۲ ± ۶/۲	۳۳/۵ ± ۴	۴۰/۹ ± ۵/۷



شکل ۱. زنده‌مانی اسپرم گاو پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی (میانگین±خطای استاندارد).



شکل ۲. اثر افزودن سطوح گوناگون نانوذرات روی به رقیق‌کنندهٔ بایوکسل بر مورفولوژی اسپرم گاو پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی (میانگین ± خطای استاندارد).



شکل ۳. اثر افزودن سطوح گوناگون نانو ذرات روی به رقیق‌کننده بایوکسل بر یکپارچگی غشا اسپرم گاو پس از فرایند انجماد-یخ گشایی (میانگین± خطای استاندارد).

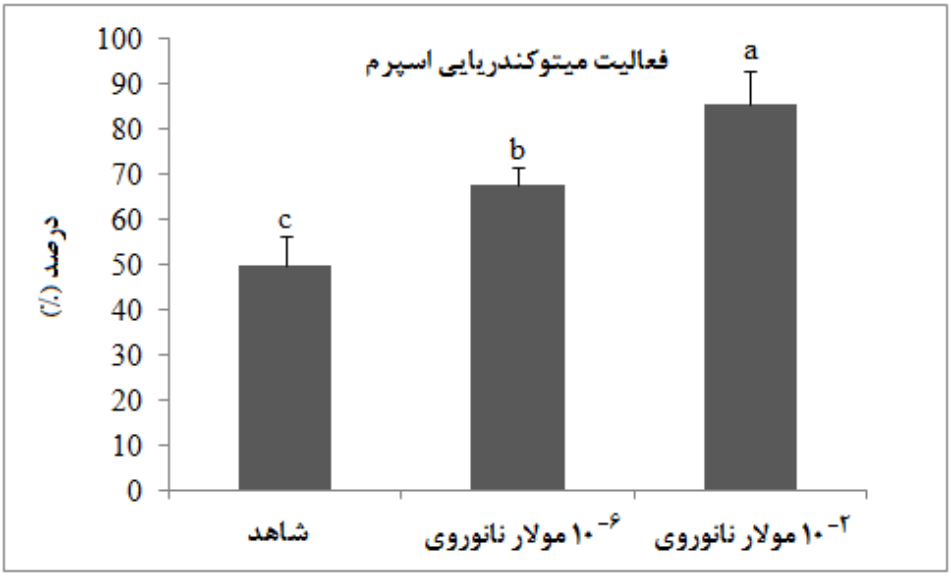
یکپارچگی غشا در گروه‌های $۱۰^{-۶}$ مولار نانوروی و $۱۰^{-۲}$ مولار نانوروی در مقایسه با گروه شاهد (P<۰/۰۵) بهبود یافت (شکل ۳). رقیق‌کنندهٔ حاوی $۱۰^{-۲}$ مولار نانوروی نیز در مقایسه با گروه $۱۰^{-۶}$ مولار نانوروی یکپارچگی غشای اسپرم را بهبود بخشید (P<۰/۰۵).

فعالیت میتوکندریایی اسپرم نیز تحت‌تأثیر غلظت‌های گوناگون نانوذرات روی قرار گرفت (شکل ۴)، به‌طوری‌که فعالیت میتوکندریایی اسپرم‌های گروه‌های $۱۰^{-۶}$ و $۱۰^{-۲}$ مولار نانوروی در مقایسه با گروه شاهد، بیشتر بود ($P<۰/۰۵$).

روی در سمینال پلاسما، دیوارهٔ سلولی، و کروماتین هسته‌ای اسپرم را تثبیت می‌کند (۸). روی منی در انسان نقش مهمی در عملکرد فیزیولوژیکی اسپرم دارد که کاهش سطح آن در کیفیت پایین اسپرم و کاهش شانس باروری نتیجه می‌شود (۸ و ۲۰). سطح کلی روی در منی پستانداران بالاست و مشخص شده است که برای تولید اسپرم بحرانی است، اما گزارش‌های متضادی در زمینهٔ اثر روی منی بر کیفیت اسپرم وجود دارد. اختلاف معنی‌داری بین میزان روی در مردان بارور و نابارور وجود ندارد (۱۸ و ۳۱)، ولی برخی دیگراختلاف معنی‌داری بین آن‌ها پیدا کردند (۱۹).

در تحقیقی در زمینهٔ غلظت روی پلاسمای منی در افراد بارور و نابارور، نتایج نشان داد افراد بارور به‌طور معنی‌داری سطح بالاتری از روی به نسبت افراد نابارور، در پلاسمای منی خود داشتند (۱۰). سطوح بالای گونه‌های فعال اکسیژن در منی ۲۵ تا ۴۰درصد بیماران نابارور شناسایی شد که بر عملکرد اسپرم ازطریق اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها، و DNA تأثیر می‌گذارند. روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد و اثر کمبود روی می‌تواند آسیب اکسیداتیو القاشده توسط گونه‌های فعال اکسیژن را افزایش دهد (۲۳).

نتایج اثر افزودن سطوح گوناگون نانوذرات روی به رقیق‌کنندهٔ بایوکسل بر میزان جنبایی اسپرم گاو پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای گوناگون وجود نداشت. افزودن سطوح متفاوت نانوذرات روی به رقیق‌کنندهٔ بایوکسل اثری بر مورفولوژی و زنده‌مانی اسپرم گاو نداشت. این نتایج با یافته‌های برخی از محققان که گزارش کرده‌اند روی سبب بهبود تحرک (۹، ۱۵، ۱۸، و ۱۹) و مورفولوژی طبیعی (۸، ۱۸، و ۲۹) اسپرم می‌شود، تناقض دارد.



شکل ۴. اثر افزودن سطوح گوناگون نانوذرات روی به رقیق‌کنندهٔ بایوکسل بر فعالیت میتوکندریایی اسپرم گاو پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی (میانگین±خطای استاندارد).

البته در این زمینه مطالعه‌های ضد و نقیض دیگری نیز وجود دارد، به‌عنوان مثال، همسو با نتایج تحقیق حاضر گزارش شده است که استفاده از روی جنبایی و تحرک اسپرم را در مردان کاهش می‌دهد (۱۳). همچنین در مطالعه‌ای دیگر بر میزان روی پلاسمای منی، ارتباط مثبتی بین تولید ضعیف اسپرم و جنبایی ضعیف اسپرم با مقدار پایین‌تر روی در مایع منی افراد بارور مشاهده شد (۳۳). با توجه به نتایج موجود، به‌نظر می‌رسد که غلظت روی استفاده‌شده مسئلهٔ تعیین‌کننده در مطالعه‌های پیشین بوده است که در تمامی مطالعه‌های مشابه باید مدنظر قرار گیرد.

برخی از مطالعات این فرضیه را حمایت می‌کنند که کاهش در غلظت روی می‌تواند سبب اکسیداسیون لیپید و پروتئین‌ها شود، درنتیجه روی نقش مهمی در مهار گونه‌های فعال اکسیژن دارد (۵، ۲۲، و ۲۵).

نتایج اثر افزودن سطوح گوناگون نانوذرات روی به رقیق‌کنندهٔ بایوکسل نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای متفاوت در شاخص کیفی زنده‌مانی اسپرم پس از فرایند انجمادـیخ‌گشایی وجود نداشت. باتوجه به اطلاعات به‌دست‌آمده، این اولین مطالعه‌ای است که به ارزیابی اثر نانوذرات روی بر شاخص‌های کیفیت اسپرم گاو بعد از فرایند انجمادـیخ‌گشایی می‌پردازد و این امر مقایسهٔ نتایج موجود را با یافته‌های قبلی دشوار می‌سازد. با این حال، ترکیبات با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی همچون رزماری می‌توانند سبب بهبود زنده‌مانی اسپرم قوچ پس از فرایند انجمادـیخ‌گشایی شوند (۳۳). نتایج مشابهی نیز با افزودن آنتی‌اکسیدان‌های دیگری چون تائورین، هایپوتائورین، گلوتامین، سیستئین، ترهالوز، و هیالورونان به رقیق‌کنندهٔ قبل از فرایند انجمادـیخ‌گشایی نیز دیده شد (۲۶) که با مطالعهٔ حاضر در تناقض است. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های خوراکی مانند ویتامین E و سلنیوم نیز سبب افزایش حرکت پیش‌روندهٔ اسپرم در اسب شد (۹). البته شاید به‌دلیل تفاوت ماهیت مولکولی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نام‌برده‌شده، مقایسهٔ نتایج آنها با هم نیز منطقی نباشد.

در مورد تست هاس که به نوعی حاکی از سلامت غشای اسپرم بود، باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده از سنجش این تست چنین برآورد شد که نانوذرات روی در هر دو سطح استفاده‌شده ($۱۰^{-۶}$ و $۱۰^{-۲}$ مولار) سبب افزایش سلامت غشای اسپرم‌های گاو پس از فرایند انجمادـیخ‌گشایی شد. در حمایت از نتایج به‌دست‌آمده، پیش از این گزارش شده بود که رزماری در پلاسمای مایع منی، غشای اسپرم را پایدار می‌سازد و از تجزیهٔ آن‌ها جلوگیری می‌کند (۲).

اسپرم از آدنوزین تری‌فسفات (ATP) به‌عنوان منبع انرژی پایه برای اعمال سلول و زنده‌مانی استفاده می‌کند. اسپرم این انرژی را برای فعالیت‌هایی چون هایپراکتیواسیون و واکنش آکروزومی، برای نفوذ به اووسیت و تحرک نیاز دارد. برای تأمین این انرژی، اسپرم به مواد خارج سلولی نیازمند است (۱). بنابراین کاهش انرژی درنتیجهٔ کاهش در ATP تولیدی، می‌تواند درنهایت کاهش میزان جنبایی اسپرم بعد از فرایند انجمادـیخ‌گشایی را سبب شود. در پژوهش حاضر، نانوذرات روی در هر دو سطح استفاده‌شده سبب افزایش فعالیت میتوکندریایی اسپرم‌های گاو پس از انجمادـیخ‌گشایی شد، هرچند افزایش فعالیت میتوکندریایی مشاهده‌شده منجر به بهبود شاخص‌های جنبایی اسپرم نشد.

براساس مطالعات، در موش همان‌طورکه با تکنیک AMG تشخیص داده شد، میتوکندری اسپرم روی را انباشته می‌کند (۲۸). به علاوه، نوع غشایی روی ناقل پروتئین ZNT-1 در میتوکندری اسپرم موش بیان می‌شود (۱۶). با کنارهم‌گذاشتن این موارد شواهد فراوانی وجود دارد که پیشنهاد می‌کند که میتوکندری ممکن است جایگاهی برای سیستم جابه‌جایی روی باشد و این روی به‌تنهایی ممکن است نقش مهمی در عملکرد میتوکندریایی سلول‌های جنسی ایفا کند (۲۸).

بهبود سلامت غشا و فعالیت میتوکندریایی اسپرم با اضافه‌کردن ریزمغذی روی به شکل نانو شاید بتواند سبب افزایش بازده لقاح برون‌تنی تخمک گاو نیز شود. ولی برای اثبات تأثیرات مفید استفاده از نانوذرات روی در رقیق‌کنندهٔ اسپرم گاو به مطالعهٔ بیشتر در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی نیاز دارد.

منابع

۱. ضمیری م ج (۱۳۸۵) فیزیولوژی تولید مثل. چاپ اول، انتشارات حق‌شناس، رشت، ۴۸۸ ص.

2. Abou-Haila A and Tulsiani DRP (2000) Mammalian Sperm Acrosome Formation Content and Function. Archives of Biochemistry and Biophysics. 379(2): 173-182.

3. Aitken R, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennigs Z and Irvine DS (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional com-petence and genomic integrity of human spermatozoa. Biology of Reproduction. 59(5): 1037-1046.

4. Auld DS (2009) The ins and outs of biological zinc sites. Biometals. 22(1): 141-148.

5. Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Tran MX, Krohn RL and Ray SD (1998) Protective effects of zinc salts on TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation, glutathione depletion, DNA damage and peritoneal macrophage activation in mice. Gen Pharmacol. 30(1): 43-50.

6. Bedwal RD and Bahuguna A (1994) Zinc, copper and selenium in reproduction. Experiential. 50(15):626-40.

7. Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C and Sirard MA (2001) Thiols preventH2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen.Theriogenology. 56(2): 275-286.

8. Caldamone AA, Freytag MK and Cockett AT (1979) Seminal zinc and male infertility. Urology. 13(3): 280-1.

9. Chia SE, Ong C, Chua L, Ho L and Tay S (2000) Comparison of zinc concentration in blood and seminal plasma and various sperm parameters between fertile and infertile men. Andrology. 21(1): 53-7.

10. Colagar AH, Marzony ET and Chaichi MJ (2009) Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. Nutrition. 29(2): 82-88.

11. Contri A, De Amicis I, Molinari A, Faustini M, Gramenzi A, Robbe D and *et. Al.* (2015) Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. Theriogenology. 75(7): 1319-26.

12. Crabo BG (1991) Preservation of boar semen: a worldwide perspective. In: Johnson L. A, D Rath, Paul Parey, Berlin. Pp. 3-9.

13. Danscher G, Hammen R, Fjerdingstad E and Rebbe H (1978) Zinc content of human ejaculate and the motility of sperm cells. Andrology. 1(12): 576-581.

14. Douard V, Hermier D, Magistrini M, Labbe C and Blesbois E (2004) Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology. 61(1): 1-13.

15. Edorh AP, Tachev K, Hadou T, Gbeassor M, Sanni A and Creppy EE (2003) Magnesium content in seminal fluid as an indicator of chronic prostatitis. Cellular and Molecular Biology. 49(4): 419-23.

16. Elgazar V and Razanov V (2005) Zinc-regulating proteins, ZnT-1, and Metallothionein I/II are present in different cell populations in the mouse testis. Histochemistry and Cytochemistry. 53(7): 905-912.

17. Endre L, Beck F and Parsad A (1999) The role of zinc in human health. Trace Elements in Experimental Medicine. 3(11): 333-375.

18. Fuse H, Kazama T, Ohta S and Fujiuchi Y (1999) Relationship between zinc concentrations in seminal plasma and various sperm parameters. International Urology and Nephrology. 31(3): 401-8.

19. Mankad M, Sathawara NG, Doshi H, Saiyed HN and Kumar S (2006) Seminal plasma zinc concentration and α-glucosidase activity with respect to semen quality. Biological Trace Element Research. 110(2): 97-106.

20. Marmar JL, Katz S, Praiss DE and De Benedictis TJ (1975) Semen zinc levels in infertile and post vasectomy patients and patients with prostatitis. Fertility and Sterility. 26(11): 1057-63.

21. Millar MJ, Fischer MI, Elcoate PV and Mawson CA (1958) The effect of dietary zinc deficiency on the reproductive system of the male rat. Biochemistry and Physiology. 36(6): 557-69.

22. Oteiza PI, Olin KL, Fraga CG and Keen CL (1995) Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. Nutrition. 125(4): 823-9.

23. Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ and Agarwal A (1997) Seminal reactive oxygen species, sperm motility, and morphology in men with spinal cord injury. Fertility and Sterility. 67(6): 1115-20.

24. Parsad AS (1991) Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. Clinical Nutrition. 53(2): 403-12.

25. Powell SR (2000) The antioxidant properties of zinc. Nutrition. 130(5): 1447S-1454S.

26. Salamon S and Maxwell WMC (2000) Storage of ram semen. Animal Reproduction Science. 62(1-3): 77-111.

27. Sanchez PLG, Setchell BP and Maxwell WMC (1997) Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen semen of ram spermatozoa. Reproduction Fertility and Development. 9(7) 689-696.

28. Sonoko Y, Chiemi M, Kazuya K, Fritzie T, Tetsuro A, Shinsuke T and Takeshi M (2009) Zinc is an essential trace elemnt for spermatogenesis. Proceeding of the National Academy of Science. 106(26): 10589-10864.

29. Stankovic H and Mikac-Devic D (1976) Zinc and copper in human semen. Clinica Chimica Acta. 70(1):123-6.

30. Stoltenberg M and *et. al.* (1997) Autometallographic demonstration of zinc ion in rat sperm cell. Molecular Human Reproduction. 3(9):763-767.

31. Wong WY, Flik G, Groenen PM, Swinkels DW, Thomas CM and Copius- Peereboom JH (2001) The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. Reproductive Toxicology. 15(2): 131-6.

32. Zago MP and Oteiza PI (2001) The antioxidant

properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. Free Radical Biology and Medicine. 31(2): 266-74.

33. Zanganeh Z, Zhandi M, Zare-Shahneha A, Najafi A, Nabi MM, Mohammadi-Sangcheshmeh A (2003) Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation?. Small Ruminant Research. 114(1): 120-125.

34. Zhao RP and Xiong CL (2005) Zinc content analysis in serum, seminal plasma and spermatozoa of asthenozoospermic and oligoasthenozoospermic patients. National Journal of Andorology. 11(9): 680-2.