کنگره ملی فناوری های نوین در علوم دامی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)
۲۹ و ۳۰ آبان ماه ۱۳۹۲

اثر پروتئین‌های تام مایع منی بر سلامتی غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیدیمی قوچ پس از ٤ ساعت ذخیره‌سازی

سید مسعود موسوی[1*]، محمد روستایی علی مهر[2]، محمد قدمیاری[3]
گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
نویسنده مسئول: *mousavim13@yahoo.com*

چکیده

این بررسی به منظور تعیین اثر پروتئین‌های مایع منی بر سلامتی غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیدیمی قوچ انجام شد. بیضه ۵ راس قوچ در طی ۵ نوبت از کشتارگاه تهیه شد.اسپرم اپیدیدیمی از دو بیضه استخراج شد و بعد از تجمیع به ۳ بخش و هر بخش به ۳ قسمت مساوی تقسیم شد. مقادیر صفر، ۳۰۰ و ٦۰۰g/mLμ پروتئین تام به هر قسمت اضافه شد و غلظت اسپرم به ۱۰۰×۱۰^{٦} در میلی‌لیتر رسید. نمونه‌ها به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷°C و ۵٪ CO_2 ذخیره شدند و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم هر قسمت مورد بررسی قرار گرفت. کمترین میزان سلامتی غشای پلاسمایی (٦۵/٦٪) در ٦۰۰g/mLμ پروتئین تام مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). بنابراین پروتئین‌های مایع منی موجب کاهش سلامتی غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیدیمی قوچ در طی ذخیره‌سازی می‌شود.

واژه های کلیدی: *:پروتئین‌های تام مایع منی،اسپرم اپیدیدیمی، سلامتی غشای پلاسمایی*

مقدمه

ساختار غشای پلاسمایی اسپرم که برای موفقیت در ذخیره‌سازی دارای اهمیت است در طی انجماد و یخ‌گشایی آسیب می‌بیند. انجماد اسپرم قوچ سبب القای تغییرات ساختاری و بیوشیمیایی در اسپرم می‌شود که موجب آسیب‌های غشای آکروزوم و کاهش سلامت غشای پلاسمایی می‌گردد (راسل و همکاران، ۱۹۸۵). مشخص شده است که پروتئین‌های مایع منی گاو در اثر مجاورت با اسپرم موجب افزایش خروج کلسترول از غشای پلاسمایی و کاهش نسبت کلسترول به فسفولیپید غشاء و نهایتا موجب کاهش سلامتی غشای پلاسمایی اسپرم می‌شود (منجونات و ترین، ۲۰۰۲). مایع منی قوچ حاوی حاوی مقدار زیادی (15–20 mg/ml) پروتئین است (برگرون و همکاران، ۲۰۰٤). خروج کلسترول از غشاء اسپرم طی ذخیره سازی و انجماد منی، سبب بروز ظرفیت-پذیری و واکنش آکروزومی زود هنگام می‌شود و در نتیجه سلامتی غشای پلاسمایی اسپرم را کاهش می‌دهد (وایت و اسکافرسومی، ۲۰۰۷). کلسترول نقش کلیدی در سیالیت، پایداری و سازماندهی لیپیدهای غشا پلاسمایی اسپرم دارد (وایت و اسکافرسمی، ۲۰۰۷). بنابراین حفظ کلسترول غشای پلاسمایی اسپرم قوچ و ممانعت از خروج آن طی روند ذخیره سازی جهت افزایش ماندگاری اسپرم اهمیت دارد. بنابراین هدف از این تحقیق بررسی اثر غلظت پروتئین‌های تام مایع منی بر سلامتی غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیدیمی قوچ پس از ٤ ساعت ذخیره‌سازی است.

مواد و روش‌ها

جهت تهیه‌ی مایع منی، انزال‌ها از ٤ قوچ به صورت ۲ بار در هفته به‌وسیله‌ی واژن مصنوعی، جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها برای ۱۰دقیقه در دمای ٤°C با سرعت g× ۷۰۰ سانتریفیوژ می‌شوند و سپس مایع رویی جدا شده و در همان شرایط با سرعت g× ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ، و مایع شفاف رویی آن که همان مایع منی فاقد اسپرم بود در دمای ۲۰°C- ذخیره‌سازی شد. برای جداسازی پروتئین‌ها، ۹حجم اتانول مطلق به مایع منی اضافه شده و برای ۹۰ دقیقه در دمای ٤°C مخلوط شد. سپس نمونه‌ها برای ۱۰ دقیقه در دمای ٤°C در g× ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ، و مایع رویی حذف شده و ۹ برابر حجم مایع منی اولیه به آن اتانول افزوده و ۳ مرحله‌ی سانتریفیوژ با همان شرایط تکرار می‌شود. رسوب بدست آمده در آمونیوم بیکربنات ۵۰ میلی مولار حل می‌شود. محلول بدست آمده در کیسه‌ی دیالیز ریخته شده و سپس برای ٢٤ ساعت در بافر تریس ۲۰ میلی مولار در دمای ٤°C قرار داده و با روش بردفورد تعیین غلظت گشت. محلول پروتئینی بدست آمده در دمای۲۰°C- ذخیره شد.جهت استخراج اسپرم اپیدیدمی، بیضه قوچ‌ها از کشتارگاه تهیه و با سرم فیزیولوژی در دمای ۳۷°C به آزمایشگاه حمل شد. دم اپیدیدیم بیضه به‌وسیله‌ی اسکالپل، پنس و قیچی جدا شد و در ۵ میلی لیتر محلول تریس-فروکتوز قرار داده و به قطعات کوچکتر خرد شد تا اسپرم‌ها از لوله‌های اپیدیدیمی خارج شوند. جهت تغلیظ اسپرم‌ها، نمونه‌ها با قدرت g×۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷°C سانتریفیوژ شد و رسوب‌ها به وسیله بافر تریس-فروکتوز تا ۱۰۰×۱۰^{٦} رقیق شد نمونه‌های اسپرم اپیدیدیمی استخراج شده به سه بخش و هر بخش به سه قسمت ۱ میلی‌لیتری تقسیم شدند. بافر تریس حاوی صفر ، ۳۰۰ و ٦۰۰g/mLμ پروتئین تام مایع منی به نسبت ۱ به ۱ (حجم/حجم) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷°C و ۵٪ CO_2 ذخیره شدند و سلامتی غشای پلاسمایی هر قسمت پس از ٤ ساعت انکوباسیون به روش جیندران و همکاران (۱۹۹۲) اندازه‌گیری شد. نتایج با استفاده از نرم-افزار SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی با رویه‌ی GLM بررسی شد (P<۰/۰۵).

نتایج و بحث

اثر افزودن پروتئین‌های تام مایع منی نشان داد بیشترین و کمترین میزان سلامتی غشای پلاسمایی در مقادیر صفر و ٦۰۰g/mLμ پروتئین تام مشاهده شد (جدول ۱، P<۰/۰۵). پروتئین‌های مایع منی گاو با اتصال به غشاء اسپرم پس از انزال باعث تحریک خروج کلسترول و فسفولیپیدها از غشای پلاسمایی و موجب کاهش سلامتی غشای پلاسمایی و ماندگاری اسپرم در طی مدت نگهداری می‌شود. مشاهده شده این اثر تحریکی با غلظت پروتئین‌های مایع منی و مدت مجاورت آن‌ها با اسپرم همبستگی مثبت دارد (منجونات و ترین، ۲۰۰۲). تمایل بالای پروتئین‌های مایع منی در پیوند یافتن با غشای پلاسمایی اسپرم، موجب خروج کلسترول و فسفولیپیدها از غشای اسپرم می شود که در شرایط ذخیره سازی باعث کاهش سلامت غشای پلاسمایی میشود (وایت و اسکافرسمی، ۲۰۰۷). با توجه به نتایج این پژوهش، افزایش غلظت پروتئین‌های مایع منی و زمان ذخیره‌سازی، منجر به کاهش سلامتی غشای پلاسمایی اسپرم شد که می‌تواند به دلیل اتصال پروتئین‌ها با غشای پلاسمایی و خروج کلسترول از غشاء و در نتیجه کاهش پایداری اسپرم اپیدیدیمی در طی مدت زمان ذخیره‌سازی باشد.

منابع

Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. Biology of Reproduction, 70: 708-717.

Jeyendran RS,Vanderven HH, Zaneveld LJ. 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. Archives of Andrology 29: 10116.

Manjunath P, Thérien I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid bindingproteins in sperm membrane lipid modification that occursduring capacitation. Journal of Reproductive Immunology, 53: 109-119.

Russel L D, Montag B, Hunt W, Peterson RN. 1985. Properties of boar sperm plasma membranes proteins released by washing and differential solubility in salts, detergents and sensitivity to surface radiolabelling. Gamete Resarch. 11: 237–252.

Witte TS, Schafer-Somi S. 2007. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome of mammalian spermatozoa. Animal Reproduction Science, 102: 181-193.

جدول ۱: اثر مقادیر مختلف پروتئین مایع منی بر درصد سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیدیمی قوچ(Means ±S.E)

پروتئین تام مایع منی (میکروگرم در میلی-لیتر)	سلامت غشای پلاسمایی
۰	۷۳/۲ ± ۱/۰۶۷[a]
۳۰۰	٦۹/٤ ± ۰/۰٦۰[b]
٦۰۰	٦٥/٦ ± ۰/۸۱۲[c]

[a-c]حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).