ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱
صفحه ۲۷۶- ۲۶۹

بررسی اثر محافظتی ویتامین E بر یکپارچگی DNA اسپرم منجمد شده فیل ماهی(*Huso huso*) با استفاده از سنجش کامت قلیایی

سعید مودی[۱]، حمید فرحمند*[۲]، علیرضا میرواقفی[۳]، حمید اسحق زاده[٤]، رضوان الله کاظمی[٥]

۱،۲،۳و۴-به ترتیب دانشجویان کارشناسی ارشد، دانشیاران و دانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران

۵- مربی پژوهشی انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان- رشت

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:E-mail: hfarahmand@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت:۹۰/۵/۱ - تاریخ پذیرش:۹۰/۱۱/۱۸)

چکیده

یک فرضیه در مورد آسیب DNA پس از انجماد اسپرم، اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که در طی فرآیندهای انجماد و یخ گشایی تولید می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظتی ویتامین E به عنوان آنتی اکسیدان بر یکپارچگی ساختار DNA اسپرم فیل ماهی *Huso huso*) پس از انجماد می‌باشد. اسپرم استحصالی برای انجماد به سه بخش تقسیم و با استفاده از محیط انجماد حاوی DMSO به تنهایی به عنوان گروه شاهد یا به همراه ویتامین E در غلظت های ۶۰۰ و ۱۲۰۰ µM رقیق‌سازی شده و به مدت ۳۰ روز در تانک ازت مایع نگهداری گردید. از روش میکروالکتروفورتیک کامت برای بررسی یکپارچگی DNA اسپرم فیل ماهی (*Huso huso*) در پاسخ به فرایند انجماد استفاده گردید که بر مبنای اندازه‌گیری آسیب های منعکس شده بصورت شکست رشته ای در سلول ها می‌باشد. طبق نتایج سطح آسیب DNA در اسپرم یخ گشایی شده گروه شاهد بطور معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) نسبت به میزان اندازه گیری شده در اسپرم تازه بالاتر بود. افزودن ویتامین E نیز اثری وابسته به دز بر میزان آسیب DNA داشت بطوریکه در غلظت ۶۰۰µM کاهش غیر معنی‌دار در سطح آسیب DNA نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ولی در غلظت ۱۲۰۰ µM افزایش قابل ملاحظه‌ای در آسیب DNA ارزیابی شد که احتمالاً به دلیل خاصیت پرواکسیدانی ناشی از دز بالای ویتامین E بود. بعلاوه بر طبق نتایج میزان کاهش تحرک ناشی از فرایند انجماد- یخ گشایی با شکست رشته DNA ارتباط داشت.

واژه‌های کلیدی

**آسیب DNA،
انجماد اسپرم،
سنجش کامت،
فیل‌ماهی (*Huso huso*)،
ویتامین E.**

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.8.7]

مقدمه

یکی از فناوری‌های مهم جهت حفظ و نگه داری ذخایر ژنتیکی و افزایش ماندگاری اسپرم حفاظت انجمادی می‌باشد که تا به امروز در بیش از ۲۰۰ گونه‌ی ماهی صورت گرفته است (Billard et al. 2004). اما علی‌رغم مزایای این تکنیک گزارش های زیادی مبنی بر کاهش کیفیت اسپرم طی انجماد وجود دارد که لزوم بررسی بیشتر روی عوامل آسیب رسان و حذف آن ها را روشن می‌کند (Horvath and Urbanyi 2000; Fraser et al. 2006).پارامترهایی که پس از انجماد- یخ‌گشایی برای ارزیابی کیفیت اسپرم استفاده می‌شوند را می‌توان به چهار دسته اصلی تقسیم کرد: ۱) آسیب مورفولوژیک ۲) اختلال فیزیولوژیک ۳) تغییرات بیوشیمیایی و متابولیک ۴) آسیب DNA (Jun et al. 2006). تا کنون مطالعات بسیاری جهت بررسی تأثیر انجماد روی کیفیت اسپرم ماهیان انجام گرفته است ولی یکپارچگی DNA[1] اسپرم- که برای انتقال درست اطلاعات ژنتیکی به نتاج حیاتی است- بندرت مورد توجه و بررسی قرار گرفته است (Cabrita et al. 2005; Kopeika et al. 2005; Jun et al. 2006; Li et al. 2008). در حالی که بنظر می‌رسد بهترین شاخص در بحث کیفیت اسپرم منجمد شده برای موفقیت تولید مثل، یکپارچگی DNA باشد (Li et al. 2008)، تا جایی که طبق نظر بعضی از پژوهشگران این عامل نسبت به سایر پارامترهای اسپرمی نظیر تحرک، نشانگر بهتری برای عملکرد اسپرم بوده (Tuncer et al. 2010) و امروزه به عنوان یکی از شاخص‌های مهم کیفیت مایع سمینال در ارزیابی توان باروری جنس نر شناخته می‌شود. از طرف دیگر اسپرم برخلاف اکثر سلول‌های سوماتیک، سیستم مؤثری برای ترمیم آسیب DNA ندارد (Genesca et al. 1992)، بنابراین حفاظت کامل از DNA باید جزو اولویت‌ها در زمان طراحی پروتکل انجماد اسپرم باشد (Pérez-Cerezales et al. 2010). در گذشته ارزیابی آسیب DNA اسپرم به علت فشردگی شدید کروماتین هسته آن دشوار بود (Lopez-Fernandez et al. 2008) و عمدتاً محدود به عملیات لقاح و مشاهده آسیب های کرومزومی نتایج حاصله از اسپرم های انجماد-یخ گشایی شده می‌شد (Mirzoyan et al. 2006) ولی در سال‌های اخیر ورود زیست فناوری به عرصه آبزی پروری و استفاده از روش‌های تخصصی جدید جهت ارزیابی کیفیت مایع سمینال در سطح مولکولی، امکان شناسایی انواع مختلف آسیب به DNA را فراهم آورده و سبب پیشرفت و افزایش کارائی پروتکل‌های انجماد اسپرم گردیده است (Cabrita et al. 2010). از مهمترین روش‌های تعیین آسیب DNA می‌توان به سنجش کامت (SCGE)[2] اشاره نمود که بر مبنای اندازه گیری شکستگی های رشته DNA در سلول می‌باشد (Cabrita et al. 2010) و استفاده از آن در مطالعات مربوط به اسپرم ماهیان به چند سال اخیر محدود می‌شود (Cabrita et al. 2005; Ciereszko et al. 2006; Jun et al. 2006; Li et al. 2008; Perez-Cerezales et al. 2010).

یکی از فرضیه های جدید در مورد آسیب DNA ناشی از انجماد اسپرم، اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)[3] است که در طی فرایندهای انجماد و یخ گشایی و شوک های سرمایی و فشار اسمزی تولید می‌شود (Labbe et al. 2001; Mirzoyan et al. 2006). قرارگیری DNA در معرض تنش اکسیداتیو ناشی از ROS منجر به انواع مختلفی از آسیب می‌گردد که مهمترین آن ایجاد شکستگی در یک یا هر دو رشته DNA است (Slupphaug et al. 2003; Pérez-Cerezales et al. 2009). البته مکانیسم‌های دیگری به غیر از استرس اکسیداتیو نظیر آسیب‌های مکانیکی و صدمه به پروتئین‌های کروماتین نیز می‌توانند در شکسته شدن DNA ناشی از انجماد درگیر باشند که اهمیت کمتری دارند (Pérez-Cerezales et al. 2009).دی متیل سولفوکساید (DMSO)[4] از رایج‌ترین مواد محافظ سرمایی[5] می‌باشد و بهترین بازدهی حفاظتی را در نگه داری اسپرم تاسماهیان دریای خزر[6] دارد (Cherepanov and Kopeika 1999; Billard et al. 2004). اما گزارشاتی مبنی بر اینکه این ماده رادیکال آزاد هیدروکسیل (OH·) تولید می‌کند، منتشر شده است (Miller and Cornwell 1978)، لذا توصیه شده که در صورت استفاده از این ماده به عنوان محافظ سرما، از آنتی اکسیدان ها به همراه آن استفاده شود (Martínez-

[1] DNA Integrity

[2] Single Cell Gel Electrophoresis
[3] Reactive Oxygen Species
[4] Dimethyl sulfoxide
[5] Cryoprotectants
[6] Ponto-Caspian sturgeon

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.8.7]

Páramo et al. 2009). آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که با جمع آوری ROS از محیط، موجب خنثی سازی و حذف آنان از درون و برون سلول ها می‌شوند. از مهمترین آنتی اکسیدان های بکار برده شده برای این منظور می‌توان به ویتامین E اشاره نمود که به علت محلول در چربی بودن می‌تواند از غشاء اسپرم عبور کرده و در نتیجه تأثیر مستقیم و بیشتری را در حذف رادیکال های آزاد داشته باشد (Upreti et al. 1997). تا کنون مطالعات متعددی در زمینه اثر آنتی اکسیدان ها بر کاهش اثرات شوک سرمایی انجماد اسپرم در پستانداران از جمله انسان (Kalthur et al. 2010)، گاو (Arshami et al. 2006)، گراز (Breininger et al. 2005) و قوچ (Andreea and Stela 2010) صورت گرفته است. ولی در حیطه آبزیان، گزارشات محدودی در زمینه تأثیر محافظتی اینگونه مواد بر پارامترهای کیفی اسپرم ماهی نظیر یکپارچگی DNA وجود دارد (Pérez-Cerezales et al. 2009) که از آن جمله می‌توان به مطالعات صورت گرفته بر روی گونه های تاس ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedti*) (Mirzoyan et al. 2006)، شانک (*Sparus aurata*) وسیم دریایی (*Dicentrarchus labrax*) اشاره نمود (Cabrita et al. 2011). لذا هدف از این مطالعه ارزیابی اثر محافظتی ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان فیزیولوژیکی شناخته شده بر یکپارچگی ساختار DNA اسپرم منجمد شده فیل ماهی (*Huso huso*) توسط سنجش کامت بود.

مواد و روش‌ها

بطور خلاصه اسپرم گیری با تزریق هیپوفیز جهت القای رسیدگی جنسیو سپس بیهوش کردن مولد آماده فیل ماهی (*Huso huso*) پرورشی (۹ ساله با وزن ۴۵ کیلوگرم) نگه‌داری شده در کارگاه انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت صورت گرفت. تحرک و یکپارچگی DNA اسپرم تازه پس از گذشت چند ساعت مورد بررسی قرار گرفت. مابقی اسپرم ها به سه گروه تقسیم و با استفاده از محیط انجماد حاوی ۲۳/۴ mM بافر تریس، ۲۰ درصد زرده تخم مرغ، ۱/۸ mM ساکاروز و ۱۵ درصد DMSO تنها (بعنوان گروه شاهد) یا به همراه ویتامین E (در غلظت های ۶۰۰ یا ۱۲۰۰ mM) به نسبت ۱:۱ رقیق‌سازی شده و در لوله های نازک پلاستیکی (پایوت[1]) ۰/۵ میلی لیتری با رنگ های مختلف ذخیره‌سازی و پس از سرمادهی تدریجی و رسیدن به برودت ۱۹۶- درجه سانتیگراد برای نگهداری طولانی مدت وارد تانک حاوی ازت مایع شد (Ahmadifakhabi et al. 2009). پس از گذشت ۳۰ روز از شروع نگه داری، اسپرم ها در بن ماری با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد بمدت ۲۰ ثانیه انجمادزدایی شده و تحرک و یکپارچگی DNA بصورت همزمان مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی تحرک، ۱۰ µl مایع سمینال (تازه یا انجماد زدایی شده) را با ۱۰۰ µl محلول فعال کننده (آب) مخلوط و بلافاصله تحرک با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت (Ahmadifakhabi et al. 2009). اندازه‌گیری آسیب DNA اسپرم به روش آزمون کامت قلیایی طبق روش (Li et al. 2008) صورت گرفت. بطور اجمالی ۵۰ µl اسپرم تازه (۲۰۰ µl منجمد شده) با ۵ ml بافر نمکی فسفات (فاقد کلسیم و منیزیم) رقیق سازی شده و ۱۰۰ µl از این سوسپانسیون با ۸۰۰ µl آگارز ۰/۷۵ درصد نقطه ذوب پایین[2] در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط شده و سریعاً روی لام سمباده‌ای منتقل و روی آن لامل قرار داده شد و در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای یخچال جهت سفت شدن و چسبیدن آگارز نگه داشته شد. سپس لامل برداشته شده و لام به مدت ۶۰ دقیقه در بافر لیز کننده خنک با pH=۱۰، حاوی ۲/۵ M کلرید سدیم، ۱۰۰ mM EDTA، ۱۰ mM تریس، یک درصد سدیم لوریل سارکوزان[3] که به فاصله کوتاهی قبل از انجام آزمون به آن تریتون ۱۰۰-x به نسبت یک درصد و DMSO به نسبت ۱۰ درصد اضافه شده بود، جهت حذف سیتوپلاسم و غشای اسپرم قرار گرفت. در ادامه برای باز شدن پیچش مولکول DNA لام ها بطور افقی در تانک الکتروفورز حاوی بافر قلیایی با pH=۱۲ حاوی یک میلی مولار EDTA و ۳۰۰ mM NaOH بمدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس در همان تانک الکتروفورز به منبع تغذیه متصل و با شرایط ۲۵ ولت و ۳۰۰ میلی آمپر به مدت ۲۰ دقیقه الکتروفورز انجام شد. لام ها در ادامه در بافر خنثی کننده (pH=۷/۵ حاوی تریس ۰/۴ M) سه مرتبه و هر بار به مدت ۱۰

[1] Straw
[2] Low melting point agarose
[3] Sodium lauryl sarcosinate

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.8.7]

دقیقه شستشو داده شده و برای فیکس کردن در اتانول خالص به مدت ۵ دقیقه قرار داده شده و بعد در مجاورت هوا خشک شدند. قبل از مشاهده لام ها توسط میکروسکوپ با افزودن رنگ اتیدیم بروماید (۲۰µg/ml) رنگ آمیزی شده و به کمک میکروسکوپ اپی فلوئورسانس (Zeiss, Germany)، تصاویر دیجیتال از نمونه-های هر لام تهیه شد (شکل ۱). برای هر تیمار ۳ عدد پایوت و از هر پایوت ۳ عدد لام تهیه شد که در هر کدام ۱۰۰ سلول بصورت تصادفی در نقاط مختلف لام مورد بررسی قرار گرفت. یکی از مهمترین پارامترها که قضاوت در مورد میزان آسیب وارده به DNA بر مبنای آن انجام می‌شود، درصد کمی DNA در دنباله[1] ($\%DNA_T$) است (Konca et al. 2003)، که توسط نرم افزار Comet Score™ V 1.5 بر طبق رابطه زیر (معادله ۱) مورد ارزیابی قرار گرفت که در آن T دنباله[2] و H سر[3] کامت است.

معادله ۱ $\%DNA_T = 100 \times (DNA_C — DNA_H) / DNA_C$

لازم به ذکر است که سلول های با DNA_T بالای ۷۵ درصد – به عنوان شاخص آپوپتوزیس– مورد بررسی و آنالیز قرار نگرفتند. پس از اندازه‌گیری فاکتورهای مطرح شده و ثبت آنها بصورت میانگین ± انحراف معیار در سطح ۹۵ درصد ($P < ۰/۰۵$) توسط آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS با یکدیگر مقایسه شدند. نمودارها نیز با استفاده از برنامه EXCEL ترسیم شد.

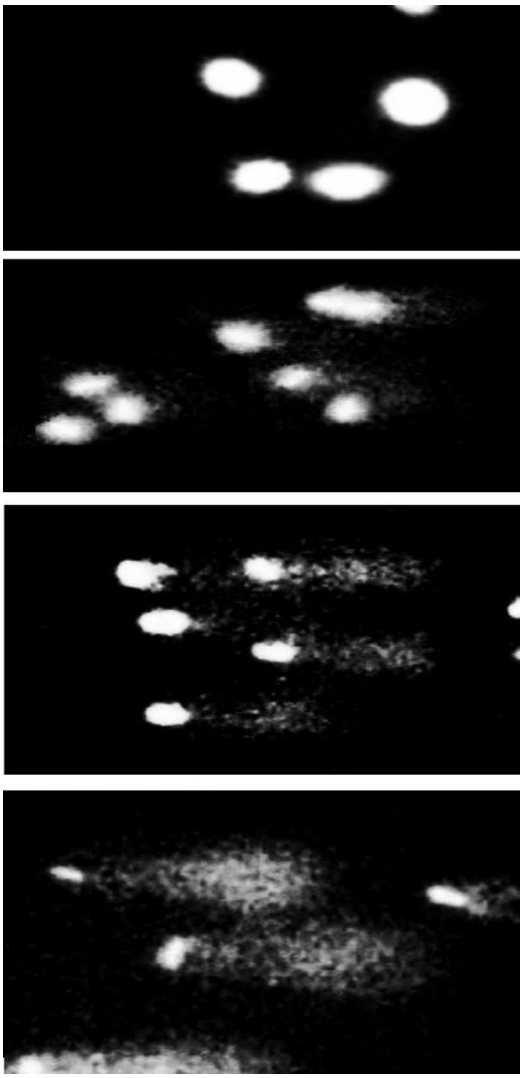
نتایج و بحث

نتایج نشان داد که بین گروه شاهد و اسپرم تازه از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها اختلاف معنی دار آماری وجود داشت ($P < ۰/۰۵$). از طرف دیگر بین زمان و درصد تحرک اسپرم های گروه شاهد و گروه حاوی ۶۰۰ µM ویتامین E اختلاف معنی دار وجود نداشت ولی گروه حاوی ۱۲۰۰ µM ویتامین E با گروه شاهد از نظر درصد تحرک اختلاف معنی دار آماری ($P < ۰/۰۵$) داشتند (جدول ۱).

از نظر آسیب DNA نیز بر طبق نتایج، سطح آسیب ها در اسپرم گروه شاهد بطور معنی داری نسبت به اسپرم تازه بالاتر بود،

جدول ۱– مقایسه میانگین زمان و درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها قبل و پس از انجماد با محیط های مختلف انجمادی

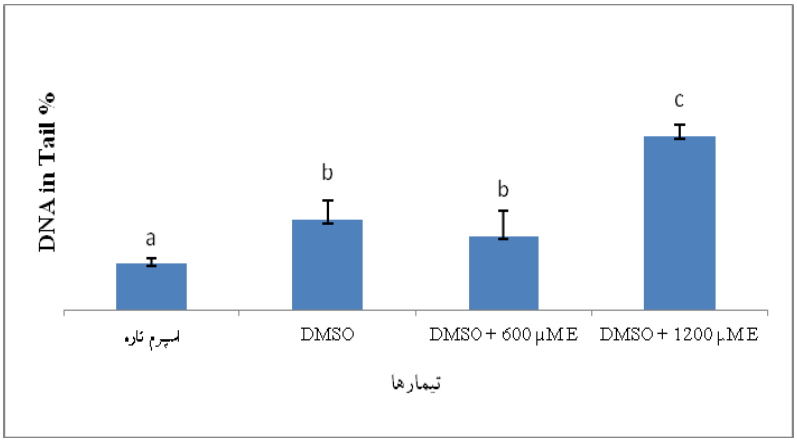
	ماده محافظ سرمایی	زمان تحرک (ثانیه)	درصد تحرک ٪
قبل از انجماد	–	۲۷۵/۲۶ ± ۱۴/۷۳	۸۱/۱۳ ± ۷/۴۱[a]
پس از انجماد	DMSO (شاهد)	۹۳/۷۳ ± ۴۳/۳۱	۲۴/۲۷ ± ۲/۳۲[b]
	DMSO + ۶۰۰ µM E	۱۰۴/۲۴ ± ۱۵/۲۳	۲۷/۳۴ ± ۵/۱۵[b]
	DMSO +۱۲۰۰ µM E	۹۱/۴۳ ± ۲۳/۳۷	۱۰/۴۸ ± ۷/۹۲[c]



شکل ۱– درجه های مختلف آسیب مشاهده شده در DNA اسپرماتوزوئیدها

[1] Percent tail DNA
[2] Tail
[3] Head

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.8.7]



شکل ۲- درصد DNA در دنباله کامت اسپرم فیل ماهی (*Huso huso*) قبل و پس از انجماد با محیط های مختلف انجماد

بطوریکه تفاوت معنی دار آماری ($P < ۰/۰۵$) بین گروه شاهد و گروه دریافت کننده ۶۰۰µM ویتامین E از لحاظ آسیب DNA مشاهده نشد اما در غلظت ۱۲۰۰ µM افزایش سطح آسیب DNA بطور شاخص رخ داد. بعلاوه این میزان آسیب DNA پس از افزودن مکمل آنتی اکسیدانی به محیط انجماد کاهش معنی دار نیافت (شکل ۲).

در طی دهه گذشته پیشرفت های سریع در عرصه بیولوژی ملکولی تولید مثل به ایجاد و تکامل چند روش جهت ارزیابی آسیب ژنومی اسپرم منجر شده است. یکی از این روش ها سنجش کامت می‌باشد که از جمله مزایای آن به عنوان یک روش بسیار مناسب برای سنجش میزان آسیب وارده به ژنوم گونه های مختلف می‌توان به موارد زیر اشاره نمود؛ ۱) نسبت به سایر روش های موجود، تعداد کمی سلول برای انجام این آزمایش مورد نیاز است. ۲) این روش یک روش دقیق و حساس، قابل اطمینان، سریع و کم هزینه برای سنجش شکست تک و یا دورشته‌ای مولکول DNA (یک شکست به ازای ۱۰[۱۰] دالتون DNA) و همچنین شناسایی نقاط ناپایدار بازی[1] محسوب می‌شود. ۳) این روش را می‌توان برای کلیه سلول های یوکاریوتی به کار برد. ۴) برخلاف سایر روش های سیتوژنتیک و روش‌های متافازی ارتباطی به تقسیم سلولی نداشته و مستقل از آن است. ۵) همچنین قادر به شناسایی کلاس های مختلف آسیب DNA می‌باشد (Lee and Steinert 2003; Deguchi et al. 2007; Ali et al. 2008; Pérez-Cerezales et al. 2009). از مهمترین کاربرد های این روش در علوم مربوط به آبزیان می‌توان به بررسی اثرات ژنوتوکسیک مواد جهش زا، ماده زایی[2]، تشخیص مواد غذایی پرتو دیده و مطالعات مربوط به یکپارچگی DNA اسپرم طی نگه داری کوتاه یا بلند مدت اشاره نمود (Moodi 2012). در طول فرایند انجماد، اسپرم در معرض عوامل مختلفی نظیر شوک های دمایی، مواجهه با ماده محافظ سرما، رقیق سازی با محیط انجماد و کاهش ظرفیت اکسیدانی قرار می‌گیرد که همگی این عوامل به علت تولید بیش از حد ROS نظیر رادیکال های هیدروپروکسیل و هیدروکسیل تحرک، ساختار، بقا و توانایی بارورسازی آن را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Ball 2008). گزارش شده است که تجمع بیش از حد این رادیکال های آزاد سبب ایجاد آسیب در DNA اسپرم چندین گونه نظیر انسان، اسب و گاو شده است (Cabrita et al. 2011). به هر حال مقاومت در برابر تنش های اکسیداتیو بر حسب گونه متفاوت است و گمان می‌شود DNA اسپرم ماهیان حساسیت های بیشتری به آسیب انجمادی داشته باشند (Cabrita et al. 2010). نتایج به دست آمده در مطالعه ما نشان می‌دهد که پروتکل مورد استفاده برای انجماد اسپرم فیل ماهی باعث آسیب قابل توجهی در سطح DNA می‌گردد بطوریکه سطح آسیب DNA در گروه شاهد بطور معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) نسبت به میزان اندازه گیری شده در اسپرم تازه بالاتر بود. هرچند وجود مواد آنتی اکسیدان مانع ایجاد آسیب DNA توسط عوامل اکسیداتیو می‌شود، در مطالعه ما افزودن ویتامین E اثری وابسته به

[1] Alkali labile sites

[2] Gynogenesis

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.8.7]

دز بر میزان آسیب DNA داشت بطوریکه در غلظت ۶۰۰ µM کاهش غیر معنی دار آماری در سطح آسیب DNA نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ولی در غلظت ۱۲۰۰ µM افزایش معنی دار ($P<۰/۰۵$) در آسیب DNA ارزیابی شد که احتمالاً به دلیل خاصیت پرواکسیدانی ناشی از دز بالای آنتی اکسیدان بود. نتایج دیگر تحقیقات نشان می‌دهد که اثرات اضافه کردن آنتی اکسیدان ها طی انجماد اسپرم وابسته به غلظت مورد استفاده آن است. برای مثال در مطالعه‌ای ویتامین C تنها در غلظت های کم (بین ۵۰ تا ۸۰۰µM) واجد خاصیت آنتی اکسیدانی بوده و موجب مهار روند پراکسیداسیون چربی در نمونه های اسپرم انسان گردیده و در غلظت های بیشتر (۱۰۰۰ µM به بالا) خاصیت پرواکسیدانی را از خود نشان داد (Arabi and Shahgolian 2007). در مورد ویتامین E نیز اثرات نسبت به غلظت آن متفاوت است به طوری که غلظت بالای آن اثرات اکسیداتیو ولی غلظت های پایین آن اثرات آنتی اکسیداتیو دارد (Brzezińska-Ślebodzińska et al. 1995). در مطالعه ای که اخیراً صورت گرفت از ویتامین E (۰/۱ و ۰/۵ mM) به عنوان آنتی اکسیدان در محیط انجماد اسپرم ماهیان شانک (*Sparus aurata*) و سیم دریایی (*Dicentrarchus labrax*) استفاده شده است که در نهایت اثر مثبت آن را بر تحرک و یکپارچگی DNA مشاهده نکردند و عنوان نمودند که احتمالاً اثرات بسته به نوع آنتی اکسیدان مورد استفاده، خاص گونه‌ای می‌باشد (Cabrita et al. 2011). بنابراین، کاربرد آنتی اکسیدان ها نظیر استفاده از یک تیغ دو لبه بوده که در یک محدودهٔ بسیار ظریف از تغییرات غلظتی، ضمن تغییر ماهیت، تبدیل به مجموعه ای از عوامل خطرآفرین برای سلول ها خواهند شد، لذا اثر خاص گونه ای احتمالاً نه تنها به نوع آنتی اکسیدان اضافه شده که همچنین به غلظت آن وابسته است (Cabrita et al. 2011). از طرف دیگر مشاهده شد که تحرک اسپرم پس از انجماد با میزان آسیب DNA ارتباط مستقیم داشت. این احتمال وجود دارد که علی رغم اینکه تحرک اسپرمی اصولاً مرتبط با عملکرد میتوکندریایی است، اما کاهش در این میزان بعلت فرایند انجماد-یخ گشایی با آسیب DNA مرتبط باشد (Li et al. 2008). گزارش شده است که نمونه های اسپرم دارای تحرک پایین حاوی سطح بالایی از آسیب DNA هستند (Irvine et al. 2000) به نحوی که با افزایش میزان شکستگی DNA، درصد اسپرم های دارای تحرک و مورفولوژی طبیعی کاهش می‌یابد. این مطلب موید این نکته است که عوامل موثر در شکسته شدن DNA (تولید رادیکال های آزاد اکسیژن) می‌توانند بر ساختار و عملکرد سلولی اسپرم نیز تأثیر بگذارند (Razavi et al. 2007).

در مجموع انجماد اسپرم فیل ماهی (*Huso huso*) با DMSO با افزایش شاخص در میزان آسیب DNA و نیز کاهش تحرک همراه بود که افزودن ویتامین E در محدوده غلظتی ۶۰۰ µM سبب محافظت از سلول ها در مقابل آسیب های ناشی از رادیکال های آزاد شد که نتیجه آن افزایش نامحسوس درصد تحرک و یکپارچگی DNA اسپرم بود. از آنجایی که بقای اسپرم و پارامترهای آن پس از انجماد به فاکتورهای متعددی از جمله محیط انجمادی بستگی دارد. در راستای این امر استاندارد کردن محیط و ایجاد شرایط بهینه برای حفظ پارامترهای اسپرم و کاهش آسیب ها مهمترین مساله است؛ لذا لازم است تا پژوهش های بیشتری به منظور انتخاب بهترین غلظت از آنتی اکسیدان ها و یا ترکیبی از آنها، به ویژه ویتامین E و اسید آسکوربات صورت بگیرد. همچنین پیشنهاد می‌شود که با لقاح اسپرم های منجمد شده، سطحی از آسیب DNA که می‌تواند تکامل نرمال جنینی را تحت تأثیر قرار دهد در مطالعات آتی مورد بررسی قرار گیرد. در نهایت قابلیت روش کامت در نمایش آسیب DNA اسپرم فیل ماهی مورد تأیید قرار می‌گیرد.

سپاسگزاری

از آقایان علی‌اصغر کوثری، رحیم حسینی و احمد فرهادی که ما را در انجام این تحقیق مساعدت نمودند سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع

Ahmadifakhabi M, Zamini AA, Baradrannoveiri S, Farokhrooz M, Mobarhanfard AR (2009) Sperm quality of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) after Cryopreservation with Dimethyl Sulfoxide. Journal of fisheries 2: 70-79. (In Farsi).

Ali D, Nagpure N, Kumar S, Kumar R, Kushwaha B (2008) Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish Channa punctatus (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. Chemosphere 71: 1823-1831.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.8.7]

Andreea A, Stela Z (2010) Role of antioxidant additives in the protection of the cryopreserved semen against free radicals. Romanian Biotechnological Letters 15: 34.
Arabi M, Shahgolian H (2007) Antioxidant potential of Ascorbate and Albumin in mercury-treated Bull spermatozoa. Shahid Chamran University Journal Of Science 17: 59-72. (In Farsi).
Arshami J, Esmailzadeh H, Nasirimahalati M, Hashemiatar M (2006) Effects of vitamins E and C on sperm charasterictic in vitro. iranian Journal of Basic Medical Sciences 9: 75-82. (In Farsi).
Ball BA (2008) Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. Animal Reproduction Science 107: 257-267.
Billard R, Cosson J, Noveiri S, Pourkazemi M (2004) Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. Aquaculture 236: 1-9.
Breininger E, Beorlegui N, O'Flaherty C, Beconi M (2005) Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. Theriogenology 63: 2126-2135.
Brzezińska-Ślebodzińska E, Ślebodziński A, Pietras B, Wieczorek G (1995) Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. Biological Trace Element Research 47: 69-74.
Cabrita E, Ma S, Diogo P, Martínez-Páramo S, Sarasquete C, Dinis M (2011) The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. Animal Reproduction Science.
Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herr ez M (2005) Evaluation of DNA damage in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and gilthead sea bream (Sparus aurata) cryopreserved sperm. Cryobiology 50: 144-153.
Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cerezales S, Herráez M (2010)Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. Journal of Applied Ichthyology 26: 623-635.
Cherepanov V, Kopeika E (1999) Cryopreservation and low temperature storage of sturgeon sperm. Journal of Applied Ichthyology 15: 310-311.
Ciereszko A, Dabrowski K, Froschauer J, Wolfe TD (2006) Cryopreservation of Semen from Lake Sturgeon. Transactions of the American Fisheries Society 135: 232-240.
Deguchi Y, Toyoizumi T, Masuda S, Yasuhara A, Mohri S, Yamada M, Inoue Y, Kinae N (2007) Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish.
Fraser L, Wysocki P, Ciereszko A, Plucienniczak G, Kotlowska M, Kordan W, Wojtczak M, Dietrich G, Strzezek J (2006) Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen. Reprod. Biol 6: 5–20.
Genesca A, Caballin M, Miro R, Benet J, Germa J, Egozcue J (1992) Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. Human genetics89:181-186.
Horvath A, Urbanyi B (2000) The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish Clarias gariepinus (Burchell 1822) sperm. Aquaculture Research 31: 317-324.
Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ (2000) DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality.Journal of Andrology 21: 33.
Jun L, Qinghua L, Shicui Z (2006) Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. Chinese Journal of Oceanology and Limnology 24: 370-377.
Kalthur G, Raj S, Thiyagarajan A, Kumar S, Kumar P, Adiga S (2010) Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage. Fertility and sterility.
Konca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gózdz S, Koza Z, Wojcik A (2003) A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay.Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 534: 15-20.
Kopeika J, Zhang T, Rawson DM, Elgar G (2005) Effect of cryopreservation on mitochondrial DNA of zebrafish (Danio rerio) blastomere cells. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 570: 49-61.
Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maisse G (2001) Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. Molecular reproduction and development 60: 397-404.
Lee R, Steinert S (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 544: 43-64.
Li P, Wei Q, Liu L (2008) DNA integrity of Polyodon spathula cryopreserved sperm. Journal of Applied Ichthyology 24: 121-125.
Lopez-Fernandez C, Gage M, Arroyo F, Gosalbez A, Larran A, Fernandez J, Gosalvez J (2008) Rapid rates of sperm DNA damage after activation in tench (Tinca tinca: Teleostei, Cyprinidae) measured using a sperm chromatin dispersion test. Reproduction 138: 257.
Martínez-Páramo S, Pérez-Cerezales S, Gómez-Romano F, Blanco G, Sánchez J, Herráez M (2009) Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. Theriogenology 71: 594-604.
Miller J, Cornwell D (1978) The role of cryoprotective agents as hydroxyl radical scavengers. Cryobiology 15: 585-588.
Mirzoyan AV, Nebesikhina NA, Voynova NV, Chistyakov VA (2006) Preliminary results on ascorbic acid and lysine suppression of clastogenic effect of deep-frozen sperm of the Russian sturgeon (Acipenser gueldenstaedti). International Journal of Refrigeration 29: 374-378.
Moodi S (2012) Investigation of the Genotoxicity of Diazinon to Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) Using the Comet Assay and Micronucleus Test. Dissertation, University of Tehran, IRAN.
Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 627: 178-185

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.8.7]

.
Perez-Cerezales S, Martinez-Paramo S, Beirao J, Herraez M (2010) Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. Reproduction 139: 989.
Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Beirão J, Herráez M (2010) Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. Theriogenology 74: 282-289.
Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Cabrita E, Martínez-Pastor F, de Paz P, Herráez M (2009) Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. Theriogenology 71: 605-613.
Razavi S, Fathi T ,Vahdati A, Nasr esfahani E (2007) Relation between Sperm Binding Ability to Hyaluronic Acid with Protamine Deficiency and DNA Fragmentation. Journal of Iranian Anatomical Sciences.
Slupphaug G, Kavli B, Krokan H (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 531: 231-251.
Tuncer P, Bucak M, Büyükleblebici S, SarIözkan S, Yeni D, Eken A, AkalIn P, Kinet H, Avdatek F, Fidan A (2010) The Effect of Cysteine and Glutathione on Sperm and Oxidative Stress Parameters of Post-Thawed Bull Semen. Cryobiology.
Upreti G, Jensen K, Oliver J, Duganzich D, Munday R, Smith J (1997) Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. Animal reproduction science 48: 269-278.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.8.7]