اثر گلوتاتیون در کینتیک اسپرم اپیدیدیمی سگ طی نگهداری در محیط کشت لوله رحمی انسان

عبدی، ک.[۱*]، تقی زاده، ر.[۲].

دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۴ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۳

خلاصه

در این کار تحقیقاتی در مجموع ۱۰ جفت بیضه سگ نر بالغ به روش اخته حاصل شده و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از رسیدن نمونه به آزمایشگاه، جهت استحصال اسپرم، چندین برش در نواحی که حداقل مویرگ های خونی ناحیهٔ دم اپیدیدیم بیضه وجود داشت، زده شد. سپس سه سطح گلوتاتیون(۳-۵-۷ میلی مول) به محیط کشت لوله رحمی انسان (HTF) و حاوی رقت ۴۰ میلیون اسپرم با ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی (FCS) در میکروتیوب ۱ میلی لیتری اضافه و به مدت۲۴ ساعت در دمای ۵ درجه سانتیگراد در یخچال نگهداری شد. سپس تحرک اسپرم در زمان های ۱-۶-۱۲و۲۴ ساعت با نرم افزار کاسا ارزیابی و داده ها توسط نرم افزار spss نسخه ۲۲ و آزمون های پس از تجربه، توکی و تامانه ارزیابی گردید. نتایج نشان داد شاخص های حرکتی اسپرم مثل درصد اسپرم های با حرکت سریع پیش رونده، درصد اسپرم های فاقد حرکت، درصد اسپرم های متحرک و شاخص های مربوط به سرعت حرکت اسپرم مثل سرعت خط منحنی اسپرم، سرعت خط مستقیم، و متوسط سرعت مسیر حرکت اسپرم تا ۱۲ ساعت در شاهد بهتر از تیمار با سطوح مختلف گلوتاتیون بوده و اختلاف میانگین ها معنی دار بود ($P<0/05$). ولی در ساعت ۲۴ مقادیر عددی میانگین های سه سطح گلوتاتیون از شاهد بیشتر ولی تفاوت میانگین ها معنی دار نبود. نتیجه گیری کلی، گلوتاتیون می تواند در بهبود کیفیت اسپرم اپیدیدیم سگ در دمای ۵ درجه سانتیگراد مؤثر باشد منتهی این تاثیر وابسته به دوز مصرفی و مدت زمان نگهداری اسپرم می باشد .

واژه های کلیدی :گلوتاتیون، کاسا، سگ، اسپرم اپیدیدیم

۱. گروه علوم درمانگاهی ، دانشکده دامپزشکی ، واحد ارومیه ، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

۲. دانش آموخته دکتری حرفه ای دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه

*نویسنده مسؤول: **keivanabdy@gmail.com**

مقدمه

مطالعات انجام شده در چند دهۀ اخیر در گسترش روشهای انجماد اسپرم سگ مؤثر بوده است به نحوی که تحرک اسپرم پس از انجماد و یخ گشایی تا حدود ۷۰ ٪ و نرخ توله زایی تا میزان ۸۵٪ بدست آمده است. البته نرخ آبستنی و توله زایی به دنبال تلقیح سگ با اسپرم منجمد کمتر از منی سرد و خنک شده می باشد. همچنین مراحل انجماد اسپرم حمل و نگهداری اسپرم در مقایسه با ذخیره اسپرم به صورت مایع (خنک و سرد) مشکل تر است (Rota و همکاران، ۱۹۹۹; Pena و همکاران، ۲۰۰۳; Farstad و همکاران، ۱۹۸۴).سوخت و ساز اسپرم سبب ایجاد رادیکالهای آزاد و گونه های واکنشی اکسیژن (ROS) میگردد که به شدت DNA را مستعد آسیب خواهد نمود (Steenken، ۱۹۸۹)

گلوتاتیون یک آنتی اکسیدان قوی است و باعث محافظت اجزای مهم سلولی در برابر واکنش با گروههای عاملی اکسیژن دار مانند رادیکاه‌های آزاد و پراکسید ها میشود. ترکیبات سمی دارای رادیکال آزاد، معمولاً با گلوتاتیون ترکیب شده و از بدن خارج میشوند (Vina و همکاران،۱۹۹۲). بنابراین در این مطالعه برای اولین بار اثر گلوتاتیون در محیط اسپرم به صورت خنک بررسی میگردد.

مواد و روش کار

جهت انجام تحقیق ۱۰ قلاده سگ نر بالغ انتخاب گردید . پس از دو ماه نگهداری در کلینیک با رسیدگی و تغذیه مناسب جهت سازگار شدن با شرایط محل نگهداری، سگ های نر با روش استاندارد اخته و بلافاصله جهت استحصال اسپرم از دم اپیدیدیم، بیضه ها به آزمایشگاه منتقل گردید.

در آزمایشگاه پس از شستشوی بیضه با نرمال سالین و خشک کردن آن، با برش پوشش سفید بیضه،ناحیۀ دم اپیدیدیم بین دو انگشت تثبیت شده و در قسمتهایی که کمترین عروق خونی وجود داشت، باچند برش سریع اسپرم های ناحیه بدون اینکه با خون آغشته شود توسط سمپلر ۱۰۰ به میکروتیوب ۵ میلی لیتر، حاوی محیط کشت لوله رحمی انسان(HTF) با ۱۰٪ سرم گوسالۀ جنینی (FCS) انتقال یافت.

سپس میکروتیوب های ۱ میلی لیتری با ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰٪ سرم گوسالۀ جنینی و حاوی رقت مورد نظر از گلوتاتیون را جدا و پس از اضافه کردن ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول حاوی اسپرم در نهایت حجم مورد نظر ما ۱ میلی لیتر می شد. رقت های مورد استفاده شامل سطوح ۳، ۵و ۷ میلی مول گلوتاتیون در محلول ۱ میلی لیتری محیط کشت با ۴۰ میلیون اسپرم تهیه گردید.

پس از تهیه رقت های مورد نظر در طرح آزمایش ، گروه های گلوتاتیون و شاهد به مدت ۲۴ساعت در یخچال با دمای ۵ درجه سانتیگراد نگهداری شد، سپس در زمان های ۱، ۶، ۱۲، ۲۴ ساعت، از هر رقت به میزان ۵ میکرو لیتر نمونه گرفته شد. سپس نمونه سریع روی لام ماکلِر ۳۷ درجه میکروسکوپ کاسا قرار می گرفت و پس از رسیدن اسپرم به دمای ۳۷ درجه، پس از ۵ دقیقه، الگوی حرکت اسپرم توسط نرم افزار کاسا و در ۵ شان میکروسکوپی و حداقل با ردیابی ۱۰۰۰ الی ۲۰۰۰ اسپرم بررسی می شد. نتیجه هر بار آنالیز نمونه توسط آنالیز کاسا ثبت گردید

(Batista و همکاران، ۲۰۱۲؛ Christensen و همکاران، ۲۰۱۱؛ Ellington و همکاران، ۱۹۹۳؛ Kasimanickam و همکاران، ۲۰۱۲؛ Milani و همکاران، ۲۰۱۰؛ Neagu و همکاران، ۲۰۱۱؛ Rijsselaere و همکاران، ۲۰۰۳؛ Elsayed و همکاران، ۲۰۱۵؛ Somi-Schafer و Aurich، ۲۰۰۷)

نتایج

نتایج حاصل از تاثیر سطوح مختلف گلوتاتیون بر کینتیک اسپرم اپیدیدیمی سگ، طی ۲۴ ساعت نگهداری در محیط کشت لوله رحمی انسان نشان داد که :

از نظر درصد اسپرم های کلاس A درصد این شاخص در ساعت ۶ در شاهد و گلوتاتیون ۳ از رقت های ۵ و ۷ بیشتر و تفاوت با رقت ۷ معنی دار بود ($P<0/05$). در ساعت ۱۲ شاهد از تمامی رقت ها بیشتر و اختلاف شاهد با رقت ۳ و ۷ معنی دار بود. در زمان ۲۴ رقت ۳ و ۵ مقادیر عددی بیشتری از شاهد داشت ولی تفاوت معنی دار نبود (نمودار ۱).

از نظر درصد اسپرم های کلاس B مقدار این شاخص در زمان های مختلف و بین گرو های مختلف تفاوت معنی دار نداشت البته مقادیر عددی تا ساعت ۱۲ در شاهد بیشتر بود و در ساعت ۲۴ مقادیر عددی گلوتاتیون ۳ و ۷ از شاهد بیشتر بود (نمودار ۲).

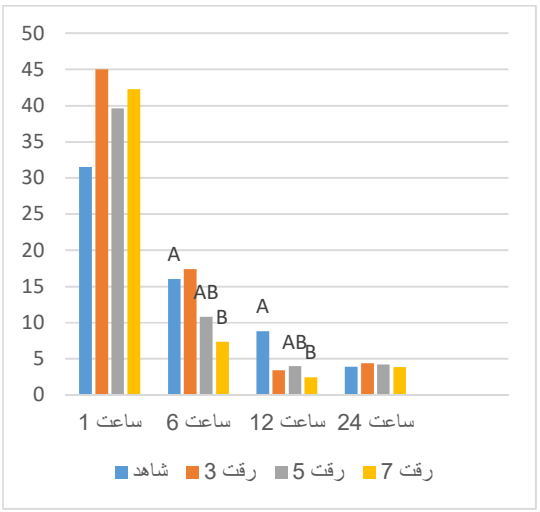
در خصوص شاخص درصد اسپرم های با حرکت لرزشی مقدار این داده در ساعت اول در شاهد از بقیه رقت ها بیشتر و تفاوت معنی دار بود. در ساعت ۱۲ درصد اسپرم های با حرکت لرزشی در شاهد بیشتر از رقت های گلوتاتیون بود و تفاوت میانگین ها معنی دار بود. در ساعت ۲۴ مقادیر عددی این شاخص در گلوتاتیون ۳-۵-۷ از شاهد بیشتر بود ولی تفاوت معنی دار نبود (نمودار ۳).

در ارتباط با درصد اسپرم های فاقد حرکت میزان این شاخص در ساعت ۶ در شاهد از تمامی رقت ها کمتر بود و اختلاف شاهد با ۵ و ۷ معنی دار بود. در زمان ۱۲ نیز درصد اسپرم های فاقد حرکت در گلوتاتیون ۳-۵-۷ از شاهد بیشتر و تفاوت معنی دار بود. در ساعت

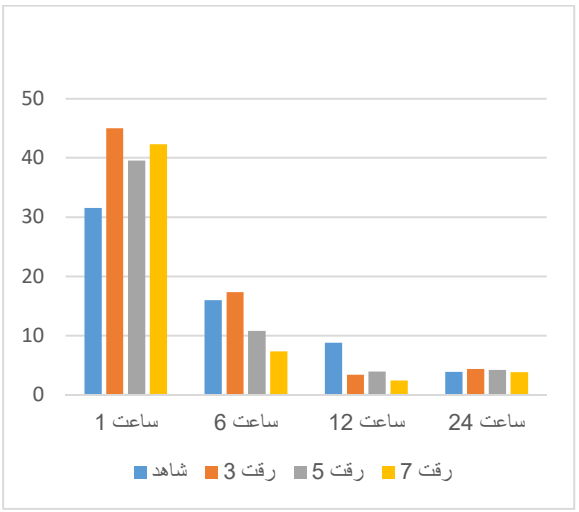
۲۴ اگرچه درصد اسپرم های فاقد حرکت در شاهد از بقیه رقت ها بیشتر بود ولی تفاوت میانگین ها معنی دار نبود (نمودار ۴).
در شاخص اسپرم های پیش رونده، درصد این میانگین در ساعت ۶ در شاهد بیشتر بود ولی تفاوت میانگین ها معنی دار نبود. در ساعت ۱۲ درصد اسپرم های پیشرونده در شاهد بیشتر و اختلاف شاهد با رقت ۷ معنی دار بود. در ساعت ۲۴ نیز مقدار این داده در رقت ۳-۵-۷ گلوتاتیون از شاهد بیشتر بود ولی تفاوت معنی دار نبود (نمودار ۵).
در ارتباط با درصد اسپرم های متحرک مقدار این متغیر در ساعت۶ در شاهد بیشتر و تفاوت با رقت ۵ و رقت ۷ معنی دار بود. در ساعت ۱۲ مقدار این داده در شاهد از تمامی رقت ها بیشتر و تفاوت معنی دار بود. در زمان ۲۴ درصد اسپرم های متحرک در رقت های ۳-۵-۷ از شاهد بیشتر بود ولی اختلاف معنی دار نبود (نمودار ۶).
در شاخص سرعت خط منحنی بر حسب میکرو متر در ثانیه مقدار این داده در ساعت اول در رقت های ۳-۵-۷ از شاهد بیشتر بود ولی تفاوت معنی دار نبود در ساعت ۶ میانگین شاهد بیشتر بود و اختلاف شاهد و گلوتاتیون ۳ با رقت ۷ گلوتاتیون معنی دار بود (اختلاف شاهد و گلوتاتیون ۳ معنی دار نبود). در ساعت ۱۲ مقادیر شاهد از سه رقت ۳-۵-۷ بیشتر و اختلاف معنی دار بود. در ساعت ۲۴ باز رقت های ۳-۵-۷ مقادیر بیشتری از شاهد داشت ولی تفاوت معنی دار نبود (نمودار ۷).
در ارتباط با شاخص سرعت خط مستقیم مقدار این داده در ساعت اول در گلوتاتیون ۳-۵-۷ از شاهد بیشتر بود و اختلاف شاهد با رقت ۳ معنی دار بود. در ساعت ۶ رقت ۳ مقادیر عددی بیشتری داشت و اختلاف آن فقط با رقت ۷ معنی دار بود. در ساعت ۱۲ مقادیر عددی این شاخص در شاهد از تمامی رقت ها بیشتر بود و تفاوت میانگین ها معنی دار بود. در ساعت ۲۴ کلیه میانگین ها از میانگین شاهد بیشتر بود ولی تفاوت معنی دار نبود (نمودار ۸).
در خصوص متوسط سرعت مسیر حرکت، مقدار این شاخص در ساعت ۶ در شاهد و رقت ۳ از بقیه میانگین ها بیشتر و اختلاف شاهد و رقت ۳ با رقت ۷ معنی دار بود. در ساعت ۱۲ میانگین شاهد از کلیه رقت ها بیشتر و تفاوت معنی دار بود در ساعت ۲۴ رقت های ۳-۵-۷ مقادیر عددی بیشتری از شاهد داشت ولی اختلاف معنی دار نبود (نمودار ۹).
در ارتباط با شاخص MAD مقدار این داده در زمان ۶ در شاهد و رقت ۳ از گلوتاتیون ۵ و ۷ بیشتر بود و تفاوت شاهد با رقت ۵ و ۷ معنی دار بود. در ساعت ۱۲ شاهد از تمامی رقت های گلوتاتیون میانگین بیشتری داشت و اختلاف معنی دار بود. در ساعت ۲۴ مقادیر عددی شاهد از بقیه میانگین ها بیشتر بود ولی تفاوت معنی دار نبود (نمودار ۱۰).
در خصوص شاخص حرکت جانبی سر اسپرم مقدار این داده در ساعت ۶ شاهد از بقیه میانگین ها بیشتر و اختلاف شاهد و رقت ۳ و ۵ معنی دار بود. در ساعت ۱۲ شاهد میانگین بیشتری داشت و اختلاف آن با رقت های گلوتاتیون معنی دار بود در ساعت ۲۴ رقت های ۳-۵-۷ گلوتاتیون میانگین بیشتری از شاهد داشت ولی تفاوت معنی دار نبود (نمودار ۱۱).
در ارتباط با شاخص BCF مقدار این شاخص در ساعت ۶ در شاهد از رقت ۳ و ۵ گلوتاتیون بیشتر و تفاوت معنی دار بود همچنین رقت ۳ از رقت ۷ بیشتر و اختلاف معنی دار بود. در ساعت ۱۲ شاهد از کلیه رقت های گلوتاتیون میانگین بیشتری داشت و اختلاف معنی دار بود، در ساعت ۲۴ میانگین های سه رقت ۳-۵-۷- از شاهد بیشتر بود ولی تفاوت معنی دار دیده نشد(نمودار ۱۲).
در ارتباط با درصد خطی بودن مسیر حرکت مقدار این داده در ساعت ۱ و ساعت ۲۴ در رقت ۳-۵-۷ از شاهد بیشتر بود ولی تفاوت میانگین ها معنی دار نبود در ساعت ۶ و ۱۲ درصد این شاخص در شاهد بیشتر بود و این اختلاف در ساعت ۱۲ معنی دار بود(نمودار ۱۳).
در خصوص شاخص WOB درصد این داده در ساعت ۶ و ۱۲ در شاهد بیشتر و در ساعت ۱۲ تفاوت معنی دار بود ولی در ساعت ۶ فقط اختلاف شاهد با رقت ۵ و ۷ معنی دار بود و در ساعت ۱ و ۲۴ کلیه رقت های گلوتاتیون مقادیر عددی بیشتری از شاهد داشت ولی تفاوت معنی دار نبود(نمودار ۱۴).
در ارتباط با درصد مستقیم بودن مسیر حرکت میزان این متغیر در ساعت ۱ و ۲۴ در رقت های گلوتاتیون از شاهد بیشتر ولی تفاوت معنی دار نبود منتهی در ساعت ۶ و ۱۲ کلیه رقت ها از شاهد کمتر بود، در ساعت ۶ اختلاف شاهد با گلوتاتیون ۷ معنی دار بود و در ساعت ۱۲ اختلاف شاهد با بقیه رقت ها معنی دار بود و در شاهد درصد این شاخص بیشتر بود (نمودار ۱۵).

بحث

نتایج حاصل از تاثیر سه رقت گلوتاتیون بر کینتیک اسپرم اپیدیدیمی سگ طی ۲۴ ساعت ماندگاری در محیط کشت لوله رحمی انسان در دمای ۵ درجه نشان داد در ساعت ۶ و ۱۲ شاخص های مربوط به الگوی حرکتی اسپرم از قبیل درصد اسپرم های با حرکت سریع پیش رونده، درصد اسپرم های با حرکت آهسته، درصد اسپرم های متحرک و نیز شاخص های سرعت مثل سرعت خط مستقیم-سرعت خط منحنی-متوسط سرعت مسیر حرکت و نسبت این شاخص ها

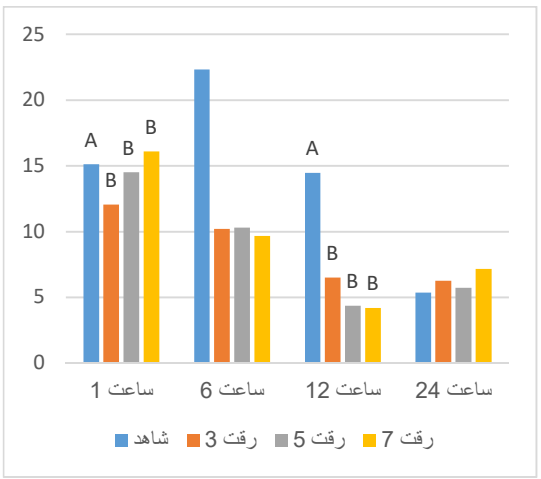


نمودار۱: میانگین درصد اسپرم‌های کلاس A

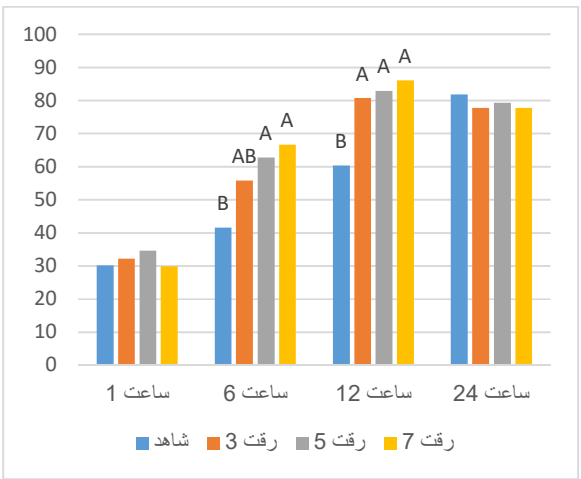


نمودار۲: میانگین درصد اسپرم‌های کلاس B

میانگین های با حروف لاتین غیر یکسان در یک ستون اختلاف معنی دار دارند(P<0/05)

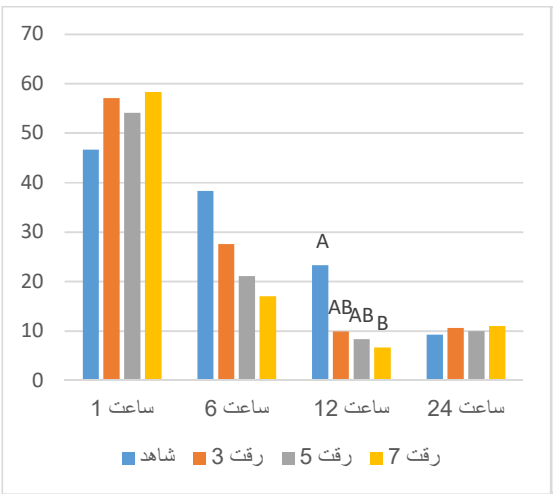


نمودار ۳ : میانگین درصد اسپرم‌های کلاسC

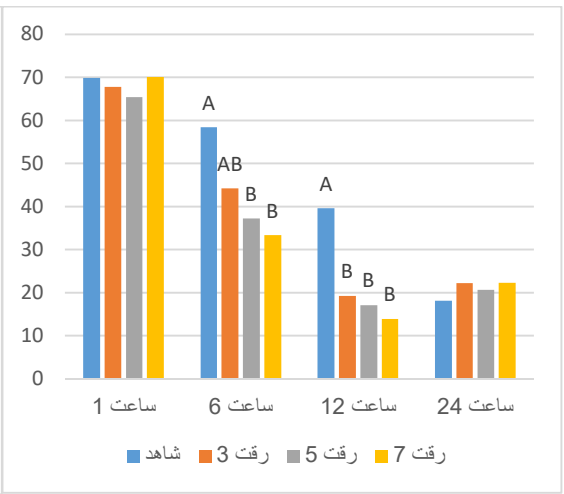


نمودار۴: میانگین درصد اسپرم‌های کلاس D

میانگین های با حروف لاتین غیر یکسان در یک ستون اختلاف معنی دار دارند(P<0/05)

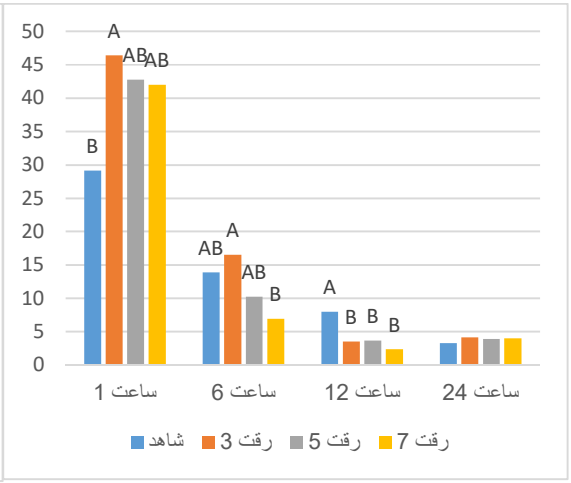


نمودار ۵: میانگین درصد اسپرم‌های کلاسA+B

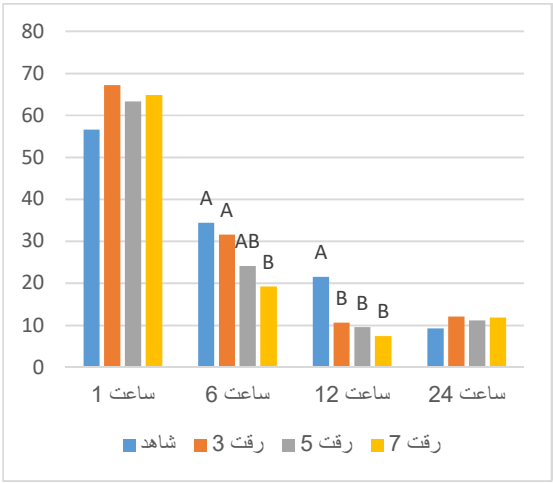


نمودار ۶: میانگین درصد اسپرم‌های کلاسA+B+C

میانگین های با حروف لاتین غیر یکسان در یک ستون اختلاف معنی دار دارند(P<0/05)

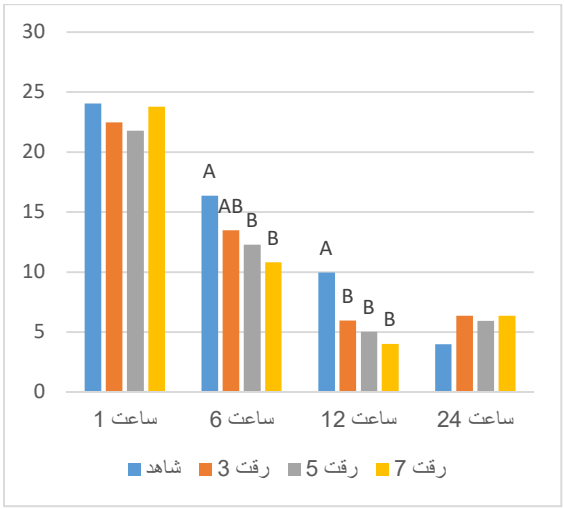


نمودار ۸: میانگین درصد اسپرم‌های کلاس LSV

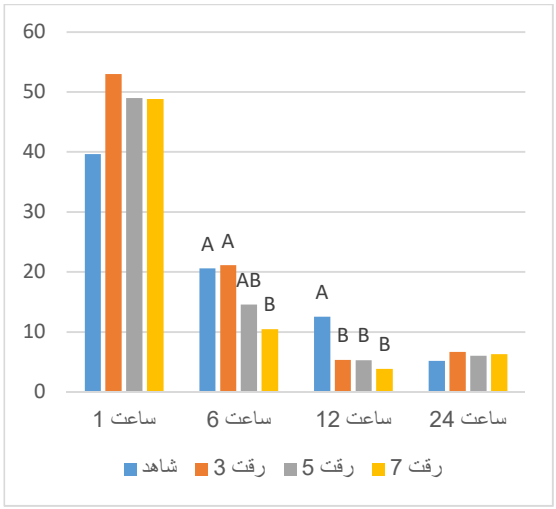


نمودار ۷: میانگین درصد اسپرم‌های کلاس LCV

میانگین های با حروف لاتین غیر یکسان در یک ستون اختلاف معنی دار دارند(P<0/05)

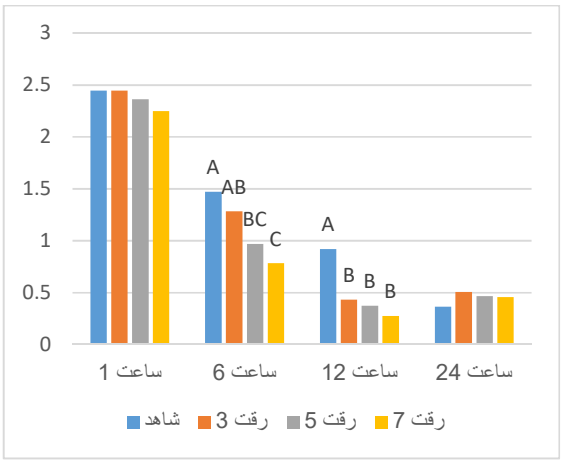


نمودار ۱۰: میانگین درصد اسپرم‌های کلاس MAD

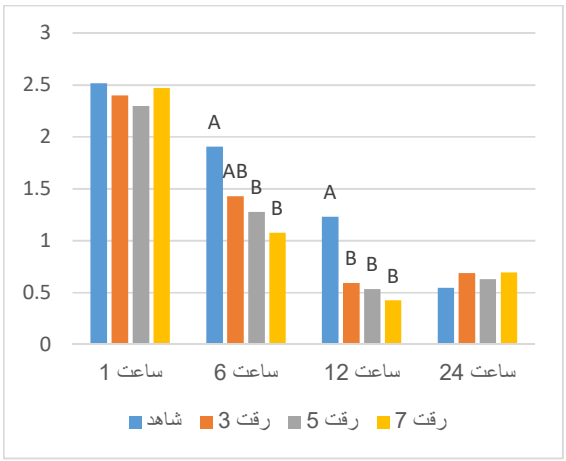


نمودار ۹: میانگین درصد اسپرم‌های کلاس VAP

میانگین های با حروف لاتین غیر یکسان در یک ستون اختلاف معنی دار دارند(P<0/05)

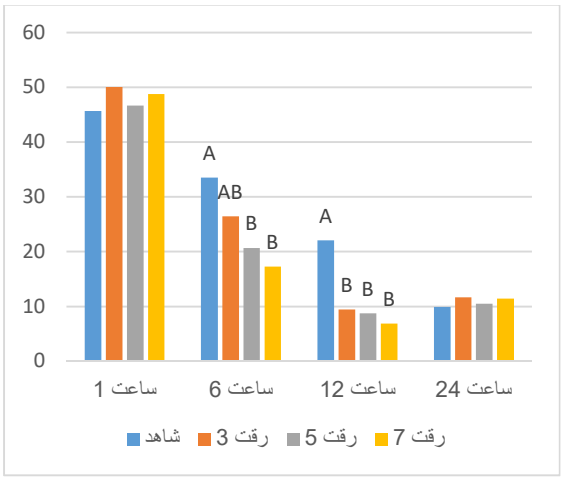


نمودار۱۲: میانگین درصد اسپرم‌های کلاس BCF

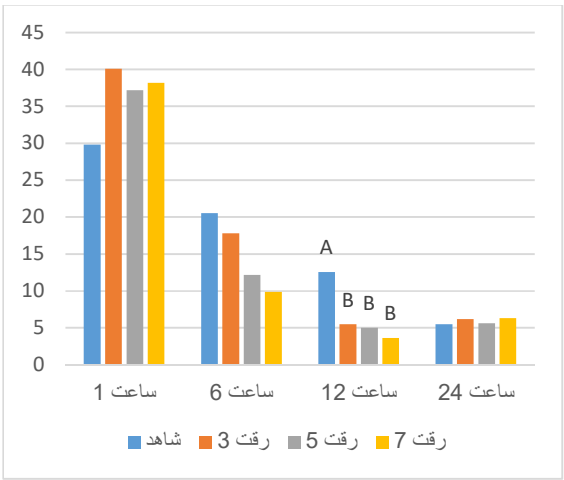


نمودار ۱۱: میانگین درصد اسپرم‌های کلاس ALH

میانگین های با حروف لاتین غیر یکسان در یک ستون اختلاف معنی دار دارند(P<0/05)

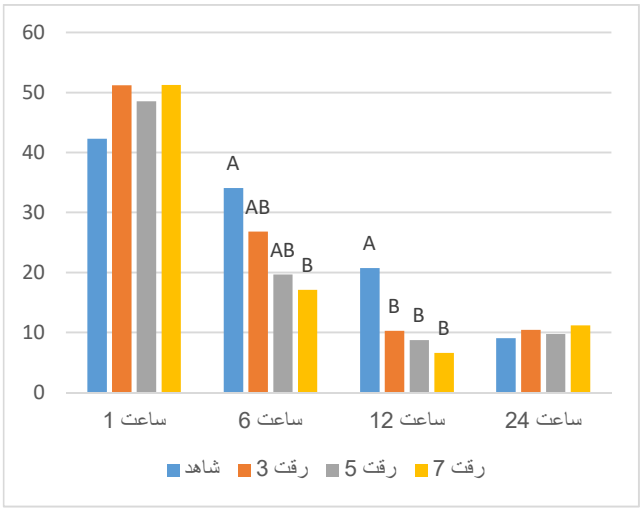


نمودار ۱۴: میانگین درصد اسپرم‌های کلاسWOB



نمودار۱۳: میانگین درصد اسپرم‌های کلاسLIN

میانگین های با حروف لاتین غیر یکسان در یک ستون اختلاف معنی دار دارند(P<0/05)



نمودار ۱۵: میانگین درصد اسپرم‌های کلاسSTR

میانگین های با حروف لاتین غیر یکسان در یک ستون اختلاف معنی دار دارند(P<0/05)

مثل درصد خطی بودن، درصد تلو تلو خوردن، درصد مستقیم الخط بودن و عدم تخطی از مسیر مستقیم، در ساعت ۶ در شاهد از رقت های ۵ و ۷ و در ساعت ۱۲ در کلیه رقت ها در شاهد بیشتر و تفاوت معنی دار بود (P<۰.۰۵) ولی در ساعت ۲۴ کلیه سطوح گلوتاتیون میانگین های بالاتری از شاهد داشتند ولی تفاوت میانگین ها معنی دار نبود. در خصوص نتایج ساعت اول اگرچه نتایج معنی دار در شاخص های مختلف وجود داشت و اکثرا" سطوح گلوتاتیون نتایج بهتری نسبت به شاهد داشت ولی احتمالا" در ساعت اول به علت تاثیر ماده افزودنی بر پایداری محیط کشت نتایج چندان قابل استناد نیست از طرفی علت بهتر بودن و متناقض بودن نتایج ساعت ۲۴ در مقایسه با زمان ۶ و ۱۲ احتمالا به علت تاخیر در بروز اثرات آنتی اکسید انی گلوتاتیون تا ۲۴ ساعت می باشد.

استفاده از منی رقیق و سرد شده در تلقیح مصنوعی سگ در کاهش هزینه و کاهش خطرات احتمالی موثر بوده و مشکلات مربوط به حمل و نقل دام را برای جفت گیری کاهش می دهد از طرفی خطر بروز بیماری نیز کاهش یافته و به پرورش دهندگان امکان می دهد در تلقیح دام خود از نژاد های با ژنتیک خاص و اصلاح شده هم داخل کشور و هم بین کشورها استفاده کنند. مسئله اصلی و مشکل اساسی در بکارگیری اسپرم سرد شده، طول عمر محدود منی سرد شده می باشد که تقریبا تا ۵ (۴,۹) روز بعد جمع آوری، باید مصرف شود. بعد از این زمان برای افزایش مدت ذخیره سازی، با احتمال کمتری می توان منی را منجمد نمود. بهرحال در سگ باروری

خوبی با منی سرد شده بدست می آید. از آنجا که اسپرم پستانداران غنی از اسید های چرب غیر اشباع می باشد لذا به استرس ناشی از مواد اکسید کننده بسیار حساس بوده و گونه های اکسیژن واکنشی ناشی از فعالیت های متابولیکی اسپرم و لوکوسیت های احتمالی منی، پر اکسیداسیون چربی را افزایش و سبب توقف برگشت ناپذیر تحرک اسپرم ، آسیب به پروتین و اسیدهای نوکلئیک و به دنبال آن مرگ سلول اسپرم می شوند. ترکیبات راس یا گونه های اکسیژن واکنشی دفاع آنزیمی اسپرم را نیز کاهش می دهند به عبارتی نقش کلیدی در عملکرد طبیعی اسپرم پستانداران دارند در واقع مقدار کم راس با تولید آدنوزین مونو فسفات داخل سلولی و افزایش فسفریلاسیون تایر وزین در ظرفیت پذیری و باروری اسپرم ضروری است .همچنین راس در اتصال اسپرم به لایه شفاف تخمک دخیل است (Michael و همکاران، ۲۰۰۹).

منی سه عملکرد آنزیمی محافظتی در برابر راس دارد شامل : سوپر اکسید دسموتاز – کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در گونه های مختلف دام آنتی اکسیدان های مختلفی به رقیق کننده منی اضافه شده است ولی درخصوص تاثیر گلوتاتیون بر اسپرم سرد شده سگ تحقیقی انجام نگرفته است. گلوتاتیون یک تری پپتید می باشد که از سه اسید آمینه سیستئین – اسید گلوتامیک و گلایسین تشکیل و در واقع یک ترکیب آنتی اکسیدانی قوی است و در تحقیق ما اثرات آنتی اکسید انی این ترکیب بر تحرک اسپرم اپیدیدیمی سگ بررسی شد

در تحقیق آقای میشل و همکاران آنتی اکسیدان های مختلفی بر روی کیفیت اسپرم منی سرد شده سگ ارزیابی گردید. و نتایج نشان داد که بیشترین تاثیر ترکیبات آنتی اکسیدانی در ساعت ۲۴ و یا ۷۲ بعد از نگهداری در دمای ۴ درجه بدست می آید ودر تحقیق آنها بهترین ترکیب ویتامین E بود در تحقیق ما نیز تاثیر آنتی اکسیدان در ساعت ۲۴ در کلیه شاخص ها بیشتر از شاهد بود البته تفاوت معنی دار نبود (Michael و همکاران، ۲۰۰۹).

سیستم کاسا ابزار بسیار کاربردی برای شناسایی تحرک اسپرم خصوصا" برای ارزیابی تاثیر رقیق کننده های مختلف بوده و در آنالیز حرکتی اسپرم سگ کاربرد دارد همینطور این سیستم توانایی ردیابی ظرفیت پذیری و بیش فعالی اسپرم را که جهت اتصال به لایه شفاف ضروری است را دارد. در تفسیر نتایج کاسا، شاخص هایی مثل متوسط سرعت مسیر حرکت، سرعت خط مستقیم و سرعت خط منحنی به طور معنی دار در نمونه هایی که درصد باروری تخمک در آنها بیش از ۵۰ درصد است بالاتر از نمونه هایی است که درصد باروری تخمک در آنها زیر ۵۰ درصد می باشد. افزایش معنی دار سرعت خط منحنی و دامنه حرکت جانبی سر اسپرم همراه با کاهش درصد خطی بودن مسیر حرکت اسپرم نشانگر بیش فعالی اسپرم است. به همین منظور در بررسی حاضر جهت آنالیز حرکتی از سیستم کاسا استفاده گردید (Filho Mota و همکاران، ۲۰۱۴) .

در مطالعه کاسیما نیکام و همکاران در سال ۲۰۱۲ منی سگ در دمای ۵ درجه به مدت ۱۰ روز نگهداری شد البته شاخص های کاسا از روز دوم به بعد کاهش محسوسی داشت بالاخره در مطالعه این محققین از منی انزالی استفاده شد که خود حاوی ترشحات آنتی اکسیدان غده ضمیمه پروستات می باشد همچنین در رقیق کننده از زرده تخم مرغ و لسیتین سویا استفاده شد و نتایج لسیتین بهتر از زرده تخم مرغ بود (Kasimanickam و همکاران ۲۰۱۲)، به هرحال در تحقیق ما اسپرم اپیدیدیمی در یخچال با دمای ۵ درجه سانتیگراد تا ۲۴ ساعت ماندگاری داشت البته اسپرم فاقد ترشحات غده پروستات بود و فقط گلوتاتیون به محیط کشت اضافه شد و نتایج گلوتاتیون تا ۱۲ ساعت رضایت بخش نبود و در ساعت ۲۴ کلیه سطوح گلوتاتیون نتایج بهتری از شاهد داشت ولی این نتایج معنی دار نبود.

در مطالعۀ آقای کروچکینا در بررسی ترشحات پروستات که حاوی گلوتاتیون می باشد روی اسپرم اپیدیدیمی سگ قبل از انجماد شاخص های حرکتی اسپرم شامل درصد تحرک رو به جلو و شاخص های سرعت حرکت اسپرم در مقایسه با شاهد در نمونه های حاوی ترشحات پروستات بیشتر و اختلاف معنی دار بود البته بعد از انجماد تفاوت معنی داری در شاخص های حرکتی مشاهده نگردید منتهی در نمونه های حاوی ترشحات پروستات آسیب کروماتین بیشتر بود (Korochkina و همکاران، ۲۰۱۴). در مطالعه ما اگرچه از ترشحات پروستات استفاده نشد ولی گلوتاتیون به عنوان آنتی اکسیدان تا ۱۲ ساعت تاثیر مثبتی بر شاخص های حرکتی اسپرم نداشت ولی در ساعت ۲۴ داده های حرکتی سطوح گلوتاتیون از شاهد بیشتر بود ولی تفاوت معنی دار نبود.

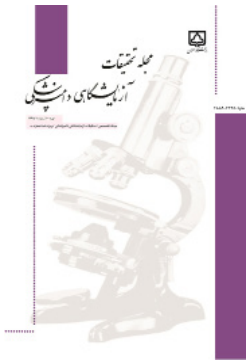
اسپرم اپیدیدیمی سگ در رقیق کننده تریس–فروکتوز زرده تخم مرغ تا ۴ روز و با درصد تحرک ۴۶,۳ درصد در دمای ۵ درجه قابل نگهداری است در مطالعه ما تا ساعت ۱۲درصد تحرک اسپرم در محیط کشت HTF تا میزان۴۰ درصد در نمونه شاهد کاهش یافت و در ساعت ۲۴ درصد اسپرم متحرک در کلیه سطوح گلوتاتیون بین ۲۰ الی ۲۲ درصد و در شاهد ۱۸ درصد بود البته اختلاف در ساعت ۲۴ معنی دار نبود به هرحال در شرایط معمول و با حداقل امکانات در محیط کشت لوله رحمی انسان و در دمای ۵ درجه یخچال می توان اسپرم اپیدیدیم سگ را ۱۲ الی ۲۴ ساعت با درصد تحرک

مناسب جهت باروری در دمای ۵ درجه در محیط کشت، نگهداری نمود.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که گلوتاتیون در سطوح ۳ – ۵ و ۷ میلی مول تا ۱۲ ساعت سبب کاهش معنی دار شاخص های حرکتی اسپرم اپیدیدیم سگ در مقایسه با شاهد می شود ولی در ساعت ۲۴ تمامی شاخص های حرکتی مهم و قابل تفسیر در باروری اسپرم (درصد تحرک و شاخص های سرعت)، درصد بهتری از شاهد داشت پس گلوتاتیون می تواند در بهبود کیفیت اسپرم اپیدیدیم سگ در دمای ۵ درجه سانتیگراد مؤثر باشد منتهی این تاثیر وابسته به دوز مصرفی و مدت زمان نگهداری اسپرم می باشد .

Batista, M., Santana, M., Niño, T., Alamo,



Journal of Veterinary Laboratory Research 12 (2020-21) 195-205

The effect of glutathione on dog epididymal sperm kinetics during preservation in human tubal fluid

Received: 26.08.2017 Accepted: 02.01.2021

Abdy, K.[1*], Taghizadeh,R.[2].

Abstract

In this research, 10 pairs of healthy adult male dog testicles were obtained by castration and immediately transferred to the laboratory. After reaching the laboratory, for the harvest of sperm, several incisions were performed at the regions with less blood capillaries of epididymis. Three levels of glutathione (3-5-7 mM) were added into human tubal fluid containing sperms (40×106 sperm/ml), with 10%, bovine serum albumin and were kept for 24 hours at 5 ºC. Sperm motility was examined at 1, 6, 12 and 24 hours after kept in refrigerator at 5 ºC with CASA. We applied one-way ANOVA of SPSS version 22 analyses and tukey HSD and tamhane post hoc test to determine meaningful differences. The results showed that CASA parameters; rapid progressive motility (Class A, %), immotile sperm (Class D, %), motile sperm (Class A+B+C, %) and the parameters of sperm velocity; curvilinear velocity (VCL, µm/s), straight line velocity (VSL, µm/s), average path velocity (VAP, µm/s), were the best in control groups, till 12hrs evaluation ($P<0.05$). But at 24 hours the three levels glutathione had more numerical means than control, but without meaning full results. In conclusion; glutathione can be effective in improving the quality of dog epididymis sperm at 5°C, but leading to this effect depending on the dosage and duration of sperm storage.

Key words:Glutathione, CASA, Dog, Epididymal sperm

1.Department of Clinical Science, Veterinary Faculty ,Urmia branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

2. Doctor of Veterinary Medicine, Graduated, ,Urmia Branch, Islamic Azad University,Urmia , Iran

*Corresponding author: **keivanabdy@gmail.com**

منابع

D., Cabrera, F., González, F., & Gracia, A. 2012 Sperm viability of canine and caprine semen samples preserved in a dry shipper. Animal Reproduction Science, **130**, 1-2

Christensen, B. W., Asa, C. S., Wang, C., Vansandt, L., Bauman, K., Callahan, M., Ellinwood, N. M. 2011. Effect of semen collection method on sperm motility of gray wolves (Canis lupus) and domestic dogs (C. l. familiaris). Theriogenology, **76,** 975-980.

Ellington, J., Scarlett, J., Meyers-Wallen, V., Mohammed, H. O., & Surman, V. 1993. Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements. Theriogenology, **40,** 725-733.

Elsayed, M., El-Sherry, T. M., & Abdelgawad, M. 2015. Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J. Theriogenology.

Farstad, W. 1984. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. Journal of Small Animal Practice, **25,** 561-565

Kasimanickam, V. R., Kasimanickam, R. K., Memon, M. A., & Rogers, H. A. 2012. Effect of extenders on sperm mitochondrial membrane, plasma membrane and sperm kinetics during liquid storage of canine semen at 5 °C. Animal Reproduction Science, **136,**139- 145

Korochkina, E., Johannisson, A., Goodla, L., Morrell, J. M., & Axner, E. 2014. Effect of prostatic fluid on the quality of fresh and frozen-thawed canine epididymal spermatozoa. Theriogenology, **82,** 1206-1211.

Michael, A. J., Alexopoulos, C., Pontiki, E. A., Hadjipavlou-Litina, D. J., Saratsis, P., Ververidis, H. N., & Boscos, C. M. 2009. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Animal Reproduction Science, **112,** 119-135.

Milani, C., Fontbonne, A., Sellem, E., Stelletta, C., Gérard, O., & Romagnoli, S. 2010. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. Theriogenology, **74,** 153-164.

Mota Filho, A. C., Silva, H. V. R., Nunes, T. G. P., de Souza, M. B., de Freitas, L. A., de Araújo, A. A., & da Silva, L. D. M. 2014. Cryopreservation of canine epididymal sperm using ACP-106c and TRIS. Cryobiology, **69,** 17-21.

Neagu, V. R., García, B. M., Rodríguez, A. M., Ferrusola, C. O., Bolaños, J. M. G., Fernández, L. G., Peña, F. J. 2011. Determination of glutation peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw. Theriogenology, **75,** 10-16.

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., & Kruif, A. d. 2003. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer.

Theriogenology, **60,** 1553-1568.
Rota, A., Iguer-Ouada, M., Verstegen, J., & Linde-Forsberg, C. 1999. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. Theriogenology, **51,** 1045-1058.
Schäfer-Somi, S., & Aurich, C. 2007. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. Animal Reproduction Science, **102,**1-13.
Steenken, S. 1989. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e-and OH adducts. Chemical Reviews, **89,** 503-520.
Vina, J., Sastre, J., Anton, V., Bruseghini, L., Esteras, A., & Asensi, M. 1992. Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants Free radicals and aging. Springer, **60,** 136-144