نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۲۳، تابستان ۱۳۹۶
ص‌ص: ۳۱~۳۴

تاثیر کلسترول لود شده بر سیکلودکسترین در پاسخ شیشه‌ای شدن اسپرم اپیدیدیمی شتر تک‌کوهانه

- **ی. نصری حسنی**
فارغ‌التحصیل دکترای حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز
- **فرید براتی** (نویسنده مسئول)
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز
- **ش. اقبال سعیدی**
گروه ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی-واحد خوراسگان

شماره تماس نویسنده مسئول: ۹۱۶۳۲۳۱۶۴۸۰
Email: fabrtir@yahoo.com

چکیده

هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیر کلسترول لود شده بر سیکلودکسترین (CLC) روی پاسخ به انجماد اسپرم شتر تک‌کوهانه در مدل شیشه‌ای‌سازی بوده است. بدین منظور، ۵ زوج بیضه و اپیدیدیم شتر تک‌کوهانه از کشتارگاه در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. اسپرم اپیدیدیمی در محیط تریس استخراج و مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های موجود به دو قسمت تقسیم و وارد برنامه شیشه‌ای‌سازی شدند. یک قسمت قبل از ورود به برنامه انجماد در معرض مقدار ۱ میلی‌گرم CLC برای ۶۰×۱۰^{۶} اسپرم قرار گرفت. گروه دوم بدون در معرض قرارگیری به CLC وارد برنامه انجماد شد. نتایج مطالعه نشان داد، انجماد اثر قابل ملاحظه‌ای ($P<۰/۰۵$) بر ویژگی‌های اسپرم داشته و CLC در بهبود شاخصهای اسپرم به‌طور قابل ملاحظه‌ای مؤثر بوده است. مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داد، انجماد شیشه‌ای با استفاده از کلسترول در اسپرم اپیدیدیمی شتر امکان‌پذیر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم اپیدیدیمی، شتر یک‌کوهانه، شیشه‌ای‌سازی، کلسترول لود شده بر سیکلودکسترین

Applied Animal Science Research Journal No 20 pp: 31-34

Effect of Cholesterol Loaded Cyclodextrin on Vitrification of Camelus Dromedarius Sperm

By: Y. Nasri-Hasani1, F. Barati2*, S. Eghbal-Saeedi3
1DVM, graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz.
2Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz.
3Department of Genetics and breeding, Faculty of Agriculture, Khorasan University, Isfahan

The aim of the present study was to investigate the effects of cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) on vitrification of one-humped Iranian camel (*Camelus dormodarius*). Five pairs of testis epididymides of camel were transported on ice to the laboratory and the epididymal sperm was isolated in Tris, and analyzed. Fresh sperm has been spitted to two parts; one part was exposed to CLC (1 mg/ 60×10^6) while the other was vitrified in a solution without CLC. The results showed that vitrification has impact on sperm parameters ($P<0.05$) and CLC improved sperm parameters followed by vitrification. This the first report of vitrification of camel epididymal sperm and also using CLC for improving vitrification output.

Key words: Camelus dormadarius, Cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC), Epididymal sperm, Vitrification

مقدمه

باتوجه به درحال انقراض بودن گونه‌های مختلف دامی از جمله شترهای دوکوهانه بومی و بعضی از اکوتیپ‌های شتر یک‌کوهانه، ذخیره‌سازی گامت‌های این گونه دامی ارزشمند، ضروری است. گونه نزدیک شتر دوکوهانه نوع تک‌کوهانه می‌باشد که می‌تواند به‌عنوان یک مدل برای تعداد معدود شتر دوکوهانه مورد مطالعه قرار گیرد. ضمن آن‌که پاسخ همین گونه هم در روش‌های کمک‌کننده تولیدمثل ضعیف بوده است (Khanna, Tandon and Rai, 1990). از ملزومات برنامه‌های مربوط به فن‌آوری تولیدمثل و انجام موفق لقاح آزمایشگاهی تهیه بانک‌های اسپرم می‌باشد. انجماد اسپرم شتر با استفاده از روش‌های مرسوم و استفاده از عوامل سرمامحافظ صورت پذیرفته است. در این برنامه‌ها از دستگاه‌های قابل برنامه‌ریزی استفاده می‌شود که هزینه‌های بالایی دارند و از طرف دیگر جهت حفاظت از غشاء سلولی می‌بایست از سرمامحافظ‌های شیمیایی مانند گلیسرول و اتیلن‌گلیکول استفاده شوند که بسیار سمی هستند و یا از سرمامحافظ‌های با منشاء بیولوژیک استفاده شود که خطر انتقال بیماری‌ها را دارند. احتمالاً تفاوت در نسبت کلسترول به فسفولیپید نسبت به اسپرم انسان دلیل پاسخ متفاوت نشخوارکنندگان می‌باشد. استفاده از فن‌آوری شیشه‌ای‌سازی امروزه در طب تولیدمثل انسان با موفقیت همراه بوده است. در مطالعات گذشته، با تزریق کلسترول به داخل اسپرم اپیدیدیمی بز و گربه بومی ایران شیشه‌ای‌سازی آن با موفقیت همراه بوده است (Katanbafzadeh, Baratiand and Tabandeh, 2014; رهبر و همکاران، ۱۳۹۶).

هدف از مطالعه حاضر بررسی امکان شیشه‌ای‌سازی اسپرم اپیدیدیمی شتر تک‌کوهانه با حضور کلسترول در برنامه لقاح آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام این تحقیق، تعداد ۵ زوج بیضه به‌همراه اپیدیدیم[1] از شترهای نربالغ به ظاهر سالم ازکشتارگاه نجف‌آباد اصفهان اخذ

[1] Epididymis: اپیدیدیم لوله‌ای باریک درون بیضه‌ها است که محل بلوغ اسپرم و ذخیره آن می‌باشد

گردید و در فالکون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی محلول سالین ۰/۹ درصد و۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر جنتامایسین[2] به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده خوراسگان منتقل گردیدند. پس از ضدعفونی بیضه‌ها با الکل، ابتدا دم اپیدیدیم از کل آن جدا و درون پتری دیش حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط پایه‌ی تریس ۳۱ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد (دو زوج دم اپیدیدیم در هر پتری دیش) و به‌وسیله ی اسکالپل قطعه قطعه شد و سپس دم‌های اپیدیدیم خارج و محلول حاوی اسپرم ارزیابی اولیه قرار گرفت (Guerrero, 2006).

پس از تعیین غلظت اسپرم با استفاده از روش هموسیتومتری[3]، حجم اسپرم بر اساس ۴۰ میلیون اسپرم تعیین گردید. سپس حجم مورد نظر به‌وسیله محلول تریس[4] (هیدروکسی‌متیل) آمینومتان[5] به یک میلی‌لیتر رسانده شد و سپس به دو گروه تقسیم شد. به گروه اول ۲ میلی‌گرم سیکلودکسترین[6] به ازای ۱۲۰ میلیون اسپرم) و گروه دوم به جای سیکلودکسترین محلول تریس اضافه گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۲ درجه‌ی سلسیوس انکوبه گردید (Moce, *et al.*, 2010; Purdy, and Graham, 2004). در ادامه به نسبت ۱:۱ با محلول تریس رقیق شدند و به این ترتیب غلظت آن‌ها به ۲۰ میلیون اسپرم رسید. در مرحله‌ی بعد به نسبت ۱:۱ محلول سوکروز[7] ۰/۴ مولار اضافه شد (Isachenko, *et al.*, 2011). به این ترتیب غلظت نهایی اسپرم در دو گروه ۱۰ میلیون و غلظت نهایی سوکروز به ۰/۲ مولار رسید. سپس حداقل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند (Isachenko, *et al.*, 2011). فرآیند شیشه‌ای شدن با اصلاح روش لاکنگو وهمکاران (۲۰۰۵) انجام شد (Isachenko, *et al.*, 2005).

نسبت ویژگی‌های مختلف اسپرم بعد از انجماد به قبل از انجماد بین دو گروه حاوی سیکلودکسترین و فاقد آن به روش آزمون تی مقایسه گردید.

نتایج و بحث

برای تهیه بانک‌های اسپرم باید اسپرم منجمد شود. ولی این روش نیاز به هزینه زیادی دارد و علاوه بر احتمال انتقال بیماری‌ها توسط اسپرم آن‌ها، برای انجماد جهت محافظت از غشای سلولی اسپرم می‌باید از مواد شیمیایی مانند گلیسرول و اتیلن‌گلیکول که بسیار سمی هستند، استفاده کرد (Isachenko et al. 2003). فرآیند انجماد منجر به تغییر در ساختار غشاء می‌شود، بنابراین پروتئین و لیپیدهای وابسته به آن آسیب‌دیده و سبب از دست دادن نفوذپذیری انتخابی غشاء و تغییر در سیالیت غشاء می‌شود. هم‌چنین در طی روند انجماد، میزان کلسترول غشای سلول کاهش میابد (Cormier and Bailey 2003).

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد، در گونه‌هایی که نسبت کلسترول به فسفولیپید غشاء بیشتر است، مانند انسان و خرگوش و گونه‌هایی که این نسبت کمتر است مانند اسب، گاو و قوچ، مقاومت بیشتری در برابر فرآیند انجماد وجود دارد (Watson 2000).

برای رفع این مسئله به تازگی روش شیشه‌ای کردن که ارزان‌تر و مؤثرتر است به‌کار گرفته شده است. مطالعات نشان داده‌اند که اسپرم را نیز می‌توان با روش شیشه‌ای کردن منجمد نمود و حذف سرما تأثیر نامطلوبی بر روند شیشه‌ای‌سازی اسپرم ندارد (Isachenko, *et al.*, 2012 ;کتان‌باف‌زاده، براتی و تابنده ۱۳۹۲). این فرآیند بر روی بز بومی خوزستان (Katanbafzadeh, *et al.*, 2014)، انسان، سگ و ماهی موفق بوده است (Isachenko, et al., 2011; Sanchez, et al., 2011; Merino, et al., 2011).

با توجه به فراوانی گونه‌های در حال انقراض مانند شترهای دوکوهانه و بعضی از اکوتیپ‌های شتر یک‌کوهانه ین روش میتواند یک الگوی مناسب برای کمک به حفظ این نوع از شتر باشد. به همین جهت مطالعه‌ی حاضر امکان شیشه‌ای‌سازی اسپرم اپیدیدیمی شتر تک‌کوهانه بررسی شد.

نتایج مشخص کرد، شیشه‌ای‌سازی میزان تحرک کل، زنده‌مانی و ظاهر اسپرم اپیدیدیمی شتر را به‌شدت کاهش و درصد ناهنجاری‌های دم اسپرم اپیدیدیمی آن را به‌حد زیادی افزایش داد ($P<0/05$). اما میزان ناهنجاری سر و قطعه میانی و تعداد قطرات پروتوپلاسمیک تحت تأثیر قرار نگرفتند. ولی میانگین نسبت تحرک اسپرم اپیدیدیمی شتر بعد از انجماد بین دو گروه دارای CLC و فاقد CLC تفاوت معنی‌داری داشت ($P<0/05$). به‌طورکلی، میانگین درصد تحرک اسپرم اپیدیدیمی شتر تحت‌تاثیر قرار گرفته بود ($P<0/0001$) به طوری که میانگین درصد تحرک در گروه‌های حاوی CLC نسبت به گروه فاقد CLC به شدت افزایش یافته بود ($P>0/05$). شیشه‌ای‌سازی منجر به تغییرات قابل توجه در شکل ظاهری اسپرم اپیدیدیمی شتر تک کوهانه شد که استفاده از CLC درمقایسه با عدم وجود آن اشکالات ظاهری اسپرم را کاهش داد ($P>0/05$). میانگین نسبت زنده‌مانی اسپرم اپیدیدیمی شتر بعد از انجماد

[2] Gentamisin,Darou-pakhsh, Iran
[3] Hemositometer
[4] TBS Buffer *Solution* Tris
[5] Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Sigma-Aldrich
[6] *Cyclodextrin* (CLC)
[7] Sucrose, Sisco Research Laboratories, India

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

بین دو گروه واجد CLC و فاقد CLC دارای اختلاف معنادار نبود (P>۰/۰۵). این تاثیر ناشی از فرایند انجماد بوده است، به طوری که درصد زنده‌مانی اسپرم در نمونه‌ی قبل از انجماد ۰/۶۸±۱۰۰ درصد بوده است که بعد از انجماد در گروه دارای CLC ۰/۶۷±۹۴ درصد و در گروه فاقد CLC ۰/۶۷±۹۶ درصد بوده است و حضور CLC تاثیر بهبود دهنده‌ی قابل توجهی بر این فرایند نداشته است.

در مجموع برای اولین بار شیشه‌ای شدن اسپرم اپیدیدیمی شتر تک‌کوهانه با موفقیت بود ولی استفاده از CLC در این فرآیند کمک مؤثری داشت.

منابع

کتان‌باف‌زاده، ه. براتی، ف. و تابنده، م.ر. (۱۳۹۲). تاثیر رقیق‌کننده عاری از سرمامحافظ حاوی کلسترول لود شده با بتاسیکلودکسترین بر شیشه‌ای شدن اسپرم اپیدیدیمی بز. پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای (عمومی). دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی.

رهبر، م. براتی، ف. محمدی، ق. و مصلی‌نژاد، ب. (۱۳۹۶). تأثیر کلسترول لود شده روی سیکلودکسترین بر پاسخ شیشه‌ای شدن اسپرم اپیدیدیمی گربه. مجله دامپزشکی ایران، دوره سیزدهم(۲): ۵ تا ۱۲.

Guerrero, A. C. (2006). Cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection with bovin epididymal spermatozoa. Thesis submitted for fulfillment for the degree of Doctor of Philosophy, Louisiana State University.

Isachenko, E., Isachenko, V. Katkov, I. I. Dessole, S. and Nawroth, F. (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: From past practical difficulties to present success. Reproductive BioMedicine Online, 6(2):191-200.

Isachenko, V., Isachenko, E. Petrunkina, A. M. and Sanchez, R. (2012). Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: Birth of two healthy babies. Reproduction, Fertility and Development, 24(2):323-326.

Isachenko, V., Maettner, R. Petrunkina, A. M. Mallmann, P. Rahimi, G. Sterzik, K. Sanchez, A. Risopatron, J. Damjanoski, I. and Isachenko, E. (2011). Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in large (up to 0.5 ml) volume: A novel technology. Clinical Laboratory, 57(9-10): 643-650.

Isachenko, V.; Isachenko, E.; Montag, M.; Zaeva, V.; Krivokharchenko, I.; Nawroth, F.; Dessole, S.; Katkov, II. and Van der Ven, H. (2005). Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. Reproductive BioMedicine Online, 10(3): 350-354.

Katanbafzadeh, H., Barati, F. and Tabandeh, M. R. (2014). Cryoprotectant-free freezing of the goat epididymal sperm. Cryoletters, 35(4):293-298.

Khanna, N.D, Tandon, S. N, Rai, A. K. 1990. Breeding parameters of Indian camels. Indian Journal of Animal Sciences, 60 (11):1347-1354.

Merino, O., Risopatron, J. Sanchez, R. Isachenko, E. Figueroa, E. Valdebenito, I. and Isachenko, V. (2011). Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. Animal Reproduction Science, 124(1-2):125-131.

Moce, E., Blanch, E. Tomas, C. and Graham, J. K. (2010). Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. Reproduction in Domestic Animals, 45(2): 57-66.

Purdy, P. H. and Graham, J. K. (2004). Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology, 48(1):36-45.

Sanchez, R., Risopatron, J. Schulz, M. Villegas, J.; Isachenko, V. and Kreinberg, R. *et al.*, (2011). Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. Andrologia, 43:233-241.

▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪