بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف گلوکز بر روی حرکت اسپرم دم اپیدیدیم گاو

الهام اسدی[۱*]، وهاب باباپور[۲]، پرویز تاجیک[۳]

۱ـ دانشجوی دوره دکتری رشته فیزیولوژی جانوری دانشگاه ازاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران ـ ایران.
۲ـ گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران ـ ایران.
۳ـ گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران ـ ایران.
*نویسنده مسئول: asadi@yahoo.com

دریافت مقاله: ۲۱ بهمن ۸۹ ، پذیرش نهایی: ۴ خرداد ۹۰

چکیده

جهت بررسی تاثیر مقادیر مختلف گلوکز بر الگوی حرکت اسپرم دم اپیدیدیم گاو با روش کامپیوتری موسوم به کاسا، بیضه‌های بالغ گاو از کشتارگاه‌های اطراف تهران در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه بیضه‌ها را از داخل تونیکا آلبوژینا خارج نموده، قسمت دم اپیدیدیم را با سرم فیزیولوژی ۳۷ درجه سانتیگراد شسته و با گاز استریل خشک گردید. سپس با ایجاد شکافی را در قسمت فاقد عروق و با فشار بر دم اپیدیدیم یک قطره مایع سرشار از اسپرم داخل پلیت حاوی محیط BO نموده و سپس نمونه مذکور را در انکوباتور دارای ۵٪ از گاز CO2 در هوای مرطوب و درجه حرارت ۳۸ درجه سانتیگراد قرار داده شد. محیط‌های آزمایش به‌گونه‌ای طراحی گشت که هر محیط حاوی میزان ۶-۴ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر اسپرم باشد. محیط‌های حاوی نمونه اسپرم رقیق شده را در انکوباتور با دمای ۳۸ °C و غلظت ۵٪ از گاز CO2 قرار داده و در ساعت‌های ۸-۱ اسپرم‌ها از لحاظ پارامترهای زیر مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد اسپرم‌های متحرک با سرعت بالا، تعداد کل اسپرم‌های زنده و میانگین سرعت اسپرم در یک خط مستقیم، برحسب میکرومتر بر ثانیه. نتایج این بررسی نشان داد که بیشترین میزان حرکت سریع در غلظت G۳ گلوکز وجود داشته و اسپرم‌ها در این غلظت در ساعت‌های ۲ و ۴ و ۶ با دیگر گروه‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بودند (p<۰/۰۵). از نظر میزان اسپرمهای زنده تنها در ساعت اول اختلاف معنی دار بین گروه‌های G۱ و G۳، همچنین G۳ و G۴ مشاهده گردید (p<۰/۰۵). از لحاظ سرعت در ساعات مختلف هیچگونه اختلاف معنی‌دار بین اسپرم‌های قرارگرفته در غلظت‌های مختلف گلوکز مشاهده نگردید. نتایج آزمایش حاضر نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف گلوکز تنها تاثیر ناچیزی در ساعت‌های مختلف بر الگوی حرکت اسپرم دارند. پژوهشنامه دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۷، شماره تکمیلی، ۹۷-۹۳.

واژه‌های کلیدی: اسپرم اپیدیدیمی، گاو، گلوکز، ماندگاری، سرعت حرکت.

The effect of different concentration of glucose on bovine sperm motility pattern

Asadi, E.[1*], Babapoor, V.[2], Tajik, P.[3]

[1] *Student of Islamic Azad University, Science and Research, Branch, Tehran-Iran.*

[2] *Department of Basic Science, University of Tehran, Tehran- Iran.*

[3] *Department of Clinical Science, University of Tehran, Tehran-Iran.*

Abstract

To study the effect of glucose on bovine epididymal sperm motility patterns by computer assisted sperm analysis (CASA), testicles were isolated from slaughtered bulls in a local slaughterhouse in Tehran suburb and carried to laboratory in cool container (4ºC). In laboratory, testicles were removed from tunica albugina, epididymides were incised and 4-6×106 sperm cells/ml were transferred into BO medium containing different concentrations of glucose (G1-G4) and incubated in a 5% CO2 incubator in humid air at 38 ºC for up to 8 hours. Every hour sperm cells were observed under the CASA system and data for: the proportion of sperm cells with high speed, the proportion of live sperm cells and the mean straight line velocity (VSL) were recorded. The results showed that the proportions of sperm cells with high speed were significantly higher in G3 medium comparing to other groups during 2, 4 and 6 h post incubation (p<0.05). the proportion of live sperm cells were different between G3 and G1 as well as G3 and G4 1 h post incubation (p<0.05). After incubation no significant difference was observed between different groups. VSL was not either different between groups during experiment. The results of the present study showed that higher and lower doses of glucose could not support bovine epididymal sperm motility. ***Vet. Res. Bull. 7, Supplementary issue:93-97, 2012.***

Keywords: Epididymal sperm, Bovine, Glucose, Viability, Motility.

مقدمه

اسپرم پستانداران جهت انجام اعمال فیزیولوژیک خود به ویژه تحرک، نیازمند انرژی می‌باشد و منبع اصلی تهیه و تولید آدنوزین تری فسفات (ATP)، فسفر یلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی و گلیکولیز بوده و بالانس و تعادل بین این دو مسیر، بین اسپرم گونه‌های مختلف، متفاوت است(۲). استفاده از کربوهیدراتها در اسپرم برخی گونه‌های جانوری مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته و شکست و متابولیزه شدن گلوکز و فروکتوز به لاکتات توسط مسیر Embden-meyerhof نشان داده شده است. اگرچه اسپرم برخی گونه‌های جانوری قادر به متابولیزه کردن گلوکز می‌باشد، از این لحاظ تفاوت‌های بین گونه ای بین جانوران وجود دارد (۱۷و۱۲). همچنین گزارشاتی دال بر توانایی اسپرم جانوران، بر تحرک در محیط های فاقد یک قند قابل گلیکولیز وجود دارد. اگرچه، مدت زمانی که اسپرم می‌تواند در چنین محیط هایی پر تحرک و پر انرژی باقی بماند، مشخص نیست(۱۲).

در حال حاضر تحقیقات در زمینه بررسی محیط های مناسب جهت تلقیح مصنوعی و یاوری آزمایشگاهی In fertilization vitro(IVF) چه درگونه‌های جانوری و چه در انسان در حال انجام است. برخی محیط ها بر پایه فرمول های ساده نمکی ارائه شده توسط Eagle، Earl، Ringer به همراه افزودن پیروات، لاکتات و گلوکز و آلبومین طرح گردیده است. برخی دیگر محیط های پیچیده‌تری همچون محیط BO(اولین بار توسط (BRACKET & OLIPHANT) طراحی گردید)، جهت کشت طولانی مدت فاقد سرم، مناسب می‌باشد (۱۸).

Quinn در سال ۱۹۹۵ گزارش نمود که فقدان گلوکز در یک محیط کشت میزان IVF را کاهش میدهد. همچنین گزارشاتی دال بر نیاز اسپرم اپیدیدیمی موش به گلوکز جهت انجام لقاح وجود دارد (۱۳). در این تحقیق اثر گلوکز بر الگوی تحرک اسپرم و بقاء آن در محیط BO بررسی می‌گردد.

مواد و روش کار

در تحقیق حاضر جهت تهیه اسپرم اپیدیدیمی درهربار آزمایش، بیضه‌های بالغ گاو از کشتارگاه‌های اطراف تهران در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. به طور متوسط این انتقال به ۱ ساعت زمان احتیاج داشت. مطابق پژوهش Kaabi و همکاران در سال ۲۰۰۳ بهترین کیفیت اسپرم اپیدیدیمی، از اپیدیدیمهایی که در کنار یخ (۵ درجه سانتیگراد) حمل شده اند، در مقایسه با آنهایی که در دمای محیط (۲۴ درجه سانتیگراد) منتقل شده اند حاصل می‌گردد. سپس بیضه‌ها را از داخل تونیکا آلبوژینا خارج نموده، قسمت دم اپیدیدیم را با سرم فیزیولوژی ۳۷ درجه سانتیگراد شسته و با گاز استریل خشک می‌نمایم. سپس با استفاده از اسکالپل نمره ۲۱ شکافی را در قسمت فاقد عروق ایجاد نموده و با فشار بر دم اپیدیدیم یک قطره مایع سرشار از اسپرم داخل پلیت حاوی ۲CC محیط ۳۷Bo درجه سانتیگراد ریخته و جهت جلوگیری از بهم چسبیدن اسپرم‌ها (آگلوتیناسیون) چند بار توسط سمپلر، نمونه را مخلوط نموده. محیط فوق در شرایط استریل تهیه گردیده است. سپس نمونه مذکور را در انکوباتور دارای ۵٪ از گاز CO_2 در هوای مرطوب و درجه حرارت ۳۸ درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم.

جهت شمارش اسپرم‌های رقیق شده و تعیین غلظت نمونه بدست آمده با استفاده از لام نئوبار رقت مناسب اسپرم را تهیه کرده و میزان معینی از آن به محیط های مورد آزمایش اضافه گردید به طوری که حدود ۶-۴ میلیون اسپرم در میلی لیتر در هر محیط وجود داشته باشد. تا تراکم بیش از حد اسپرم در محیط باعث ایجاد اشتباه در آزمایش نگردد. این میزان قبلا توسط مادر محیط BO جهت باروری آزمایشگاهی گاو مورد آزمایش قرار گرفته و توانسته بود باروری مناسبی ایجاد نماید (تاجیک و همکاران ۲۰۰۳ و ۲۰۰۷). محیط های مورد آزمایش مادارای BSA، Napyruvate NaHCo3، 6H20، Mgcl2، 2H2o، NaH2po4، Cacl2، kcl، Nacl، Dglucose، ۴غلظت مختلف گلوکز ۰/۶۲۵ و۱/۲۵و۲/۵و۵ گرم در لیتر است. سپس محیط های حاوی نمونه اسپرم رقیق شده را در انکوباتور با دمای ۳۸C و غلظت ۵٪ از گاز CO_2 قرار داده و در ساعتهای۱و۲و۳و۴و۶و۸ اسپرم‌ها از لحاظ برخی پارامترهای زیر با استفاده از دستگاه CASA مورد ارزیابی قرار گرفته است.

Class A: درصد اسپرم‌های متحرک با سرعت بالا (حرکت سریع).

Class A+B+C (Live Ratio): مجموع درصدهای A. Class Class C, Class B.

VSL (Straight line velocity): میانگین سرعت اسپرم در یک خط مستقیم، بر حسب میکرومتر بر ثانیه. نشان می‌دهد که تاثیر محلول مورد آزمایش (گلوکز) بر روی سرعت حرکت اسپرم

جدول ۱ـ بررسی نتایج اثر غلظت گلوکز در محیط BO بر میزان تعداد اسپرم‌های با حرکت سریع.

غلظت گلوکز	زمان آزمایش						
	اول	دوم	سوم	چهارم	ششم	هشتم
G1	۵۱/۳±۳/۶	۳۴/۴±۳/۹	۴۹/۵±۱/۸	۴۱/۲±۲/۹	۳۵±۳/۱	۴۸/۶±۶/۶
G2	۴۸±۲/۴	۵۰/۸±۴/۲	۵۲/۴±۵/۳	۵۰/۲±۴	۴۷/۲±۲/۷	۴۷/۷±۰/۸
G3	۶۴/۷±۱/۱	۶۶/۸±۰/۸	۶۱/۶±۵/۶	۶۶/۸±۶/۹	۶۶/۱±۰/۸	۵۷±۴/۹
G4	۴۹/۴±۰/۷	۴۳/۷±۳	۵۶/۴±۲/۳	۵۳/۲±۰/۱	۵۴/۳±۴/۸	۴۲/۲±۲/۹

جدول ۲ـ بررسی نتایج اثر غلظت گلوکز در محیط BO بر پارامتر class A+B+C.

غلظت گلوکز	زمان آزمایش						
	اول	دوم	سوم	چهارم	ششم	هشتم
G1	۸۰/۵±۱/۶	۶۸/۶±۲/۳	۷۷/۹±۳/۹	۷۳/۵±۱/۴	۷۱/۷±۶/۳	۷۹/۵±۵/۳
G2	۸۰/۵±۰/۸	۸۱/۲±۵/۲	۸۶/۹±۴/۴	۸۵/۵±۳/۲	۸۵/۱±۰/۵	۸۵/۴±۰/۸
G3	۸۸±۱/۳	۸۶/۹±۱/۰	۸۲±۰/۹	۸۴/۸±۱/۵	۸۶/۹±۱/۰	۸۱/۷±۴/۸
G4	۷۹/۸±۱/۸	۷۷/۹±۲/۱	۸۷/۹±۱/۴	۸۴/۲±۰/۷	۸۵/۹±۲/۵	۷۱/۲±۳/۱

جدول ۳- بررسی نتایج اثر غلظت گلوکز در محیط BO بر پارامتر .VSL.

غلظت گلوکز	زمان آزمایش						
	اول	دوم	سوم	چهارم	ششم	هشتم
G1	۶۸/۷±۹/۳	۵۴/۳±۴/۲	۶۶/۷±۳	۶۰/۶±۳	۵۷/۱±۳/۶	۶۵/۲±۵/۳
G2	۵۸/۴±۴/۸	۵۶/۳±۱/۲	۴۷/۶±۶	۶۱/۸±۴/۱	۵۷/۷±۴/۹	۵۵/۴±۴/۰
G3	۶۰/۷±۴/۴	۳/۲±۱۰	۶۰/۵±۲/۴	۶۰/۸±۷/۴	۱۴/۲±۱۰	۵۲/۴±۶/۴
G4	۶۱/۳±۱/۲	۵۶/۴±۲/۷	۵۹/۷±۳	۶۳/۶±۱/۲	۶۵/۲±۱/۵	۶۲/۲±۳/۲

ظرف مدت ۸ ساعت در گرمخانه قرار دادن به چه ترتیب می‌شود.

آنالیز آماری:

پس از اندازه‌گیری پارامترهای مختلف حرکت توسط سیستم CASA در محیط های BO حاوی ۴ غلظت گلوکز تا مدت زمان ۸ ساعت انکوباسیون، داده‌های بدست آمده به صورت برای هر گروه تعیین گردید و توسط آزمون آماری One Way Anowa و تست‌های تکمیلی Tukey و Sheffe مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت و مرز استنتاج آماری مورد قبول برای بررسی اختلاف میانگین‌ها (p<۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

نتایج

جدول ۱ اثر غلظت‌های را بر درصد اسپرم‌هایی که حرکت سریع دارند (class A) را نشان می‌دهد. جدول براساس تنظیم شده است. بیشترین میزان حرکت سریع در غلظت G3 گلوکز مشاهده گردید و اسپرم‌ها در این غلظت در ساعت‌های ۲ و ۴ و ۶ با دیگر گروه‌ها دارای اختلاف معنی دار بودند (p<۰/۰۵).

جدول ۲ـ اثر غلظت‌های مختلف گلوکز را بر درصد اسپرم‌هایی که زنده هستند (class A+B+C) را نشان می‌دهد. جدول براساس تنظیم شده است. در این آزمایش تنها در ساعت اول اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های G1 و G3، همچنین G3 و G4 مشاهده گردید (p<۰/۰۵).

جدول ۳ـ اثر غلظت‌های بر میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر مستقیم (m/s) را نشان می‌دهد. جدول براساس تنظیم شده است.

در ساعات مختلف هیچگونه اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف گلوکز مشاهده نگردید.

بحث

تحرک اسپرم یکی از فرآیندهای ضروری و تعیین گر جهت لقاح می‌باشد و در تحقیقات انجام گرفته در زمینه ناباروری بسیار

مورد توجه قرار گرفته است و از جمله فاکتورهای بیشماری که در آن دخیل بوده و بر آن تاثیرگذار است می توان به متابولیسم اسپرم و منبع انرژی مورد استفاده برای این سلول ها اشاره نمود (۷،۱۰و۱).

گلوکز یکی از مواد محتمل جهت تامین این نیاز در اسپرم بسیاری از گونه های جانوری است . از آنجا که میتوکندری مکان فسفریلاسیون اکسیداتیو، در قطعه میانی اسپرم واقع است، این سئوال مطرح می گردد که آیا انتشار از این ناحیه می تواند ATP را به نواحی دیستال تاژک با سرعت مناسب، جهت تحرک تاژک انتقال دهد (۶و۲).

از آنجا که آنزیمهای گلیکولیتیک در قطعه اصلی قرار دارند و نیز برخی به غلاف فیبروزی متصل می باشند، بنابراین گلیکولیز می تواند ATP را در ناحیه مورد احتیاج جهت تحرک تاژک تهیه نماید و پیشنهاد گردیده که گلیکولیز در قطعه اصلی جهت عملکرد طبیعی اسپرم رل حیاتی را ایفا می کند. همچنین گفته می شود که اسپرم پستانداران با مشکل تحویل و انتقال ATP در طول تاژک مواجه می باشد و لذا برای حل این مشکل استراتژیهای متابولیک جهت تولید ATP وجود دارد که در این زمینه تفاوت های بین گونه ای وجود دارد (۱۳و۱۱).

گزارشاتی حاکی از استفاده گلوکز توسط جانوران مختلف همچون گاومیش و سگ و همچنین در انسان وجود دارد و مقادیر مختلفی از گلوکز در پلاسمای سمینال وجود دارد که غدد ضمیمه جنسی تامین کننده آن می باشد (۱۶).

همچنین میزان گلوکز وقتی که منی در دمای بدن انکوبه می شود، کاهش یافته و این کاهش با افزایش اسید لاکتیک همراه است و همچنین در طی این مسیر الگوی حرکت اسپرم تغییر می یابد (۱۵و۳).

بنابراین چنین نتیجه گیری می شود که اسپرم قسمت ویژه ای از انرژی مورد نیاز خود را از راه گلیکولیز بدست می آورد و این نوع متابولیسم در لوله های نگهداری اسپرم شبه غالب می باشد همچنین دلایلی حاکی از توانایی اسپرم برخی جانوران مانند سگ جهت گلوکونئوژنز وجود دارد و این امر آنها را قادر می سازد که در محیط های فاقد گلوکز متحرک بماند. در خوکچه هندی اسپرم گرفته شده از مجاری اسپرم تحرک پایین دارد و پس از اضافه شدن گلوکز ناگهان متحرک می شود و از لحاظ velocity straight line و linerity و bcf افزایش نشان می دهد (۱۷و۶).

در تحقیق حاضر به منظور بررسی نقش گلوکز بر الگوی حرکتی اسپرم گاو و نیز تعیین ماهیت مناسب محیط نگهداری و رقیق سازی اسپرم، محیط های BO تعدیل شده براساس فرمول ارائه شده توسط دو دانشمند پدید آورنده آن (Oliphant & Bracket) حاوی ۴ غلظت مختلف گلوکز (G1 تا G4) تهیه گردید و پس از افزودن اسپرم به این محیط ها تا ۸ ساعت انکوباسیون از لحاظ الگوی حرکت بررسی شدند.

نتایج حاکی از تاثیر غلظت گلوکز بر درصد اسپرم ها با حرکت سریع است اسپرم ها در غلظت G3 گلوکز بیشترین میزان حرکت سریع را نشان می دهد که پس از گذشت مدت زمان ۲ ساعت انکوباسیون قابل مشاهده می باشد.

همچنین تاثیر گلوکز بر پارامتر (Class (A+B+C)) که نشانگر درصد اسپرم های زنده است قابل مشاهده است. در غلظت G1 کمترین میزان و در غلظت G3 بیشترین مقدار قابل مشاهده بود.

References

1. Abdelhakem, A.A., Zenat, R.B. (1991) Storage ability and survival of French Alpine goat, spermatozoa as effected by the type of extender and sugar. *Anim. Reprod. Sci*, **53:**3-22.
2. Andrew, C., Williams, W., Christopher, L., Ford. (2001) The role of glucose in supporting motility & Capacitation in human spermatozoa. *Journal of Andrology*, **22(4):** 680- 695.
3. Belles -Lsles, M., chapeau, C., White, D., Gangnon, C. (1989) Isolation & characterization of dynein ATPase from bull spermatozoa. *Biochem J*, **15(3):** 863-869.
4. Carlson, A.E., Westenbrock, R.E., Quill, T., Ren, D., Claphen, D.E., Hille, B., Babcock, D.F. (2003) catsper 1 required for evoked ca entry and control of flagellar function in sperm. *PNAS*, **100:** 1486-68.
5. Dajsuter, p.y.w., Chow, I.C.A., Martin. (1979) Maintenance of motility in human spermatozoa by energy derived through oxidative phosphorylation & addition of albumin. *Biology of Reproduction*, **20:** 505-510.
6. Eddy, E.M., Toshimori, K., O'Brien, DA. (2003) *Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. Micros Res Tech*, **61:** 103-115.
7. Emadi, L., Tajik, P., Mirshokraei, P., Babapour, V.

(2007) Effects of different concentrations of calcium on motility pattern of ovine epididymal sperm in modified BO. (Abst in English p. 219) *Journal of Veterinary Research*, **62 (3):** 177-182.

8. Fawcett, D.W. (1975) The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*, **44:** 394-436.

8. Fetic, S. Yenug, C.H., Sonntag, B., Neschlag, E., Coopert, G. R. (2006) Relationship of sytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, & volume regulation of human spermatazoa. *J. androl*, **27(2):** 294-301.

9. Ford, W.C.L., Rees, J.M. (1990) The bioenergetics of mammalian sperm motility. IN Gagnon, C. (ed.).Controls of sperm motility: Biological & Clinical Aspects. CRC press, Boca Raton, FL, p. 175-202.

10. Mah, M., Mahadevan, Michael M. Miller, Dean M. Moutos. (1997) Absence of glucose decrease human fertilization & sperm movement characteristics in vitro, human Reproduction, **12(1):** 119-123.

11. Michell Krisfalusi, Kiyoshi Miki, Patricia, L., Magyar, Deborah, A., O'Brien. (2006) Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction*, **75:** 270-278.

12. Mukai, C., Okuno, M.(2004) Glycolysis play a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod*, **71:**540-547.

13. Quinn, p. (1995) Enhanced results in mouse & human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose & phosphate. *J. Assist. Reprod. Genet*, **12:** 97-105.

14. Rigau, T. (2002) Differential effects of glucose & fructose on hexose metabolism in dog Spermatozoa. Reproduction. p.123, 579, 591.

15. Scott, T.W., White, I.G., Annison, E.F. (1962)Glucose & acetate metabolism by ram, bull, dog & fowl spermatozoa. *Biochem J*, **83(2):** 398-4040.

16. Storey, B.T., Kayne, F.J. (1975) Energy metabolism of spermatozoa. V. The embeden-Meyerhof pathway of glycolysis: activities of the pathway enzymes in hypertonically treated rabbit epididymal spermatozoa. *Fertile Sterile*, **26:** 1257-1265.

17. Tajik, P., Niwa, K., Ghasemzadeh-Nava, H. (2003) In vitro fertilization of cumulus intact and cumulus free bovine oocytes in different concentrations of bovine serum albumin with or without caffeine and/or heparin. (Abst. in English). *J. Fac. Vet. Med. Tehran Univ*, **58 (3):** 241-247.

18.Tajik, P., Wang, W.H., Okuda, K., Niwa, K. (1994)I n vitro fertization of bovine occyte in a chemically defined, protein- free medium varying the bicarbonate concentration. *Biol Reprod*, **50:** 1231-1237.