دراسة فعالية بعض مضاد ات الاكسدة (EDTA وVIT. E) في حفظ تشوه منطقة الاكروزوم للحيوانات المنوية لدى الانسان خلال فترة المعادلة و صدمة البرودة

خليلي كمال*
مسيخ سامية*
عماري عمار**
بولعقود محمد صالح*
عبد النور شريف*

الملـــخص

لقـــد اوضحت هده الدراسه ان الوسط المغدي و الحافظ المستعمل كـــانت لـــه فعالية في تقليص نسبة تشوه منطقة الاكروزوم لدى الحيونات المنوية عند الانسان خاصة خلال فترة المعادلة 4-5م° و صدمة البرودة0 م° مقارنـــة بالســـائل المنوى الغير معامل بالوسط المغدي و الحافظ ا لا انه عند تدعيم هدا الوسط المغدي والحافظ بمضادات الاكسدة (EDTA & Vit. E) ازدادت فعالية هدا الوسط المغدي و الحافظ، حيث سجلنا نسب اقل لتشوه منطقة الاكروزوم خاصة عند دمج (Vit. E) بتركيز0.5 ملغ/.100 ملل و (EDTA) بتركيز 10 ميلي مول و دلك سواء خلال فترة المعادلة او صدمة الـــبروده مقارنة بتلك النسب المتحصل عليها عند استعمال الوسط المغدي والحافظ لوحده او خلال تدعيمه بالفيتامين Vit. E .

مفتـــاح الكلمات. مضادات الاكسدة، حيوان منوي، وسط مغدي وحافظ، اكروزوم.

ABSTRACT

This study has confirmed that the used cryoprotector medium has an effect in reducing the percentage of acrosome damage, especially during equilibration (3 hours, 4-5 C°) and cryoshock (10 min, 0 C°) and that compared with non treated seminal liquid. After adding the antioxydant(Vit. E) or (Vit. E & EDTA) to the cryoprotector medium, the effectiveness has increased. A reduction in acrosome damage has been recorded, when Vit. E (0.5 mg/100 ml) or a mixture of Vit. E & EDTA (10 mmol) was added, either during equilibration or cryoshock, all compared to either the seminal liquid.treated with the cryoprotector medium or that the non treated.

Key words: ***Antioxydants, spermatozoa, cryoprotector medium, acrosome damage***

1 مقـــدمـــة

ان الاستعمالات الواسعة للتلقيح الاصطناعي ادى الى تكثيف الابحاث في مجال تكنولوجيا حفظ السائل المنوي عند درجات حرارة منخفضة سواء بالنسبةللحيونات المزرعية او الانسان، و دلك لتحسين بعض الخصائص البيولوجية للحيونات المنوية المعرضة لظروف التجميد او التقليل من التاثيرات السلبية لدرجة الحرارة المنخفضة او الظروف الهوائية او نواتج الاكسدة الداتية للدهون، و هدا راجع لكون الحيونات المنوية من الخلايا الحساسة للتاثيرات الخارجية او الداخلية حيث من السهل ان تفقد بعض خصائصها الاساسية مثل الحركة، الشكل الخارجي و الحيوية، خاصة خلال التجميد (MARINOV.*et al.*,1983. AITKEN *et al.*, 1989).

ان منطقة الاكروزوم تعتبر مفتاح الاخصاب و دلك لما تحتويه من انزيمات تمكن الحيوان المنوي من اختراق اغشية البويضة اثناء عملية الاخصاب، الا انه وجد ان منطقة الاكروزوم تعتبر من المناطق الاكثر حساسية لدرجات الحرارة المنخفضة و نواتج الاكسدة الداتية للدهون(PRINS & WEIDEL, 1986; WATSON, 1982).

من اهم التوجهات في الوقت الحاضر هو امكانية التقليل من التاثيرات السلبية لمختلف العوامل المؤثرة مثل درجة الحراة المنخفضة، ظروف التجميد (تجميد-ازالة التجميد) بالاضافة الى نواتج الاكسدة، و دلك من خلال استعمال الاوساط المغدية و الحافظة دات التركيب الاساسي و المتمثل في صفار البيض، سكريات، جليسـرول، مضادات حيويـة و المحاليـل المنظمـة
.(PRINS & WEIDEL, 1986; ZLATAREV *et al.*, 1988)
ان تدعيم هده الاوساط المغدية و الحافظة بمختلف المركبات التي لها تاثير ايجابي على اهم الخصائص الاساسية للحيونات المنوية اصبح حتمية. ومن بين هده المركبات نجد الفيتامين (Vit.E)كمضاد للاكسدة و (EDTA) كمركب مخلبي، بالاضافة الى بعض الانزيمات المنشطة لحركة الحيوانات المنوية
;LINDEMAN *et al.*, 1988 ;; BAMBA & CRAN, 1992;
. (AL HANAK, 1989 GRAHAM & HAMMERSTED, 1992)

و على هدا الاساس قمنا بهده الدراسه لمعرفة فعالية مضادات الاكسدة (Vit. E) و (EDTA) في حفظ منطقة الاكروزوم لدى الحيونات المنوية للانسان من التشوهات و دلك خلال فترة المعادلة (4- 5 م°) و اثناء صدمة البرودة(0 م°).

2 الادوات و التجـارب.

الحصول على العينات. تم الحصول على السائل المنوي من اشخاص عاديين حضروا الى مخبر التكاثر لاجراء تحليل للسائل المنوي و دلك بعد فترة استمناع مدتها 4 ايام، تجرى بعد دلك عملية التسييل لمدة ساعة عند درجة حرارة 37 م° ثم يتم تحليل السائل المنوي حيث تقدر اهم الخصائص و دلك من خلال اجراء spermogramme (الحركة' التركيز الحيوية، التشوهات الخ.).

تحضير الوسط المغدي و الحافظ. لقد استعمل الوسط المغدي و الحافـظ حسب (NETER & JONDET, 1974) المتـكون من صفـار البيض 30 ملل، جليسرول 21ملل، فراكتوز 500 ملغ، سترات

الصوديوم 1 غرام، بنيسيلين 300000 وحدة دولية و ستربتوميسين 600 ملغ و ماء مقطر 100 ملل. كما تم استعمال فيتامينVtE كمضاد للاكسدة بتركيز 0,5 ملغ، 1ملغ لكل 100 ملل وسط مغدي و حافظ. اما بالنسبة للمركب المخلبي EDTA فقد استعمل بتركيز 10 ملي مول.

طريقة العمل. نقوم بتخفيف السائل المنوي بنسبة (حجم/حجم) بواسطة الوسط المغدي و الحافظ، او هدا الاخير مدعم بالفيتامين Vit. E او بالمركب المخلبي EDTA، ثم توضع العينات لفترة المعادلة عند درجة حرارة 4-5 م° لمدة ثلاث ساعات. اما بالنسبة لصدمة البرودة فتوضع العينات في حمام مائي دو درجة حرارة 0 م° لمدة 10 دقائق.

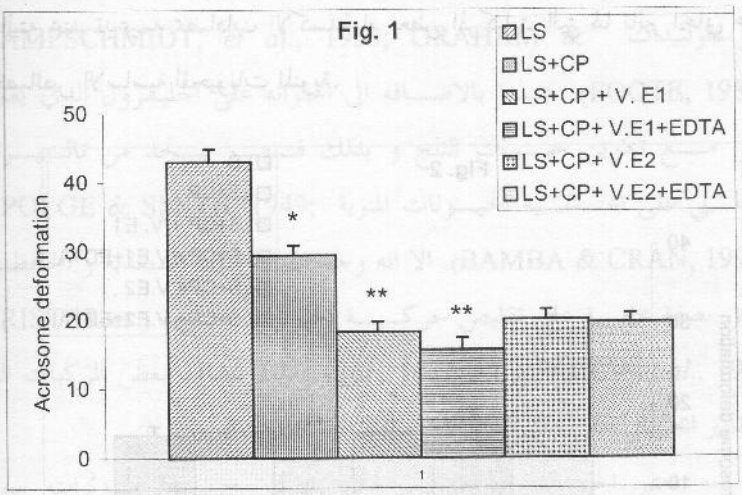
تتسم ملاحظة التشوهات بعد تلوين الحيوانات المنوية (PAPANICOLAOU) و ملاحظة 100حيوان منوي تم تقدر نسبة التشوهات على منطقة الاكروزوم (OMS, 1993).

خصائص السائل المنوي المستعمل. لقد استعمل السائل المنوي من 15 شخصا دوي سائل منوي عادي يتميز بالخصائص التالية: الحجم 3.8 ملل، الحيوية 70 % ، التركيز 65 مليون ح.م./ملل سائل منوي، الحركة 60 % و السرعة 40 ميكرومتر/ ثا.

3 النتائج.

ان المحلول المغدي و الحافظ المستعمل في هده الدراسة كانت له فعالية من حيث تقليص نسبة تشوه منطقة الاكروزوم مقارنة بالسائل المنوي الغير معامل بالوسط المغدي و الحافظ، و دلك خلال فترة المعادلة و اثناء صدمة البرودة ($P < 0.05$) انظر شكل 1 و 2. اما عند تدعيم الوسط المغدي و الحافظ بمضاد الاكسدة فيتامين Vit.E فكانت النتائج احسن خلال فترة المعادلة ($P < 0.001$) مقارنة بالعينات المعاملة بالوسط المغدي و الحافظ، و كانت جد معنوية

(P < 0.001) مقارنة بالعينات الغير معاملة بالوسط المغدي و الحافظ.. كما ادى تدعيم الوسط المغدي و الحافظ بكل من فيتامين E و EDTA الى نتائج جد ايجابية من حيث تقليص نسبة تشوه منطقة الاكروزوم خلال فترة المعادلة، حيث كانت النتائج معنوية مقارنة بالعينات المعاملة بالوسط المغدي و الحافظ. بينما كانت غير معنوية مقارنة بالعينات المعاملة بالوسط المغدي و الحافظ المضاف اليه هدا الفيتامين (شكل1).

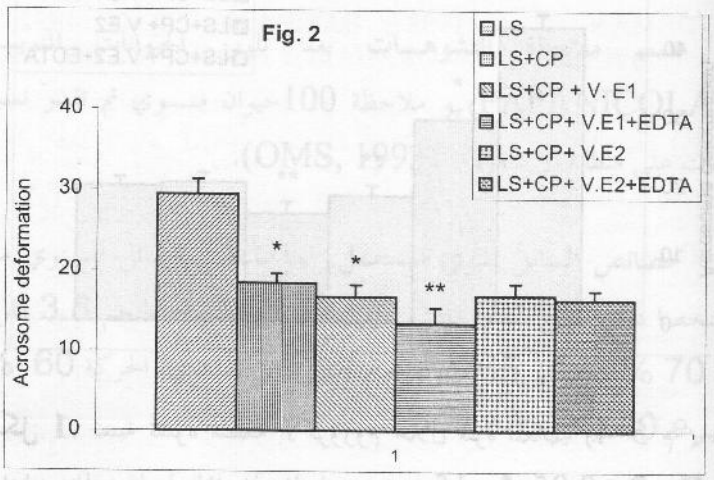


شكل 1. نسبة تشوه منطقة الاكروزوم خلال فترة المعادلة (4-5 م°) لمدة 3 ساعات (المتوسط ± الانحراف المعياري، ن = 15). * P< 0.05 ، ** P < 0.001.

LS، سائل منوي; CP، محلول مغدي و حافظ; VE1 ، تركيز الفيتامين 0.5 ملغ/100ملل; VE2، تركيز الفيتامين 1 ملغ/100ملل

وخلال صدمة البرودة ادى تدعيم الوسط المغدي و الحافظ بمضاد الاكسدة فيتامين E بتركيز 0.5 ملغ و المركب المخلبي EDTA الى تقليص نسبة التشوه الى حوالي 13.45 % مقارنة بالعينات المعاملة بالوسط المغدي و الحافظ او هدا الاخير مدعم بالفيتامين E. كمـــا كانت النتائج ايجابية مقارنة بالسائل المنوي الغير معامل(شكل2).

من خلال هده النتائج يمكن الخروج بنتيجة اولية هي ان الوسط المغدي و الحافظ المستعمل خصيصا لتخفيف السائل المنوي لغرض عملية التجميد، تزداد فعاليته عند تدعيمه بمضادات الاكسدة او بعض المركبات التي لها تاثير ايجابي على الخصائص الاساسية للحيونات المنوية.



شكل 2. نسبة تشوه منطقة الاكروزوم اثناء صدمة البرودة (0 م°) لمدة 10 دقائق (المتوسط ± الانحراف المعياري، ن = 15). * $P < 0.05$ ، ** $P < 0.001$.

LS، سائل منوي; CP، محلول مغدي و حافظ; VE1 ، تركيز الفيتامين 0.5 ملغ/100ملل; VE2, تركيز الفيتامين 1 ملغ/100ملل.

4 المـنـاقـشـة

على ضوء النتائج المتحصل عليها و استنادا إلى العديد من الأبحاث التي أجريت في هدا الـمـجـال، يمكن اعتبار أن الوسط الـمغدي و الحافظ المستعمل في هده الدراسة لـه فعالية في تقليص نسبة تشوه منطقة الأكروزوم لدى الحيونات الـمنويه عند لأنسان المعرضة لفترة المعادلة او صدمة البرودة. هـدا التاثير الايجابي راجع لمختلف مكونات الوسط الـمغدي و الحافظ المتمثلة في صفار البـيض حيث يعمل على تثبيت الاغشية الخلوية و دلك لاحتوائه على الفوسفولبيدات KAMPSCHMIDT, *et al*., 1953; GRAHAM & (FOOTE, 1987). هـدا بالاضـافه الى احتوائه على الجليسرول الدي يعمل على مـنع تكوين حبـيبات الثلج و بدلك فـهـو يـحد من تاثـيـرها السلـبي على اغـشـية الحيـونات المنوية POLGE & SMITH, 1949; (BAMBA & CRAN, 1992). الا انه وجد ان الاوساط المـغدية و الحافظـة تعمل بصفة عامـة على تقليص حركـة الحيونات المـنوية (CRISTER *et al.*, 1987; ZLATAREV *et al.*, 1988).و لدلك تضاف بعض المركبات التي لها تاثير ايجـابي على الخصائص الاساسية للحيونات المنوي.

تعتبر الحيونات المنوية من الخلايا الاكثر حساسية للمؤثرات سواء الداخلية او الخارجية و هدا راجع لطبيعة اغشيتها الخلوية و التي تحتوي على نسبة عالية من الاحماض الدهنية الغير مشبعه، كدلك نسبة الكولسترول/الفوسفولينيدات التي تختلف من حيوان منوي الى آخر (JONES & MANN, 1977 (SLATER, 1984). وعلى هدا الاساس فهي معرضة الى نواتج الاكسدة الداتية للدهون المتمثلة في الجدور الحرة التي تعمل على زيادة التشوهات على مستوى الاغشية خاصة منطقة الاكروزوم، و دلك عند تعرض الحيونات المنوية للظروف الهوائية او لظروف التجميد..مـن هدا المنطلق يضاف الى الاوساط المـغدية و الحافظـة مضادات الأكسدة خاصـة الفـيتامـين E الدى يعمل على الحد من

التاثير السلبي لنواتج الاكسدة و دلك نتيجة الارتباط بهـا. كدلـك يدعم الوسط المـغدي و الحافظ ببعض المركبات المـخلبية مثل EDTA الـذي يرتبط مع مـحـفزات الأكسدة الداتية للدهون BECONI *et al.*, (1991; BAMBA & CRAN, 1992). عـلى ضوء هده التفسيرات تقترح اغلب الابحاث التي تهتم بتكنولوجيا حفظ السائل المنوي بأن تضاف مضادات الأكسدة مباشرة بعدالحصول على السائل المنوي و هدا للحد من الأكسدة الداتية للدهون والدي يؤدي الى تقليص نسبة التشوهات على مستوى الأغشية و خاصة منطقة الأكروزوم التي تعتبر مفتاح الأخصاب. كـما يجب التركيز اكثر على التراكيز المستعملة سواء بالنسبة للأوساط المغدية و الحافظة او مضادات الأكسدة حتى نضمن ظروف ملائمة للحيونات المنوية خلال عملية التجميد و إزالة التجميد.

References المراجع

AITKEN R.J., CLARKSON J.S., & FISHEL S., 1989. Generation of reactive oxygen species,lipids peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 40:183-197.

AL-HANAK H., 1989. Effect of tocoferol on bull semen. *Animal.Science*, 26 (8):706-74.

BAMBA K. & CRAN D.G., 1992. Effects of treatment with BHT on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *Journal of Reproduction*, 95: 69-77.

BARTHELEMY C., ROYER D., HAMMANAH S., LEBOS C., THARANNE M. J., & LANSAC J., 1990. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Archives Andrology*, 25: 29-40.

BECONI.M T., AFFRANCHINO M.A., SCHANG L.M & **BEORLEGHI N.B., 1991.** Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. *Biochemical International*, 23 (3): 545-553.

BENNETT D.A., & WHITE I.G., 1977. Influences of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold shock. *Cryobiology*, 14: 466-470.

CRISTER J.K., ARNESON B.W., AKER D.V., HUSE-BENDA A.R., & BALLG.D., 1987. Cryopreservation of human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 47 (6): 980-984.

GRAHAM J.K., & FOOTE R. H., 1987. Effects of several lipids,fatty acyl chain length,and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24: 42-52.

GRAHAM J.K. & HAMMERSTED R.H., 1992. Differential effects of BHT analogs on bull sperm subjected to cold induced membrane stress. *Cryobiology*, 29: 106-117.

JONES R., MANN T., 1977. Damage of ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *Journal Reproductive Fertility*, 50: 255-260.

KAMPSCHMIDT R.F., MAYERD T., & HERMAN H.A., 1953. Lipids andlipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *Journal Dairy. Science*, 36: 733-742.

LINDEMANN C.B., OBRIEN J.A & GIBLIN F.J., 1988. An investigation of the effectivnes of certain antioxidants in preserving the motility of reactivted bull sperm models. *Biology of Reproduction*, 38:114-120.

MARINOV P., GROUDOVA G., SEMKOV M. & ZLATAREV C., 1983. Study of the effect of diluents containing antioxidants on the freezability of spermatozoa.in Cryobiology of sex cells.,*Bulletin of the Academy of Sciences, Sofia*, 112: 102-111

NETTER F. & GONDET A., 1974. Banque de sperm. Editions. Masson Cie.,Paris, p. 63-67.OMS, (1993). Manuel de laboratoire. Eds INSERM. Paris.

POLGE G., SMITH A., & PARKERS A., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*,164: 666-669.

PRINS G.S., & WEIDEL L., 1986. A conparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 46 (1): 147-149.

SLATER T.F., 1984. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochemical Journal*,222: 1-15.

WATSON P.F., 1982. The effects of cold schock on sperm cells membranes. In: effects of low temperature on biologycal membrane.Eds. Academic press. New york, p. 189-218.

ZLATAREV S., MARINOV P., MINCHEVA M., SPASOV C., & ANANIEV V., 1988. Investigation on media and regimes for

freezing of human semen. *In:* Cont. Prob. Biol. Immun. Reprod., *Bulletin of the Academy of Science, Sofia*; 103: 179-187.

*قسم البيولوجيا، كلية العلوم، جامعة عنابة ص ب **12** عنابة **23000**، الجزائر.

** مخبر التكاثر، المستشفى الجامعي ابن رشد، عنابة **23000**، الجزائر.