اثر سطوح مختلف آزاد کننده نیتریک اکساید بر میزان تحرک و حیات اسپرماتوزئیدها پس از یخ‌گشایی در قوچ افشاری

Effect of Different Levels of Nitric-oxide Donor on Motility and Viability of Spermatozoa Post Thawing in Afshari Rams.

حمیدرضا خدائی[۱]، سید حسین حجازی[۲]

۱- عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (مرکز گلپایگان) و دانشجوی دکترای تخصصی علوم دامی، پست الکترونیک: khodaei@khuisf.ac.ir

۲- عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

چکیده

به منظور بررسی اثر افزودن سدیم نیتروپروساید بر قدرت تحرک وحیات اسپرماتوزوئیدهای قوچ نژاد افشاری، پس از یخ‌گشایی، تعداد ۵۰ قوچ ۳-٤ ساله نژاد افشاری انتخاب و توسط واژن مصنوعی از آنها اسپرم‌گیری شد. نمونه‌ها پس از آنالیز کمی و کیفی توسط رقیق کننده رقیق شده و در دمای منفی ۱۹٦ درجه سانتی‌گراد در نیتروژن مایع به مدت ۱۰ هفته منجمد شدند. پس از یخ‌گشایی، نمونه‌ها بوسیله ٤ تیمار ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانومول سدیم نیتروپروساید در زمان‌های گوناگون (۵، ۱۵، ۳۰، ٤۵ و ٦۰ دقیقه) انکوبه شدند (هرتیمار ۲ تکرار) و با گروه شاهد توسط برنامه نامه نرم افزاری SAS مقایسه شدند. آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی انجام شد. نتایج طرح نشان داد غلظت‌های کم نیتریک اکساید، برخلاف غلظت‌های بالای آن، نه تنها از قدرت تحرک و مانایی اسپرم‌های قوچ نمی‌کاهد، بلکه باعث افزایش معنی‌دار در شاخص‌های مورد بحث شد. با توجه به نتایج حاصله حدس زده می‌شود نیتریک اکساید دارای نقش مهمی در کنترل کیفیت منی قوچ‌ها پس از یخ گشایی دارد.

کلمات کلیدی: نیتریک اکساید، اسپرماتوزوییید، قوچ

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

مدت کوتاهی است که مشخص شده است نیتریک اکساید نقش مهمی در کلیه فعالیت‌های تولید مثلی حیوانات دارد (Dixit and Parvizi, 2001). نیتریک اکساید در بدن از آنزیم نیتریک اکساید سینتتاز و از مولکول ال آرژنین ساخته می‌شود. نیتریک اکساید توانایی پیوند با کمپلکس‌های آهن - سولفور را دارد و از آنجایی که ساخت هورمون‌های جنسی استروئیدی با آنزیم‌هایی سروکار دارد که در آنها کملپکس‌های آهن – سولفور وجود دارد، نیتریک اکساید می‌تواند موجب تغییر فعالیت این آنزیم‌ها شود. نیتریک اکساید روی بسیاری از سلولها از جمله سلول‌های آندوتلیال عروق، ماکروفاژها و ماست سلها اثر می‌گذارد (Kuhn and Astrid, 2002). این سلول‌ها در بافت بینابینی بیضه نیز یافت شده‌اند ودر نتیجه منبع مهمی در آزاد سازی نیتریک اکساید در بافت بیضه می‌باشند (Dixit and Parvizi, 2001). مطالعات نیز نشان داده است که نیتریک اکساید دارای اثر مستقیم بر سلول‌های لایدیگ دارد و احتمالاً بر اسپرماتوژنز موثر است (Kuhn and Astrid, 2002 Zini *et al*., 2001) گزارش کردند نیتریک اکساید در محافظت سلول‌ها از طریق کاهش اثر رادیکال‌های اکسیژن موثر است. از مهمترین نکات در انجماد اسپرم و سپس یخ‌گشایی آن به حداقل رساندن آسیب‌ها به اسپرم‌ها است. مطالعات نشان داد، همبستگی معنی‌داری میان افزایش غلظت نیتریت و نیترات در سمینال پلاسما و کاهش درصد تحرک اسپرم‌ها وجود دارد(Huang and Khorram, 2002) .

مطالعات انجام شده پیرامون ارتباط غلظت نیتریک اکساید و قابلیت تحرک و ماندگاری اسپرم‌ها تنها در انسان صورت گرفته (Revelli *et al*., 2001) و در قوچ اطلاعاتی در دسترس نیست. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر افزودن آزادکننده‌های نیتریک اکساید به اسپرم‌ها در شرایط پس از یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۵۰ قوچ نژاد افشاری با میانگین سنی ۳ تا ٤ سال انتخاب شدند و در شرایط طبیعی گوسفنداری و جیره غذایی معمول نگهداری شدند. قوچ‌ها به مدت دو هفته به روش اسپرم گیری (واژن مصنوعی) عادت پذیر شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده، از نظر حجم منی، **pH**، غلظت،

Archive of SID

www.SID.ir

تحرک و مورفولوژی اسپرم‌ها مورد بررسی قرار گرفت سپس نمونه‌ها از نظر غلظت متابولیت‌های پایدار نیتریک اکساید (نیتریت و نیترات)، به وسیله روش گریس سنجیده شدند.

نمونه‌ها توسط رقیق کننده مناسب (Egg Yolk_TRIS Fructose) رقیق و در پایوت‌های مخصوص قرار داده شد و به طور تدریجی طی دو ساعت به دمای منفی۷۰ درجه سانتیگراد رسانیده شد و پس از آن در نیتروژن مایع قرار داده شدند. نمونه‌ها قبل از رقیق شدن از نظر غلظت متابولیتهای پایدار نیتریک اکساید (نیتریت و نیترات)، بوسیله روش گریس مورد بررسی قرار گرفتند.

پس از ۱۰ هفته، نمونه‌ها یخ‌گشایی شدند. با توجه به طرح کاملا تصادفی آزمایش، نمونه‌ها به طور تصادفی در ۵ گروه ۵ تایی (۲ تکرار) به ترتیب با غلظت‌های صفر نانومول (گروه شاهد)، ۲۵ نانومول، ۵۰ نانومول، ۱۰۰ نانومول و ۲۰۰ نانومول سدیم نیتروپروساید در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از آن در دقایق ۵، ۱۵، ۳۰، ٤٥ و ٦٠ قدرت تحرک و ماندگاری اسپرم بررسی شد. تحرک اسپرم با دستگاه کامپیوتری شمارش اسپرم و قابلیت حیات بوسیله رنگ آمیزی با ائوزین سنجیده شد. جهت مقایسه میانگین‌ها و انجام آزمون دانکن داده‌ها بوسیله نرم افزار آماری **SAS** آنالیز شد (SAS Institute, 1998).

نتایج و بحث

مطالعه حاضر نشان داد، غلظت ۲۵ نانومول سدیم نیتروپروساید در تمامی دقایق آزمایش قدرت حیاتی (ماندگاری) و تحرک اسپرماتوزوئیدها را بیش از سایر تیمارها و شاهد افزایش داد (**P<۰/۰۵**)، درصد اسپرم زنده تیمار اول از ۸۰ درصد در دقیقه پنجم به ٦٠ درصد در دقیقه ٦٠ کاهش یافت، این میزان اگرچه در سطح ۵ درصد، نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت، اما از نظر کمی همواره عددی بالاتر از گروه شاهد را نمایش داد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱ ـ اثر سدیم نیتروپروساید بر تحرک اسپرماتوزوئیدهای قوچ پس از یخ‌گشایی

Table 1.Effect of Sodium Nitroproside on Rams Sperm Motility Then Thawing.

Sodium Nitroproside	Sperm motility				
	5 min	15 min	30 min	45 min	65 min
No Treatment	73 ± 3^{a}	$72 \pm 4a$	$66 \pm 3a$	$53 \pm 5a$	$51 \pm 5a$
A1(25NM)	79 ± 2^{b}	$73 \pm 2a$	$68 \pm 6a$	$59 \pm 2b$	$57 \pm 6b$
A2(50NM)	$68 \pm 6c$	$66 \pm 1b$	$57 \pm 5b$	$49 \pm 6c$	$57 \pm 6b$
A3(100NM)	$67 \pm 5c$	$60 \pm 4c$	$51 \pm 4c$	$37 \pm 7d$	$35 \pm 4d$
A4(200NM)	$54 \pm 4d$	$53 \pm 7d$	$48 \pm 6c$	$37 \pm 7d$	$30 \pm 6d$

حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است. (P >۰/۰۵)

Means in each column without common letters significantly (P<0.05).

نتایج همچنین نشان داد، سدیم نیتروپروساید درصد اسپرم زنده را در تیمارهای سوم و چهارم به سرعت کاهش می‌دهد (P < ۰/۰۵)، به نحوی که درصد اسپرم زنده در دقایق ٤٥ و ٦٠ به کمتر از ٤٠ درصد در این دو تیمار می‌رسد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد نیتریک اکساید و آزاد کننده آن بر فیزیولوژی اسپرم پس از یخ گشایی موثر است. اندازه‌گیری پیش از آزمون غلظت نیتریک اکساید در مایع منی، حضور متابولیت‌های پایدار نیتریک اکساید را مشخص نمود. به طور میانگین مجموع متابولیت‌های پایدار نیتریک اکساید در مایع منی قوچ ۱۰ نانومول برآورد شد. بنابراین در گروه شاهد نیز که نیتروپروساید وجود نداشت، به طور معمول ۱۰ نانومول نیتریک اکساید وجود داشت. تیمار اول با ۲۵ نانومول بیشترین تاثیر را بر حیات اسپرم‌ها و قدرت تحرک آنها داشت. این موضوع با تحقیقاتی در مورد منی انسان و هامستر منطبق است (Revelli *et al.*, 2001) . در این پژوهش‌ها نیز مشخص شده است اسپرماتوزوئیدهای انکوبه شده با غلظت‌های ناچیز آزاد کننده نیتریک اکساید اثر مطلوبی بر قدرت تحرک و حیات اسپرم‌ها دارند در حالی‌که مهار کننده‌های آن از قدرت تحرک و حیات اسپرم‌ها می‌کاهند. البته در مورد انسان مقالاتی نیز وجود دارد که هر گونه ارتباط میان نیتریک اکساید و کیفیت منی را رد می‌کند (Revelli *et al.*, 2001) . اما نتایج این آزمایش از اثر گذاری نیتریک اکساید پس از یخ‌گشایی مایع منی حکایت دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

اصولاً هیدروژن پراکساید و رادیکال‌های هیدروکسیل اثر کشنده بر اسپرم دارند. بعضی از مطالعات نشان دادند، غلظت‌های کم هیدروژن پراکساید یا آنیون سوپراکساید موجب افزایش ظرفیت پذیری اسپرم در بعضی از پستانداران می‌شود (Aitken *et al.*, 2004) . از این‌رو به نظر می‌رسد غلظت‌های کم نیتریک اکساید موجب افزایش توانایی باروری اسپرم شود. از طرفی نشان داده شده است نیتریک اکساید اثر مستقیمی بر واکنش‌های آکروزومی دارد (Aitken *et al.*, 2004) اما با توجه با شرایط انجام آزمایش حاضر که شامل رقیق سازی، انجماد و ذوب مجدد منی می‌باشد؛ نیتریک اکساید احتمالاً اثر خود را به دلیل خاصیت محافظت سلولی اش اعمال می‌کند. نیتریک اکساید دارای اثر ضد پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلول است(Nathan, 1992) . اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز (به عنوان شاخصی جهت سنجش سلامتی غشای سلول اسپرم‌ها (Khodaei, 2000) مایع منی نیز نشان داد، کمترین میزان این آنزیم در تیمار اول مشاهده می‌شود، در حالی‌که در تیمار سوم و چهارم افزایش غلظت لاکتات دهیدروژناز به طور کاملاً معنی‌داری در سطح یک درصد دیده شد.در پایان پیشنهاد می‌شود اثر افزودن آزاد کننده نیتریک اکساید در قدرت لقاحی قوچ در شرایط مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد.

بعضی مواقع گروهی از ترکیبات و بیو مولکول ها علم فیزیولوژی را بسیار یاری می‌کنند. به نظر میرسد نیتریک اکساید یکی از آنها باشد. نتیجه نهایی تحقیق نشان می‌دهد ازاد کننده نیتریک اکساید به عنوان یک ماده محرک می‌تواند قدرت تحرک و ماندگاری اسپرم‌ها را زیاد کند و به عبارتی یکی از مشکلات مهم را پس از یخ گشایی اسپرم از پیش رو بردارد. شاید از این موضوع بتوان برای اسپرم سایر گونه‌های جانوری و انسان نیز بهره برد.

سپاسگزاری

از همکاری پژوهشکده امین اصفهان و آزمایشگاه دکتر جلایر اصفهان و آزمایشگاه بیمارستان نور و حضرت علی اصغر که در تهیه مواد آزمایشی و ازت مایع ما را در این تحقیق همراهی نموده‌اند، سپاسگزاریم.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

AITKEN, J.A., A.L.RYAN, M.A.BAKER and E.A.MCLAUGHLIN. 2004. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. Free Radi. Biol. and Med. (36): 994-1010.

DIXIT, V.D. and N. PARVIZI. 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. Anim. Repord. Sci. (65):1-16.

HUANG, I and 0. KHORRAM. 2002. Seminal plasma nitric oxide (NO) and its correlation with sperm quality Ferti. Steril, (78): S206-S207.

KODAEI, H.R. 2000. Relationship between changes in the serum concentration of T_3 and T_4 with serum levels of Testosterone and seminal characteristics in Ghezel and Mehraban rams. M.Sc.Thesis. Department of Animal Science, Shiraz University.P:31.

KUHN, H and ASTRID, B. 2002. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. Free Radi. Biol. and Med.(33):154-162.

NATHAN, C.1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J.(6):3051-3064.

REVELLI, A., L.BERGANDI, M.MASSOBRIO, B.LINDBLOM, A.BOSIA and D.CHIGO. 2001. The concentration of nitrite in seminal plasma does not correlate with sperm concentration, sperm motility, leukocytospermia or sperm culture, Ferti . Steril. (76): 496-500.

SAS INSTITUTE. 1998. SAS/STAT users Guide. Version. 6.03.SAS Institute Inc,Cary,Nc.

ZINI, A., M.K.O BRYAN and P.N.SCHLEGEL. 2001. Nitricoxide synthase in human seminaplasma.Urology(58):85-89.

Archive of SID

www.SID.ir