فعالية الوسط المغذي والحافظ ومضادات الأكسدة على حركة وتشوه أكروزوم الحيوانات المنوية عند الإنسان خلال فترة المعادلة وصدمة البرودة

تاريخ استلام البحث 13/04/2002- تاريخ قبوله 26/07/2003

ملخص

لقد حاولنا من خلال هده الدراسة تسليط الضوء على فعالية بعض مضادات الأكسدة المضافة إلى إحدى الأوساط المغذية والحافظة على الجانب البيولوجي والمورفولوجي للحيوانات المنوية عند الإنسان، وذلك خلال فترة المعادلة وصدمة البرودة. بالنسبة للجانب البيولوجي والمتمثل في قياس نسبة الحركة، أظهرت الدراسة أن الوسط المغذي والحافظ أو هذا الأخير مضاف إليه مضادات الأكسدة (ViT E) او المركب المخلبي كان لهم فعالية في الحفاظ على حركة الحيوانات المنوية سواء خلال فترة المعادلة أو صدمة البرودة، وذلك مقارنة بتلك الغير معاملة. بالنسبة لتشوه منطقة الأكروزوم، أوضحت النتائج أن الوسط المغذي والحافظ المستعمل أو عند تدعيمه بمضاد الأكسدة (ViT E) أو المركب المخلبي كانت له فعاليه كبيرة في تقليص نسبة التشوه وذلك سواء خلال فترة المعادلة أو صدمة البرودة مقارنة بتلك النسب المحصل عليها في العينات الغير معاملة.

الكلمات المفتاحية: *مضادات الأكسدة، حيوان منوي، وسط مغذي وحافظ، أكروزوم.*

خليلي كمال
مسيخ سامية
عبد النور شريف
جبالي نصيرة
بولعقود محمد الصالح
قسم البيولوجيا، كلية العلوم،
جامعة باجي مختار
عنابة، ص.ب 12عنابة
23000، الجزائر

Résumé

Au cours de cette étude, nous avons tenté de mettre en évidence l'efficacité de certains antioxydants, introduits dans le milieu cryoprotecteur, sur les aspects biologiques et morphologiques des spermatozoïdes. Cette étude à été effectuée pendant l'équilibration et le cryochoc. En ce qui concerne la mobilité, nous avons relevé que celle-ci est améliorée en milieu cryoprotecteur et cette amélioration est d'autant plus importante que ce milieu reçoit les antioxydants (ViT E & EDTA). La même observation peut être faite en ce qui concerne la déformation de l'acrosome. Ces observations ont été remarquées aussi bien pendant l'équilibration que pendant le cryochoc.

Mots clés: *Antioxydants, ViT E, spermatozoïdes, cryoprotecteur acrosome, mobilité.*

Abstract

In this study, we tried to investigate the effectiveness of some added antioxidants to the cryoprotector medium, on the biology and morphology of huma spermatozoa, during equilibration, and cryoshock. The biological side, which represented by the measurement of normal sperm motility, after adding the cryoprotector medium alone in combination with an antioxidant (ViT E), has showed a remarkable effect in storing the normal motility during equilibration and cryoshock. When combining both EDTA and Alpha tocopherol, with the cryoprotector medium, the storing motility was much better compared with that of non treated spermatozoa.

For the acrosome damage, the results have showed that the used cryoprotector medium has reduced the percentage of acrosome damage during equilibration and cryoshock, compared with the non treated seminal liquid. However, after adding the antioxidants (ViT E & EDTA) to the cryioprotector medium, the effectiveness has increased, either during equilibration or cryoshock, compared to the seminal liquid in the cryoprotector medium.

Keywords: *Antioxidants, ViT E, spermatozoa, cryoprotector medium and acrosome, motility.*

K. KHELILI
S. MESSIKH
C. ABDENNOUR
N. DJEBALI
M.S. BOULAKOUD
Département de Biologie
Faculté des Sciences
Université Badji Mokhtar
BP12, 23000 Annaba

إن الاستعمالات الواسعة للتلقيح الاصطناعي، أدت إلى تكثيف الأبحاث في مجال تكنولوجيا حفظ السائل المنوي، عند درجات حرارة منخفضة سواء بالنسبة لحيوانات المزرعة أو الإنسان، وذلك لغرض الحفاظ أو تحسين بعض الخصائص البيولوجية للحيوانات المنوية المعرضة لظروف التجميد أو التقليل من التأثيرات السلبية لدرجات الحرارة المنخفضة ولظروف الهوائية، أو نواتج الأكسدة الذاتية للدهون، وهذا راجع لكون أن الحيوانات المنوية من الخلايا الحساسة للتأثيرات الخارجية والداخلية ومن السهل أن تفقد أهم خصائصها الأساسية مثل النشاط الحركي المتمثل في الحركة الكلية أو السرعة، الشكل خاصة تشوهات منطقة الأكروزوم والحيوية، خاصة خلال ظروف التجميد [7،16،14،22،25] .

© جامعة منتوري، قسنطينة، الجزائر، 2003.

تعتبر الحركة من بين الخصائص الأساسية التي تتميز بها الحيوانات المنوية ولذلك تضاف للوسط المغذي والحافظ بعض المركبات التي لها علاقة مباشرة أو غير مباشرة في الحفاظ على الخصائص الحركية للحيوانات المنوية مثل السكريات ،مواد بيولوجية فعالة، بعض الأيونات والفيتامينات [1،3،23،26].

إن منطقة الأكروزوم تعتبر مفتاح الإخصاب وذلك لما تحتويه من إنزيمات تمكن الحيوان المنوي من اختراق أغشية البويضة أثناء عملية الإخصاب، إلا أنه وجد أن منطقة الأكروزوم تعتبر من المناطق الأكثر حساسية لدرجات الحرارة المنخفضة ونواتج الأكسدة الذاتية للدهون المتمثلة في الجذور الحرة التي لها تأثير سام على أغشية الحيوانات المنويـة [9،17،19،27].

من بين أهم التوجهات في الوقت الحاضر إمكانية التقليل من التأثيرات السلبية لمختلف العوامل المؤثرة على أهم الخصائص الأساسية للحيوانات المنوية، مثل درجات الحرارة المنخفضة، ظروف التجميد تجميد / إزالة التجميد، بالإضافة إلى نواتج الأكسدة الذاتية للدهون، وذلك من خلال استعمال الأوساط المغذية والحافظة ذات التركيب الأساسي المتمثل في صفار البيض، سكريات، جليسرول، المضادات الحيوية والمحاليل المنظمة [20،27]. أو هذه الأوساط المغذية والحافظة المدعمة بمختلف المركبات التي لها تأثير إيجابي على أهم الخصائص الأساسية للحيوانات المنوية اصبح حتمية، ومن بين هده المركبات نجد الفيتامين (E) كمضاد للأكسدة والمركب المخلبي (EDTA). بالإضافة إلى بعض الأيونات المنشطة لحركة الحيوانات المنوية [3،4،10،13].

وعلى هذا الأساس قمنا بهذه الدراسة لمعرفة مدى فعالية الوسط المغذي والحافظ ومضاد الأكسدة،فيتامين (E) والمركب المخلبي (EDTA) في حفظ منطقة الأكروزوم والقدرات الحركية لدى الحيوانات المنوية للأنسان، من التأثيرات السلبية لدرجات الحرارة المنخفضة وذلك خلال فترة المعادلة عند درجة حرارة 5-4 °م لمدة 3 ساعات وصدمة البرودة عند 0 ° م لمدة 10 دقائق .

الأدوات والطرق

الحصول على العينات

تم الحصول على العينات المتمثلة في السائل المنوي من 15 شخصا عاديا، حضروا إلى مخبر التكاثر لأجراء تحليل السائل المنوي، بعد فترة استمناع عن ممارسة الجنس مدتها أربعة أيام، تجرى بعد ذلك عملية التسييل لمدة ساعة عند درجة حرارة 37° م، ثم أجريت الدراسة التحليلية للسائل المنوي Spermogramme، حيث قدرت أهم الخصائص الأساسية [15].

تقسم بعد ذلك كل عينة إلى أحجام متساوية. الشاهد لا يضاف له الوسط المغذي والحافظ بينما تعامل بقية الأحجام ل بالوسط المغذي والحافظ أو مضاد الأكسدة والمركب المخلبي.

تحضير الوسط المغذي والحافظ

لقد استعمل الوسط المغذي والحافظ ذو التركيب التالي. صفار البيض 30 ملل، جليسرول 21 ملل، فراكتوز500 ملل، سترات الصوديوم 1 غ، بنسيلين 300000 وحدة دولية، ستربتوميسين 600 ملغ وماء مقطر 100 ملل. كما تم استعمال فيتامين (E) كمضاد للأكسدة بتركيز 0.5 ملغ و 1ملغ / 100 ملل وسط مغذي وحافظ. أما بالنسبة للمركب المخلبي (EDTA) فقد استعمل بتركيز 10 ملي مول [14].

طريقة العمل

خفف السائل المنوي بنسبة حجم/ حجم بواسطة الوسط المغذي والحافظ، أو هدا الأخير مدعم بالفيتامين E أو بالمركب المخلبي EDTA ، ثم وضعت العينات لفترة المعادلة عند درجة حرارة 5-4 °م لمدة ثلاث ساعات. أما بالنسبة لصدمة البرودة فوضعت العينات في حمام مائي ذي درجة حرارة 0° م لمدة 10 دقائق، قدرت بعد ذلك نسبة الحركة الكلية، ثم ملاحظة التشوهات بعد عملية التلوين حسب طريقة Papanicolaou [15] والمتمثلة في تلوين منطقة الأكروزوم باللون الأزرق والقطعة المتوسطة باللون الأحمر أما الذيل باللون الأصفر وهذا من خلال استعمال الصباغات التالية (Hematoxyline, Solution de Scott et E.A 50). بعد ذلك يتم تحديد 100 حيوان منوي، ثم قدرت نسبة التشوهات على مستوى منطقة الأكروزوم.

خصائص السائل المنوي المستعمل

لقد استعمل السائل المنوي من 15 شخص ذوي سائل منوي عادي يتميز بالخصائص التالية:

- حجم القذفة المنوي 3.8 ملل.
- حيوية الحيوانات المنوية 70%.
- التركيز 65 مليون حيوان منوي/ ملل سائل منوي.
- نسبة الحركة الكلية 60% .
- سرعة الحيوانات المنوية 40 ميكرومتر/ ثانية.

تحليل النتائج المتوصل إليها تم باستعمال اختبار الطالب Student *t-test* واختبار التباين.

النتائج

من خلال النتائج المتوصل ا ليها في هده الدراسة التي تهدف الى معرفة مدى فعالية الوسط المغذى والحافظ المستعمل في مجال تكنولوجية حفظ السائل المنوي خلال درجات الحرارة المنخفضة أو عند تدعيمه إما بالفيتامين E أو بالمركب المخلبي EDTA ، يمكن اعتبار أن الوسط المغذي والحافظ كان له فعالية من حيث الحفاظ على الحركة الكلية لدى الحيوانات المنوية وذلك خلال فترة المعادلة

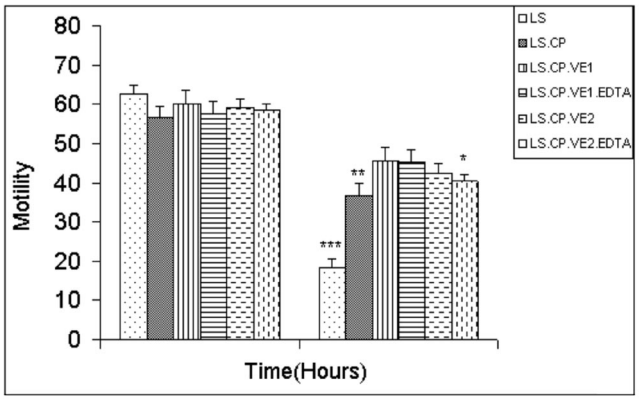
$p<0.01$ وصدمة البرودة $p<0.05$ مقارنة مع نسبة الحركة الكلية في السائل المنوي غير المعامل كما هو موضح في شكل(1,2). أما عند إضافة كل من الفيتامين E أو المركب المخلبي EDTA إلى الوسط المغذي والحافظ فكانت نسبة الحركة الكلية احسن خاصة خلال فترة المعادلة $p< 0.05$، بينما خلال صدمة البرودة فكانت نتائج نسبة الحركة الكلية متقاربة مع تلك المسجلة عند استعمال سواء الفيتامين E مع الوسط المغذي والحافظ أو الوسط المغذي والحافظ لوحده، بينما كانت معنوية مقارنة مع نسبة الحركة الكلية في السائل المنوي غير المعامل حيث لوحظ نقص معتبر في النشاط الحركي لدى الحيوانات المنوية $p<0.01$.

بالنسبة لنتائج الجزء الثاني المتوصل إليها الخاصة بمدى فعالية الوسط المغذى والحافظ أو هذا الأخير مدعم بالفيتامين E أو بالمركب المخلبي EDTA ، في حفظ منطقة الأكروزوم من التشوهات خلال فترة المعادلة وصدمة البرودة مدونة في شكل(3,4) حيث نلاحظ أن الوسط المغذي والحافظ أدى إلى تقليص نسبة تشوهات منطقة الأكروزوم وذلك خلال فترة المعادلة وصدمة البرودة $p<0.05$، أما عند تدعيمه بمضاد الأكسدة فيتامين E أو بالمركب المخلبي EDTA فكانت النتائج احسن مقارنة بتلك المسجلة في السائل المنوي المعاملة بالوسط المغذي والحافظ أو تلك العينات الغير معاملة. كما أدى استعمال الفيتامين E بتركيز0.5 ملغ/100ملل والمركب المخلبي EDTA إلى نتائج معنوية$p<0.01$ من حيث تقليص نسبة تشوه الأكروزوم خلال صدمة البرودة وفترة المعادلة، مقارنة بتلك النسب المسجلة في العينات المعاملة بالوسط المغذي والحافظ أو الغير معاملة.

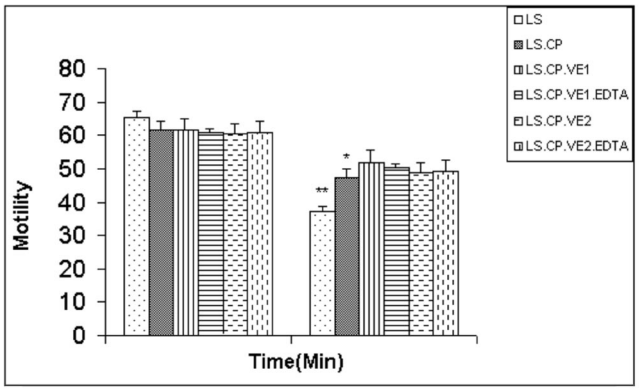
من خلال النتائج المتوصل إليها يمكن الخروج بنتيجة أولية آلا وهي أن الوسط المغذي والحافظ المستعمل، خصيصا لتخفيف السائل المنوي لغرض عمليات التجميد، تزداد فعالياته عند تدعيمه بمضادات الأكسدة والمركبات المخلبية أو ببعض المركبات التي لها تأثير إيجابي على الخصائص الأساسية للحيوانات المنوية.

المناقشة

على ضوء النتائج المتوصل إليها من هذه الدراسة واستنادا إلى العديد من الأبحاث التي أجريت في مجال تكنولوجية حفظ السائل المنوي سواء عند حيوانات المزرعة أو عند الإنسان، يمكن اعتبار أن الوسط المغذي والحافظ المستعمل له فعالية في الحفاظ على أهم الخصائص الأساسية التي تتميز بها الحيوانات المنوية والمتمثلة في النشاط الحركي وتشوهات منطقة الأكروزوم وذلك خلال فترة المعادلة وصدمة البرودة. هذا التأثير

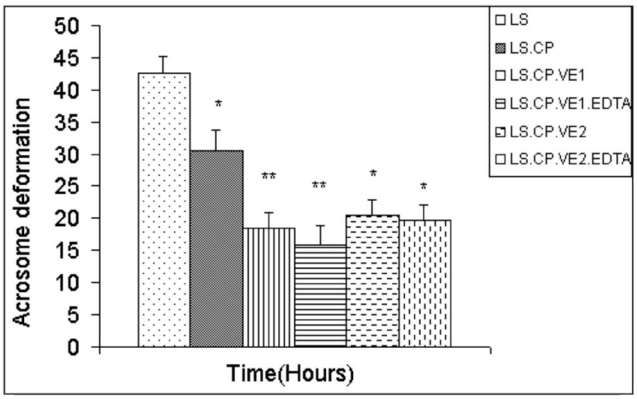


شكل1: نسبة الحركة الكلية للحيوانات المنوية خلال فترة المعادلة (5-4 °C) لمدة 3 ساعات (المتوسط± الانحراف المعياري، ن = 15). *P<0.5 ; **P<0.01 ; ***P<0.001 .

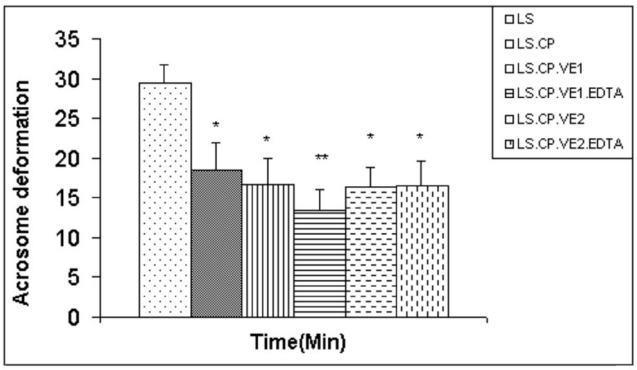


شكل2: نسبة الحركة الكلية للحيوانات المنوية خلال صدمة البرودة (0 °C) لمدة 10 دقائق (المتوسط± الانحراف المعياري، ن = 15). *P<0.5 ; **P<0.01 .

الإيجابي راجع لمختلف مكونات الوسط المغذي والحافظ المتمثلة في السكريات كمصدر للطاقة، صفار البيض الذي له دور أساسي في تثبيت الأغشية الخلوية وذلك لاحتوائه على الفوسفولبيدات [8،12،20]. هذا بالإضافة إلى احتواء الوسط المغذي والحافظ على الجليسرول الذي يعمل على منع تشكل حبيبات الثلج داخل الحيوانات المنوية، وبدلك يحد من التأثير السلبي لظروف التجميد على أغشية الحيوانات المنوي [1،6،4]. ألا انه وجد أن الأوساط المغذية والحافظة تعمل بصفة عامة على تقليص حركة الحيوانات المنوية من خلال بعض مكوناته ذات الطبيعة الغروية [8،20]. لذلك من الأحسن أن تضاف بعض المركبات التي لها تأثير إيجابي على أهم الخصائص الأساسية للحيوانات المنوية [3,4,23]. تعتبر الحيوانات المنوية من الخلايا الأكثر حساسية للمؤثرات سواء الخارجية أو الداخلية خاصة ظروف التجميد عند درجات الحرارة المنخفضة، وهذا راجع لطبيعة أغشيتها الخلوية التي تحتوي على نسبة عالية من الأحماض الدهنية الغير



شكل3: نسبة تشوه منطقة الأكروزوم خلال فترة المعادلة (4-5 °C) لمدة 3 ساعات (المتوسط ± الانحراف المعياري، ن = 15) . P<0.01** ; P<0.5*



شكل4: نسبة تشوه منطقة الأكروزوم خلال صدمة البرودة (0 °C) لمدة 10 دقائق (المتوسط ± الانحراف المعياري، ن = 15). . P<0.01** ; P<0.5*

المختصرات

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

مشبعة، كذلك نسبة الكوليسترول / الفوسفوليبيدات التي تختلف من حيوان منوي إلى آخر [11,19,5]. لذلك نجد أن الحيوانات المنوية خلال إجراء عملية التجميد تكون معرضة إلى العديد من المؤثرات ابتداء من عملية الحصول على السائل المنوي، ثم عملية المعادلة التي تعتبر من المراحل الحرجة في تكنولوجية حفظ السائل المنوي ومن بين هذه المؤثرات، نواتج الأكسدة الذاتية للدهون المتمثلة في الجذور الحرة التي تكون سبب في زيادة تشوهات منطقة الأكروزوم [21,25]. من هذا المنطلق وكما تأكده أغلب الأبحاث الخاصة بتكنولوجية حفظ السائل المنوي [20,18,12]، يجب إضافة إلى الأوساط المغذية والحافظة مركبات بيولوجية أساسية مثل مضادات الأكسدة المتمثلة أساسا في فيتامين E الذي يعمل على الحد من التأثيرات السلبية لنواتج الأكسدة المتمثلة في الجذور الحرة [24,21,27]. وذلك من خلال ارتباطه بها. كذلك يدعم الوسط المغذي والحافظ ببعض المركبات المخلبية التي لهل دور أساسي في الحد من عملية الأكسدة الذاتية للدهون من خلال ارتباطه بالمحفزات الخاصة بالأكسدة الذاتية للدهون [3,6,18,2].

النتيجة النهائية من هذه الدراسة تتمثل في أن مضادات الأكسدة أو المركب المخلبي المستعملين في الأوساط المغذية والحافظة لهما تأثير إيجابي على الجانب البيولوجي المتمثل في حركة الحيوانات المنوية والمورفولوجي من خلال تقليص نسبة تشوه الأكروزوم، وذلك خلال فترة المعادلة وصدمة البرودة.

المراجع

[1]- Ackerman D.R., "Fructose utilization of spermatozoa cooling and freezing", *Inter. Fertil.,* N°12, (1967), pp.1-4.

[2]- Aitken R.J., Clarkson J.S. and Fishel S., "Generation of reactive oxygen species, lipids peroxidation and human sperm function ", *Biol. Reprod.,* 40 (1989), pp.183-197.

[3]- Al-Hanak H., "Effect of tocoferol on bull semen", *Animal. Scie*., 26, N°8 (1989), pp.70-74.

[4]- Bamba K. and Cran D.G., "Effects of treatment with BHT on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution", *J. Reprod*., 95, (1992), pp.69-77.

[5]- Barthelemy C., Royer D., Hammanah S., Lebos C., Tharanne M. J. and Lansac J., "Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation", *Archiv. Androl.,* 25, (1990), pp.29-40.

[6]- Beconi.M.T., Affranchino M.A., Schang L.M. and Beorleghi N.B., "Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm", *Biochem. Inter*., 23, N°3, (1991), pp.545-553.

[7]- Crister J.K., Arneson B.W., Aker D.V., Huse-Benda A.R. and Ball G.D., "Cryopreservation of human spermatozoa", *Fertil. Steril.,* 47, (1987), pp.980-984.

[8]- Graham J.K. and Foote R. H., "Effects of several lipids, fatty acid chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing" *Cryobiology,* 24, (1987), pp.42-52.

[9]- Graham J.K. and Hammersted R.H., "Differential effects of BHT analogs on bull sperm subjected to cold induced membrane stress", *Cryobiology*., 29, (1992), pp.106-117.

[10]- Jones R. and Mann T., "Damage of ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids", *J. Reprod. Fertil*., 50, (1977), pp.255-260.

[11]- Kampschmidt R.F., Mayerd T. and Herman H.A., "Lipids and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa", *J. Dairy. Scie*., 36, (1953), pp.733- 742.

[12]- Lindemann C.B., Obrien J.A. and Giblin F.J., "An investigation of the effectiveness of certain antioxidants in preserving the motility of reactivated bull sperm models", *Biol. reprod*., 38, (1988), pp.114-120.

[13]- Marinov P., Groudova G., Semkov M. and Zlatarev C., "Study of the effect of diluents containing antioxidants on the freezability of spermatozoa in Cryobiology of sex cells", *Bull. Acad. Scie*., *Sofia*, (1983), pp.102-111.

[14]- Netter F. and Gondet A., "Banque de sperm", *Eds. Masson Cie.,* Paris, (1974), pp.63-67.

[15]- OMS., "Manuel de laboratoire", Eds INSERM (1993).

[16]- Polge G., Smith A. and Parkers A., "Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures", *Nature*, 164, (1949), pp.666-669.

Biotech., Sousse, Tunisie (2001), pp.9-11.

[23]- Khelili K., Boulakoud. M.S. and Abdennour C., "Study on The effect of bradykinin and bradykinin analogues on bovine sperm motility *in vitro*", *C.R. Acad. Bul. Scie*., 53, 4 (2000), pp.107-110.

[24]- Aurousseau B., "Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits", *INRA Prod. Anim.,* 15,(2002), pp.67-82.

[25]- Leboeuf B., Restall B. and Salamon S., "Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle", *INRA Prod. Anim.,* 16, (2003), pp.91-99.

[26]- Dalvit G.C., Cetica P.D. and Beconi T., "Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization", *Theriogenology,* 49, (1998), pp.619-627.

[27]- Blondin P., Coenen K. and Sirard M.A., "The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation", *J. Androl*., 18, (1997), pp.454-460.

[17]- Prins G.S. and Weidel L., "A comparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa", *Fert. Ster*., 46, N°1, (1986), pp.147-149.

[18]- Slater T.F., " Free radical mechanism in tissue injury", *Biochem. J*., 222, (1984), pp.1-15.

[19]- Watson P.F., "The effects of cold schock on sperm cells membranes. In: effects of low temperature on biologycal membrane ", *Eds. Acad. press. New York*, (1982), pp.189-218.

[20]- Zlatarev S., Marinov P., Mincheva M., Spasov C. and Ananiev V., "Investigation on media and regimes for freezing of human semen", In*: Cont. Prob. Biol. Immun. Reprod., eds., Bul. Acad. Scie., Sofia*, (1983), pp.179-187.

[21]- Wense D.L., Peaster M.L., Himsl K.K., Leach G.E., Lad P.M., Zimmern P.E., "Stimulated reactive oxygen species generation in the spermatozoa of infenile men". *J. Urol.*, (1993), p.149.

[22]- Mokadem H. and Khelili. K., "Exploration cytologique et biochimique dans l'hypofertilite masculin", *Jour. Scie. A.T.*