ارزیابی میزان زنده/ مرده و قطرات پروتوپلاسمی اسپرم اپیدیدیمی در قوچ زل ایران در پاییز و زمستان

دکتر پرویز تاجیک[1]* دکتر حمید قاسم زاده نوا[1] دکتر صمد لطف الله زاده[2] دکتر محمد رضا شیرزاد[3]

دریافت مقاله: ۲۰ فروردین ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۲۶ خردادماه ۱۳۸۲

هدف: ارزیابی تعداد اسپرمهای زنده و مرده و نابالغ در اپیدیدیم قوچ زل ایران در پاییز و زمستان.

طرح: مطالعه توصیفی.

حیوانات: قوچهای زل ایران.

روش: گرفتن بیضه ۵۰ رأس از قوچهای زل در کشتارگاه در فصول پاییز و زمستان، برش قسمتهای سر، بدنه و دم اپیدیدیم و قرار دادن اسپرم به تفکیک بیضه راست و چپ و قسمتهای مختلف اپیدیدیم روی لام، افزودن یک قطر از رنگ ائوزین نیکروزین در کنار اسپرم و مخلوط نمودن آنها، تهیه گسترش و بلافاصله خشک نمودن آن، بررسی تعداد اسپرمهای زنده و مرده و همچنین تعداد اسپرمهای دارای قطره پروتوپلاسمی با استفاده از میکروسکپ نوری.

تجزیه و تحلیل آماری: مطالعه توصیفی، استفاده از مربع کای.

نتایج: نتایج نشان داد که ۷۱ درصد اسپرمهای شمارش شده زنده بودند. درصد اسپرمهای زنده در بیضه های چپ و راست و در فصل پاییز و زمستان و همچنین قسمتهای مختلف اپیدیدیمی با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشته. همچنین از لحاظ دارا بودن قطره پرتوپلاسمی ۵۷ درصد کل اسپرمهای جمع آوری شده دارای قطره پروتوپلاسمی بودند اسپرمهای دارای قطره پروتوپلاسمی در بیضه های چپ و راست و از قسمتهای مختلف اپیدیدیمی (سر، بدنه، دم) در فصول پاییز و زمستان تفاوت معنی داری نداشت.

نتیجه گیری: به طور خلاصه جمعیت قابل توجه اسپرمها در پاییز و زمستان در نواحی مختلف اپیدیدیمی گوسفند زنده بوده و و می توان از اسپرم اپیدیدیمی قوچ زل به عنوان منبع ذخیره اسپرم استفاده نمود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۱، ۲۸-۲۵.

واژه های کلیدی: اسپرم اپیدیدیمی، قطره پروتوپلاسمی، قوچ زل، رنگ آمیزی.

Assessment of live/dead and protoplasmic droplets in epididymal sperm cells in Iranian Zell rams in autumn and winter

Tajik, P.,[1] Ghasemzadeh-Nava, H.,[1] Lotfollahzadeh, S.,[2] Shirzad, M.R.[3]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.* [2]*Large Animal Medicine Specialist, Tehran - Iran.* [3]*Private practitioner, Tehran - Iran.*

Objective: Comparison the ratio of live and dead sperm cells and investigation protoplasmic droplets of sperm cells collected from different parts of epididymis of Zell rams in autumn and winter.

Design: Descriptive study.

Animals: Zell rams.

Procedure: Zell ram testicles (n=100) were obtained from slaughter-house, different parts of epididymis (caput, corpus and cauda) were incised. The sperm samples derived from each part were put onto the slide glass. Samples were stained using eosin - nigrosin procedure and examined under an optic microscope.

Statistical analysis: Descriptive statistics, χ^2-test.

Results: Totally, 71% of sperm cells were alive. The proportion of live sperms in right and left testicles were not significantly different. Protoplasmic droplets were observed in 57% of sperm cells, of which no significant different was seen among different parts of epididymis (caput, corpus and cauda) and among left and right testicles in autumn or winter.

Conclusion: A considerable part of Zell rams epididymal sperm cells are alive in autumn and winter and could be considered as a sperm reservoir for further use. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 1: 25-28, 2003.***

Key words : Epididymal sperm, Protoplasmic droplets, Zell ram, Staining.

corresponding author email:ptajik@ut.ac.ir

تلقیح مصنوع به صورت قابل توجهی مورد نظر پرورش دهندگان گوسفند قرار گرفته است به طوری که در سال ۱۹۹۲ تعداد تلقیح در گوسفند با میزان ۵۰ میلیون پس از گاو در مقام دوم اهمیت قرار داشته است. جدول ۱ میزان تلقیح دامهای مختلف را در سال ۱۹۹۲ نشان می دهد. چنانچه مشاهده می شود تا آن سال تنها از اسپرم تازه جهت تلقیح مصنوع استفاده می شده است.

از سالها قبل تحقیقاتی در مورد منی قوچ انجام شده است به عنوان مثال در سال ۱۹۸۶ منی رقیق شده و سرد شده قوچ مورد آزمایش قرار گرفته است. در این سال Robertson و Watson نقل و انتقال کلسیم را به داخل اسپرم رقیق و سرد شده مورد ارزیابی قرار دادند (۱۸). در سال بعد Crozet و همکاران باروری موفقیت آمیز گوسفند را با رشد و نمو طبیعی جنین آن گزارش نمودند. این محققین موفق شدند اولین بره ایجاد شده با تکنیک بارور آزمایشگاه را با استفاده از منی تازه که مدت ۸ ساعت مراحل توانا شدن را در آزمایشگاه پشت سر گذاشته بود، به دنیا آورند (۶). در سال ۱۹۹۰روش تلقیح داخل رحم میش از راه سرویکس به نام روش Guelf به دنیا معرفی شد. ولی این روش تلقیح آسیبهایی به دستگاه تناسلی وارد می ساخت. پنج سال بعد تلقیح مصنوعی معرفی شده توسط Guelf با تغییرات توسط Campbell و همکاران مورد استفاده قرار گرفت و نتایج آزمایش بهبود کیفیت تلقیح (کاهش آسیب کمتر به دستگاه تناسلی) را نشان می داد (۴). در سال ۱۹۹۱ از منی منجمد قوچ برای باروری آزمایشگاه استفاده نمودند (۱۷). در سال ۱۹۹۳ تلاش دانشمندان برای ایجاد دورگه گوسفند- بز، بی نتیجه ماند. اینان بز ها را با استفاده از روش لاپاراسکیپ مورد تلقیح قرار دادند (۱۰). در همین سال عده ای با استفاده از پروژسترون داخل واژن توانستند میشها را در فصل غیر تولید مثل تلقیح نماید (۸). در سال ۱۹۹۴ عده ای از محققان میزان باروری میش را با تلقیح یکطرفی رحم به روش جراحی مورد آزمایش قرار دادند (۵). در سال ۱۹۹۴ میزان بقای اسپرم قوچ را پس از انجماد مورد ارزیابی قرار گرفته و اطلاعات آن در سال ۱۹۹۵ گزارش شد (۱۳). فرد دیگری نیز تلقیح گوسفندهای مرینوس را با روش تلقیح داخل سرویکس انجام داد. در این آزمایش که در فصل تولید مثل و غیر تولید مثل انجام شد، آبستن میشها در فصل تولید مثل به طور معناداری بالاتر از فصل غیر تولید مثل بود (۲۱). طی گزارشی که سال ۱۹۹۶ منتشر گشت، اسپرم منجمد شده و ذوب شده قوچ توانست در محیط آزمایشگاه تواناشدن (Capacitation) را نشان دهد و از این روی مورد توجه قرار گرفت (۱۶). در سال ۱۹۹۷ توانستند مراحل توانا شدن و قدرت باروری اسپرم تازه و منجمد

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) متخصص بیماریهای داخلی دامهای بزرگ، تهران - ایران.
۳) دکتر دامپزشک بخش خصوصی، تهران - ایران.
*) نویسنده مسئول ptajik@ut.ac.ir

قوچ را مورد ارزیابی قرار دهند (۹). هر چند حسین پژوه و همکاران با استفاده از تلقیح مصنوعی در گوسفند تحقیقاتی را انجام داده و اولین انتقال رویان موفقیت آمیز منجر به تولد بره زنده را گزارش نمودند (۱). با توجه به مسایل یاد شده در صورتی که به اسپرم اپیدیدیمی به عنوان یک منبع تأمین گامت نیز توجه می شود (همچنان که تحقیقات موجود به آن اذعان دارد به عنوان مثال مراجع ۲،۱۱،۱۲،۱۵) لازم است تا این نوع منبع تأمین گامت در دامهای کشور مورد ارزیابی قرار گیرد. تحقیق حاضر بر آن است تا میزان زنده و مرده و همچنین میزان حضور قطرات پروتوپلاسمی (به عنوان یکی از شاخصهای بلوغ اسپرم) را در اسپرم اخذ شده از قسمتهای مختلف اپیدیدیم در فصلهای پاییز و زمستان مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش کار

محل انجام پژوهش: در پاییز و زمستان ۱۳۸۱ با مراجعه به کشتارگاه شهر ساری، پس از کشتار قوچهای بالغ بیضه های آنان شماره گذاری شده و پس از مشخص نمودن راست یا چپ بودن آن و ثبت تاریخ دقیق نمونه گیری در هر روزی که به کشتارگاه رجوع می شد نمونه ها به آزمایشگاهی در فاصله کوتاهی از محل کشتارگاه بود انتقال می یافتند.

روش کار

در آزمایشگاه ابتدا بیضه های چپ و راست را جدا نموده با دستمال کاغذی اپیدیدیم را پاک کرده و با یک تیغ بیستوری از ۳ قسمت سر بدنه دم اسپرم را تهیه می گردید، به طوری که ابتدا از یک اپیدیدیم (مثلاً سر) یک قطره اسپرم گرفته و روی لام قرار داده بلافاصله یک قطره رنگ ائوزین نیگروزین روی آن ریخته و با یک همزن چوبی مخلوط می شد. در این موقع گسترش تهیه کرده و به سرعت با هوای گرم خشک نموده و روی هر لام مشخصات شماره بیضه چپ و راست بودن و قسمت نمونه گیری شده یاداشت می گشت تهیه لام از سایر قسمتهای اپیدیدیم نیز به همین ترتیب انجام می شد. بعد از تهیه لام در آزمایشگاه با میکروسکوپ با درشت نمایی (۱۰۰) مورفولوژی سلولهای اسپرم به تعداد ۲۰۰ اسپرم برای هر لام مورد مطالعه قرار می گرفت.

تهیه رنگ: برای تهیه رنگ ۵ گرم نیگروزین را با ۰/۸۴ گرم ائوزین و ۱/۴۵ گرم سدیم سیترات (هر دو ساخت شرکت مرک آلمان) و ۵۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط می شد.

این تحقیق از ۵۰ رأس گوسفند نر نژاد زل گرفته شده (مجموعاً ۱۰۰ بیضه) از هر بیضه ۳ لام از قسمتهای مختلف اپیدیدیم (سر بدنه و دم) تهیه شد که در مجموع ۳۰۰ عدد لام مورد مطالعه قرار گرفت.

همان طوری که در جدول ۱ مشخص است ابتدا زنده بودن و مرده بودن اسپرم مشخص کرد اصول رنگ آمیزی حیاتی براساس نفوذپذیری منشأ اسپرم به رنگ و حضور رنگ در داخل اسپرمهای مرده و عدم نفوذ رنگ به سلولهای زنده رنگ مذکور می باشد.

ضمن اینکه هر اسپرم از لحاظ زنده و مرده بودن بررسی می شود از لحاظ ریخت شناسی، طبیعی بودن و ناهنجار بودن سر و قطعه میانی و دم نیز مورد بررسی قرار گرفت. ناهنجاریهای سر (در صورت وجود) به صورت سر غول پیکر سر کوچک سر تیز و سر پهن ثبت می شد در مورد قطعه میانی ابتدا آن را از لحاظ دارا بودن و نبودن قطره پروتوپلاسمی و بعد از نظر موقعیت قطره پروتوپلاسمی یعنی نزدیک به سر میانی و یا دور بودن آن

جدول ۱ - میزان استفاده از تلقیح مصنوعی در دامهای مختلف درسال ۱۹۹۲ (مرجع ۷).

گونه	تعداد کل دامهای ماده تلقیح شده	استفاده از منی منجمد
گاو	۹۰۰۰۰۰۰۰	>٪۹۰
گوسفند	۵۰۰۰۰۰۰۰	به طور تجربی*
بز	>۱۵۰۰۰	به طور تجربی
خوک	۶۰۰۰۰۰۰	٪۵
اسب	حدود ۱۰۰۰	به طور تجربی

*) به طور تجربی به این معناست که تعداد محدودی انجام شده و هنوز روشی معمول نگردیده است.

مورد بررسی قرار می گرفت. اطلاعات به دست آمده به وسیله آزمون مربع کای مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج به صورت منحنی + انحراف استاندارد ارایه گردید.

نتایج

از کل اسپرمهای شمارش شده ۷۱ درصد زنده، ۲۹ درصد مرده تشخیص داده شدند. اسپرمهای شمارش شده از بیضه راست۷۲ درصد و شمارش شده از بیضه چپ ۶۹ درصد زنده بودند و اختلاف معناداری نداشتند. اسپرمهای شمارش شده از قسمت سر اپیدیدیم ۸۹ درصد و از قسمت بدنه ۵۸ درصد و از قسمت دم اپیدیدیم۷۲ درصد زنده بوده اند.

از کل اسپرمهای شمارش شده ۴۸ درصد دارای قطره پروتوپلاسمی بودند. تعداد کل اسپرمهای شمارش شده از بیضه راست ۵۷ درصد دارای قطره پروتوپلاسمی بودند و از بیضه های چپ ۴۰ درصد دارای قطره پروتوپلاسمی بودند.

از تعداد اسپرمهای شمارش شده از سر اپیدیدیم ۳۹درصد از بدنه، ۳۹ درصد از دم،۶۱ درصد دارای قطره پروتوپلاسمی بودند. نمودار ۲ و ۳ میزان قطره های پروتوپلاسمی را به تفکیک قسمتهای مختلف اپیدیدیم و اسپرمهای زنده (نمودار ۲) و اسپرمهای مرده (نمودار ۳) نشان می دهند در این نمودارها قطره های نزدیک (به سر اسپرم) و دور (که نشانه از روند بلوغ اسپرم می باشد) نیز به تفکیک آورده شده است.

بحث

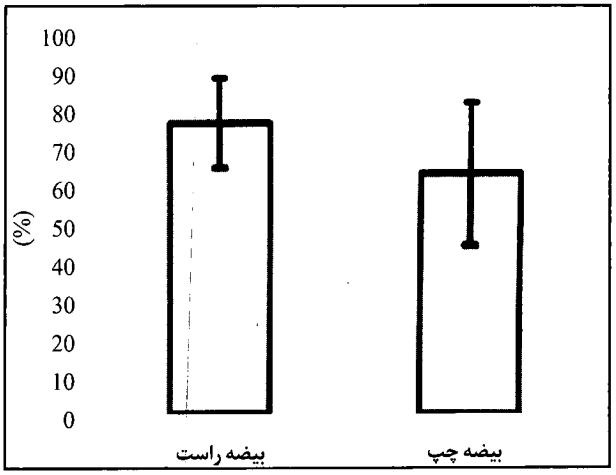
یکی از روشهای جمع آوری اسپرم از دام نر استفاده از اسپرم اپیدیدیمی است که اخیراً مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. این امر نه تنها در مورد قوچ بلکه در مورد حیوانات دیگر نیز انجام شده است. انجام تحقیقات بر روی قوچ و حیوانات دیگر عبارت اند از:

در سال ۱۹۹۱ میلادی توانایی اسپرم اپیدیدیمی قوچ را جهت انجام واکنش آکروزومی (Acrosome reaction) و نفوذ به تخمک گوسفند مورد ارزیابی قرار دادند (۲۰).

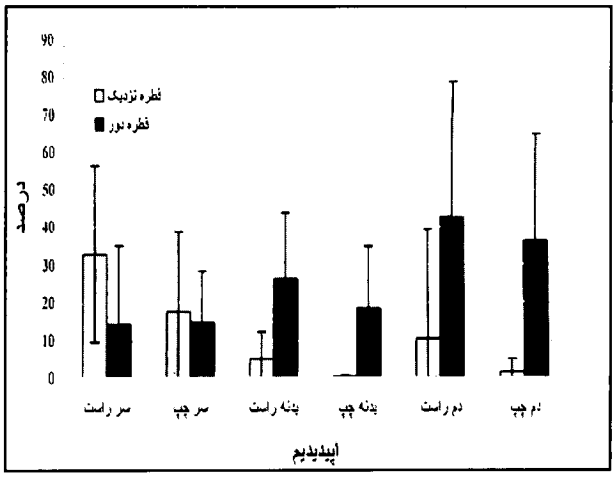
در سال ۱۹۹۴ محققان احتمال سرد و منجمد کردن اسپرم انزال و اپیدیدیم نریان را مورد ارزیابی قرار دادند (۳).

در سال ۱۹۹۷ توانستند عوامل مؤثر بر انجماد اسپرم اپیدیدیمی انسان را جهت استفاده های کلینیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار دهند (۱۹).

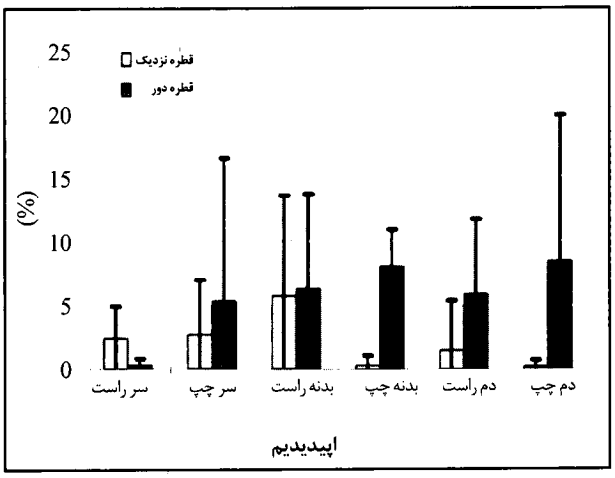
در سال ۲۰۰۰ میلادی اسپرم اپیدیدیمی بز را از ۲۰ رأس بز کشته شده اخذ نموده و پس از ارزیابیهای لازم آنها را منجمد نموده اند. از این اسپرمها هم به جهت تلقیح مصنوعی و هم باروری آزمایشگاهی (IVF) استفاده نموده اند (۲). در همین سال وضعیت تواناشدن اسپرم اپیدیدیم نریان را پس از انجماد مورد ارزیابی قرار دادند (۱۴).



نمودار ۱ - درصد اسپرمهای زنده در بیضه راست و چپ.



نمودار ۲ - قطره های پروتوپلاسمی در اسپرمهای زنده در قسمتهای مختلف اپیدیدیم.



نمودار ۳ - قطره های پروتوپلاسمیدر اسپرمهای مرده در قسمتهای مختلف اپیدیدیم.

تصویر ۱ - اسپرم مرده بدون قطره پروتوپلاسمی (۱) واسپرم زنده با قطره پروتوپلاسمی دور (۲).

تصویر ۲ - اسپرم زنده با قطره پروتوپلاسمی نزدیک (۱) و اسپرم مرده آکروزوم رنگ گرفته (۲).

تصویر ۳ - اسپرم زنده با قطره پروتوپلاسمی نزدیک (۱) و اسپرم مرده آکروزوم رنگ گرفته (۲).

و بالاخره Patrizo در همین سال توانست با موفقیت اسپرم اپیدیدیمی انسان را جهت انجماد و نگهداری مورد استفاده قرار دهد. این محقق میزان ۴۰ درصد آبستنی (تولد نوزاد زنده) با استفاده از تلقیح توسط اسپرم اپیدیدیمی منجمد گزارش نمود. این محقق همچنین گزارش داد که تفاوت معناداری بین انتقال رویان های منجمد شده منتج از تلقیح با اسپرم تازه و یا منجمد وجود ندارد (۱۵). تلاش حاضر بررسی مقدماتی است در مورد اسپرم قوچ زل که برای اولین بار در ایران انجام شده است. در این بررسی درصد قابل ملاحظه ای از اسپرمها زنده بودند، میزان وجود قطره پروتوپلاسمی

نیز در آنها زیاد بود. وجود قطرات پروتوپلاسمی در اسپرمهای اخذ شده از اپیدیدیم قابل انتظار می باشد و چنین باور می شود که این قطرات با مرور زمان و بلوغ اسپرماتوزوئید محو می شوند (حرکت کرده و از سر به طرف دم و در نهایت جدا می گردند). اینکه آیا اسپرمهای موجود در دم اپیدیدیم بلافاصله قبل از انزال بدون قطره می شوند و یا با وجود قطره پروتوپلاسمی خارج شده در نهایت اینکه آیا اسپرمهای دارای قطره پروتوپلاسمی توانایی بارور را دارند یا خیر سؤالی است که در آینده به آن باید پاسخ گفت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مؤلفین از زحمات و حسن نیت اعضای محترم شورای پژوهشی گروه، دانشکده دامپزشکی و دانشگاه تهران و همچنین قطب علمی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در راستای تأیید و تصویب و حمایت مالی تشکر و قدردانی می نماید.

References

۱. حسینی پژوه، خ. تاجیک، پ. و قراگزلو، ف. (۱۳۷۹): تلقیح مصنوعی داخل رحمی به روش لاپاروسکوپی و تلقیح سرویکال در میشهای سوپراوووله شده در برنامه انتقال جنین، نامه دانشکده دامپزشکی، دوره ۵۵، شماره ۴، صفحه: ۶۶-۶۱.

2. Blash, S., Melican, D. and Gavin, V. (2000): Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. Theriogenology, 54:899-905
3. Braun, J., Sakai, M., Hochi, S. and Oguri, N. (1994): Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. Theriogenology, 41, 4: 809-818.
4. Campbell, J.W., Harvey, T.G., McDonald, M.F. and Sparksmsn, R.I. (1995): Transcervical insemination in sheep: An anatomical and histological evaluation. Theriogenology, 46: 1535-1544.
5. Correa, J.E., Bergmann, B. and Gatica, R. (1994): Fertilization rate in sheep unilaterally inseminated with frozen semen. Small Rum. Res. 13: 99-101.
6. Crozet, N., Huneau, D., Desmedt, V., Theron, M-C., S D., Torres, S. and Sevellec, C. (1987): In vitro fertilization with normal devlopment in the sheep. Gamete Research, 16: 159-170.
7. Dawson, G.R., Webb, G.W., Pruitt, J.A., Loughin, T.M. and Arns, M.J. (2000): Effect of different processing techniques on motility and acrosomal integrity of cold-stored stallion spermatozoa. Journal of Equine Vet. Sci. 20: 191-194.
8. Fukui, Y., Fujii, M. and Tashiro, Y. (1993): Insemination doses of frozen-thawed semen in seasonally anestrous ewes treated with two different progestrone-impregnated intravaginal devices. J. Reprod. Develop. 39: 269-273.
9. Gillan, L., Evans, G. and Maxwell, W.M.C. (1997): Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. Reprod. Ferti. Develop. 9: 481-487.
10. Gustafson, R.A., Anderson, G.B., BonDurant, R.H. and Sasser, G.R. (1993): Failure of sheep-goat hybrid conceptuses to develop to term in sheep-goat chimaeras. J. Reprod. Fertil. 99: 267-273.
11. Janzen, N., Goldstein, M., Schlegel, P.N., Palermo, G.D. and Rosenwaks, Z. (2000): Use of electively cryopreserved microsurgically aspirated epididymal sperm with IVF and intracytoplasmic sperm injection for obstructive azoospermia. Fertil. Steril, 74: 696-701.
12. Kikuchi, J., Nagai, T., Kashiwasaki, N., Ikeda, H., Noguchi, J., Shimada, A., Soloy, N. and Kaneko, H. (1998): Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 C. Theriogenology 50: 615-623.
13. Maxwell, W.M.C., Landers, A.J. and Evans, G. (1995): Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pelletes, straws and minitubes. Theriogenology, 43: 1201-1210.
14. Morris, L.H.A., Stout, T.E., Li, X. and Alien, W.R. (2000): The capacitation status of fresh and frozen-thawed epididymal and ejaculated stallion spermatozoa. Theriogenology, 53:488.
15. Patrizio, P. (2000): Cryopreservation of epididymal sperm. Mol. Cell. Endocrrnol. 169: 11-14.
16. Perz, L.J., Valcarcel, A., de las Heras, M.A, Moses, D. and Baldassarre, H. (1996): Evidence that frozen-thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chorotetracycline assay. Theriogenology, 46: 131-140.
17. Pugh, P.A., Fukui, Y., Tervit, H.R. and Thompson, J.G. (1991): Developmental ability of in vitro matured sheep oocytes collected during the nonbreeding season and fertilized in vitro with frozen ram semen. Theriogenology, 36: 771-778.
18. Robertson, L. and Watson, P.F. (1986): Calcium transport in diluted or cooled ram semen. J. Reprod. Fertil. 77: 177-185.
19. Sharma, R.K., Padron, O.F., Thomas, A.J. and Agarwal, A. (1997): Factors associated with the quality before freezing and after thawingof sperm obtained by microsurgical epididymal aspiration. Fertil. Steril. 64: 628-631.
20. Williams, R.M., Graham, J.K. and Hamersted, R.H. (1991): Determination of capacity of ram epididymal and ejaculated sperm to undergo the acrosome reaction and penetrate ova. Biol. Reprod. 44: 1080-1091.
21. Windsor, D.P. (1995): Factor influencing the success of transcervical insemination in merino ewes. Theriogenology, 43: 1009-1018.