View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by CORE

provided by University of Kufa: UOK Journal Hosting Service

Effect of Glutathione Adding to Freezing Media on Sperm Parameters and on Malondialdehyde Concentration and Abnormal Sperm Chromatin Percent of Oligozoospermic Patients

تأثير اضافة الكلوتاثايون الى وسط التجميد في معايير النطف وتركيز المالون ثنائي الديهايد و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى قلة النطف

Hisham Qassim Mohammad Al-Nowainy / MSc. In physiology / College of Nursing / University of Kufa

Dr. Sahib Yahia Almoreshedy / Assist .Prof in Reproductive physiology / College of Medicine / University of Kufa

Dr. Wafak Gabory Mohammad / Assist .Prof in physiology / College of Medicine Practical Science / University of Karbala

hushamq.mohammed@uokufa.edu.iq

Abstract:

Objective: The study aimed to study the effect antioxidant Glutathione adding to sperm Freezing Media (Sperm Freeze) on Sperm Parameters and Malondialdehyde concentration and abnormal sperm chromatin percent of Oligozoospermic patients

Methodology: This study was performed in the laboratory of Intra cytoplasmic Injection and freezing of sperm in the fertility center of Al-Sader Medical City / Al-najaf Alashraf City during the period from May, 2012 to April 2013 , The study included 30 of Oligozoospermic patients, the statistical analysis of this study performed by using Student's t – test and paired t – test at the level of probability 0.05

Results: The study results shows that used of sperm Freezing Media (Sperm Freeze) with adding of 1 mm from antioxidant Glutathione leads to a significant difference ($p<0.05$) in sperm parameters of study included patients , there was a significant increase ($p<0.05$) in the sperm progressive motility percent and sperm viability percent ,and there was a significant decrease ($p<0.05$) In The Malondialdehyde concentration and abnormal sperm chromatin percent and no significant difference ($p<0.05$) In the sperm concentration, normal sperm morphology percent and round cell concentration In comparison with their Means when used of sperm freezing media (Sperm Freeze) alone .

Conclusion: It can be concluded from this study that sperm rapid freezing and thawing processes had a negative effect on the semen and sperm parameters and Malondialdehyde concentration and abnormal sperm chromatin percent in all samples of study included patients and adding of 1 mm from antioxidant Glutathione shows resistance to this negative effect leads to a significant increase ($p<0.05$) In the studying parameters .

Recommendation: using of antioxidant Glutathione with sperm Freezing Media (Sperm Freeze) in sperm cryopreservation processes

Keyword : Effect , Glutathione , Freezing Media , Sperm Parameters , Malondialdehyde , chromatin , Oligozoospermic

الخلاصة :

الهدف : تهدف الدراسة الى دراسة اضافة مضاد اكسدة الكلوتاثايون الى وسط التجميد (Sperm Freeze) في معايير النطف وتركيز ألمالون ثنائي ألالديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى قلة النطف

المنهجية: أُنجزت هذه الدراسة في مختبر الحقن ألمجهري وتجميد النطف في مركز الخصوبة في مدينة الصدر الطبية / محافظة النجف ألاشرف ، وامتدت الدراسة من المدة أيار 2012 إلى نيسان2013 وشملت الدراسة 30 من مرضى قلة النطف. وكان معدل العمر (1.23 ±33.1) سنة و أنجزت التحليلات الإحصائية الخاصة بهذه الدراسة باستخدام اختبار – ت (Student's t – test) و اختبار – ت (paired t – test) على مستوى الاحتمالية 0.05

النتائج:. أوضحت نتائج الدراسة إن استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية 1 ملي مول من مضاد الأكسدة الكلوتاثايون أدى إلى حدوث فروق معنوية (P<0.05) في المعايير المدروسة لنطف المرضى المشمولين في الدراسة حيث أدى إلى زيادة معنوية (P<0.05) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث انخفاض معنوي (P<0.05) في معدلات كل من تركيز المالون ثنائي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي و عدم وجود فروق معنوية (P<0.05) في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده.

الاستنتاجات : **يستنتج من هذه الدراسة بأن عمليات التجميد السريع والإذابة** للنطف تمتلك تأثيرات سلبية **معايير النطف وتركيز ألمالون ثنائي ألالديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي** في كل عينات المرضى المشمولين بالدراسة ،وان إضافة 1 ملي مول من مضاد الأكسدة الكلوتاثايون إلى وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) اظهر مقاومة لهذه التأثيرات السلبية انعكست بحدوث تحسن معنوي في المعايير المدروسة .

التوصيات : استخدام مضاد الأكسدة الكلوتاثايون مع وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) بتركيز 1 ملي مول عند إجراء عملية تجميد عينات مني مرضى قلة النطف

الكلمات المفتاحية : تأثير ، الكلوتاثايون ، وسط التجميد ، معايير النطف ، المالون داي الديهايد ، كروماتين ، قليلي الخصوبة

المقدمة :

إن عدم الخصوبة infertility حالة مرضية تؤثر في حوالي 15% من مجموع الأزواج الذين يرغبون بالحصول على أطفال،وهي مشكلة طبية واسعة الانتشار ولها تأثيرات نفسية كبيرة، تشكل عوامل عدم الخصوبة الذكرية ما نسبته حوالي 50% من هذه الحالة ويكون حوالي 25% منها أسبابها غير مشخصة Idiopathic (Jungwirth et al,2012) ، وهناك عدة أسباب يمكن إن تؤدي الى حالة عدم الخصوبة، وتكون 30-40% من الحالات بسبب الزوجة و30% بسبب الزوج بينما يساهم الزوجان معاً بنسبة 15-30% من الحالات (Isidori et al., 2005) . واحد أنواع مرضى عدم الخصوبة هم قلة النطف ،ويطلق مصطلح قلة النطف للدلالة على النقص في العدد السوي للخلايا النطفية ، وعندما يهبط عدد النطف في كل مليلتر واحد من السائل المنوي إلى اقل من حوالي 20 مليون نطفة ، يحتمل أن يصبح الشخص عديم الخصوبة ، حيث عُدَّ العدد الأخير حداً للعتبة Threshold limit في مجال خصوبة الذكور. والمريض بقلة المحتمل إنه يحتوي منيه بشكل عام على أقل من 20 مليون نطفة في المليلتر الواحد (WHO, 1999) . وخلال العقود الأخيرة الماضية شهدت علاجات حالات عدم الخصوبة تطورا" ملحوظا نتيجة التقدم المستمر في تقنيات التكاثر المعان Assisted reproduction techniques(ART)وتقنيات التعامل والتداخل الخلوي cell manipulation فأصبح المرضى الذين لم تنجح معهم التداخلات الطبية مثل مرضى انعدام النطف azoospermic أو وهن النطف Asthenozoospermic يمتلكون الفرصة لان يحصلوا على الأطفال إذا أمكن الحصول على نطفة مفردة فقط لغرض استخدامها في التلقيحات داخل المختبر(Sinan et al,2008).. تشمل تقنيات التكاثر المعان عدداً من الطرق المختلفة للتلقيح خارج الجسم الحي In vitro fertilization (IVF) والتي تتطلب وجود كل من المشيج الذكري (النطفة) والمشيج الأنثوي (البيضة)خارج الجسم الحي لإحداث الإخصاب Fertilization في المختبر ، ونتيجة كون هذه الأمشاج ذات أعمار قصيرة وسريعة التضرر خارج الجسم ، استدعى ذلك توفير طرق لمحاولة الحفاظ على حياة هذه الأمشاج إلى الوقت الذي يتطلب فيه إجراء عملية التلقيح (Richard et al ,2006) وأفضل وسيلة لتحقيق هذا الهدف يكون بحفظ هذه الأمشاج باستخدام عملية التجميد (cryopreservation) والتي يتم فيها حفظ المواد البيولوجية بدرجة حرارة اقل من الصفر مثل 80 - أو 196 - م 0 والتي عندها التفاعلات الخلوية الكيموحيوية المسؤولة عن موت الخلايا يحد منها بصورة فعالة،و تهدف عملية التجميد أساسا"إلى محاولة الحفاظ على عيوشية الخلايا والنشاط الوظيفي بعد مدة من الحفظ بدرجة حرارة تقل عن الصفر المئوي ،حيث إن الخلايا المحفوظة بدرجة حرارة مساوية إلى 196 – درجة مئوية تحت الصفر يحدث فيها عند هذه النقطة توقف في ظاهرة النفوذ الخلوي (Cellular Diffusion) ، وكذلك خفض الطاقة الحرارية اللازمة لإتمام التفاعلات الكيمائية (Dohle et al. , 2007) .

إن عملية التجميد تؤدي إلى حدوث انخفاض معنوي في مستويات كل من مضادات الأكسدة Antioxidants الإنزيمية وغير الإنزيمية بعد إجراء عمليات التجميد والإذابة وحدوث زيادة في مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة ROS)Reactive Oxygen Species)في الوسط (Kumar et al ,2011) .و يؤدي زيادة مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة ROS على حساب مضادات الأكسدة إلى حدو ث حالة الجهد التاكسدي oxidative stress وهي حالة تكون لها تأثيرات سلبية كبيرة وكل المكونات الخلوية للنطف مثل الدهون Lipids والبروتينات proteins والأحماض النووية Nucleic acid والسكريات sugars تكون أهداف محتملة لتأثيرات الإجهاد التاكسدي السامة (Sanocka, and kurpisz ,2004).

إن الزيادة العالية في مستويات إلROS الأنواع الاوكسجينية الفعالة وانخفاض مضادات الأكسدة يؤدي كذلك إلى زيادة معدلات الموت الخلوي المبرمج في مجتمع الخلايا النطفية الموجود في العينة (Wang et al, 2003) .

يمكن تعريف مضادات الاكسدة بانها أي مادة عند وجودها بتراكيز قليلة مقارنة مع المواد الاساسية المؤكسدة (Oxidizable substrate) تعمل على ازالة او تثبيط عملية الاكسدة للمادة الاساس (Andrabi et al ,2009) . إن مصطلح مواد الاساس المؤكسدة (Oxidizable substrate) يشمل على الاغلب جميع محتويات الخلية الحية مثل البروتين Protein ، الدهون Lipid والكاربوهيدرات Carbohydrate والاحماض النووية Nucleic acid (Maxwell and Lip, 1997) .

يعد الكلوتاثايون من مضادات الاكسدة الذائبة في الماء والتي تخلق داخل الجسم ويوجد في مختلف الكائنات الحية مثل : الإنسان والحيوان والنبات والأحياء المجهرية ويعد من اوفر مركبات الثايول غير البروتينية الخلوية (هي تلك المركبات التي تحتوي في تركيبها الكيميائي على عنصر الكبريت) .وهو ببتيد مؤلف من ارتباط ثلاثة احماض امينية (كاما كلوتامايت ، سستين كلايسين) L-Y-glutamyl-L-Cysteinyl glycine)(Gadea et al ,2004). إن وجود مجموعة الثايول الحرة في الكلوتاثايون توفر حماية رئيسة ضد حالات الاكسدة الشديدة ، اذ تعمل على ازالة الجذور الحرة وتتأكسد مجموعة SH مكونة مركب ثنائي الاصرة الكبريتية GSSG ولذلك يمتلك الكلوتاثايون شكلين الشكل المختزل GSH والشكل المؤكسد GSSG (Halliwell and Cutteridge, 1993).

المواد وطرائق العمل : جمعت عينات السائل المنوي في وعاء Container نظيفًا وجافاً ومعقماً سعته (4o) ملي لتراً وكتب اسم المريض على الوعاء ، جمع المني بطريقة الاستمناء Masturbation بعد مدة امتناع (3-5) أيام Abstinence Periodثم وضعت العينات في حاضنة بدرجة حرارة 37 مْ للسماح لها بالاماعة الطبيعية Normal Liquefaction ، بعد اكتمال الاماعة التي تم تثبيت زمنها فحصت كل عينة فحصاً عيانياً و مجهرياً وسجلت معلومات ونتائج اختبارات المني والتي تشمل تركيز النطف Sperm Concentration و النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية Sperm progressive Motilityو النسبة المئوية للنطف السوية Normal sperm morphology percent و النسبة المئوية لعيوشية النطف Sperm viability percent و تركيز الخلايا الدائرية Round Cell Concentrationاستنادا" إلى تقرير منظمة الصحة العالمية (WHO, 1999, 2010). وتم حساب تركيز المالون داي الديهايد MDA في البلازما المنوية للسائل المنوي حسب الطريقة الموصوفة في (Muslih *et al*., 2002) وتم تقييم الضرر الحاصل في كروماتين النطف باستخدام صبغة الانلين الأزرق Aniline blue stain حسب الخطوات التالية: (Vieytes *et.al.*,2008; Sasikumar and Dakshayani,2013) حيث تم تحضير صبغة الانلين الأزرق Aniline blue stain بإذابة 5 غرام من الصبغة في 100مل من محلول الفوسفات الدارئ PBS ثم وضعت في حمام مائي مغلي لفترة قصيرة ثم تم ترشيح الصبغة ثم أضيف إليها قطرات من حامض ألخليك الثلجي لغرض الوصول إلى الأس الهيدروجيني 3.5 وتضمنت طريقة تصبيغ كروماتين النطفة الخطوات الآتية : وضعت كمية من محلول الكلوترالديهايد 3% المحضر في جار خاص ووضعت كمية من الصبغة الانيلين الأزرق المحضرة في جار آخر ، تم عمل مسحة من السائل المنوي على شريحة زجاجية وتركت في درجة حرارة الغرفة لحين الجفاف ، وضعت الشريحة الزجاجية الحاملة للمسحة في محلول الكلوترالديهايد 3% لمدة نصف ساعة لغرض التثبيت ،تم غسل الشريحة الحاملة للمسحة باستخدام محلول الفوسفات الدارئ PBS ،وضعت الشريحة الحاملة للمسحة في صبغة الانلين الأزرق لمدة 7 دقائق ونقلت الشريحة من صبغة الانلين وغسلت بالماء المقطر ثم تركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة . لوحظ في فحص الشريحة المحضر أن النطف المتضررة حدث اصطباغ في رأس النطفة باللون الأزرق والنطف غير المتضررة تكون عديمة اوقليلة الصبغة وتم حساب على الأقل 200 نطفة في كل شريحة وحددت النسبة المئوية لكروماتين النطف المتضررة Chromatin abnormality والكروماتين السوي وحسب المعادلة

$$\text{نسبة الضرر} = \frac{\text{عدد النطف ذات الكروماتين المتضرر}}{\text{عدد النطف الكلي}} \times 100$$

تم إجراء عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية الطبقية البسيطة وباستخدام الوسط ألزرعي IVF Medium وحسب الطريقة الموصوفة من قبل السلطاني (1997) ، وتم إجراء عمليات التجميد السريع والإذابة للنطف وفق الخطوات الآتية : عمليات التجميد السريع Sperm Vitrification Processes: - تم وضع 250 مايكرو لتر من العينة المنشطة والمحضرة في أنبوب التجميد الخاص Cryovials الذي حجمه 1.8 مل ,. تم إضافة 50 مايكروليتر من مضاد الأكسدة إلى وسط التجميد في حالة العينات المراد دراسة تأثير مضاد الأكسدة فيها .تم إضافة وسط تجميد النطف Sperm Freeze الذي يحوي مضاد الاكسدة بصورة تدريجية وبنسبة 1:o.7 من حجم العينة ،ويتم المزج بصورة جيدة . عُرض المزيج في أنبوب التجميد الخاص Cryovials إلى بخار سائل النتروجين على ارتفاع 20 سم عن مستوى سائل النتروجين لمدة 10 دقائق، يُغمر المزيج في أنبوب التجميد الخاص Cryovials في الحوض الذي يحوي سائل النتروجين (Mohammad *et al* , 2012)

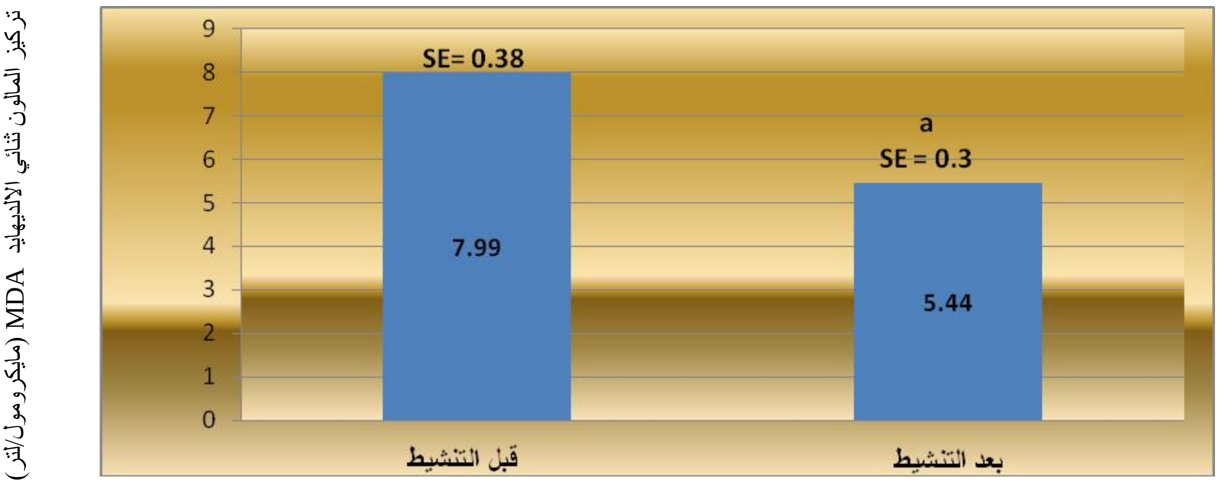
عمليات الإذابة للنطف Sperm Thawing Processes: - تم رفع أنبوب التجميد الخاص Cryovials من سائل النتروجين .وضعت في حمام مائي بدرجة حرارة 37 م^0 لمدة 5 دقائق ثم نقل المزيج إلى أنبوبة اختبار جديدة ، وعُرض المزيج إلى طرد مركزي بسرعة 2000 دورة/دقيقة . ثم أزيل الراشح واخذ جزء منة لغرض حساب تركيز المالون داي ألديهايد MDA ثم أضيف 250 مايكروليتر من IVF Medium إلى الراسب وتم مزجة ، ومن ثم نُقل إلى الحاضنة مع تركيز 6 % CO_2 بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 30 دقيقة (Mohammad *et al* ,2012) ،ومن ثم تم دراسة معايير النطف والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي

النتائج : يبين الجدول (1) وجود فروق معنوية (P<0.05) في معالم النطف بعد إجراء عملية تنشيط النطف مقارنة بقبل التنشيط لعينات مرضى قلة النطف ،حيث أظهرت نتائج الدراسة أن عملية تنشيط النطف أدت إلى انخفاض معنوي (P<0.05) في معدلات تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وتركيز المالون ثنائي ألديهايد MDA مقارنة مع معدلاتها قبل التنشيط ، بينما لوحظ وجود زيادة معنوية (P<0.05) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية مقارنة مع معدلاتها قبل التنشيط .

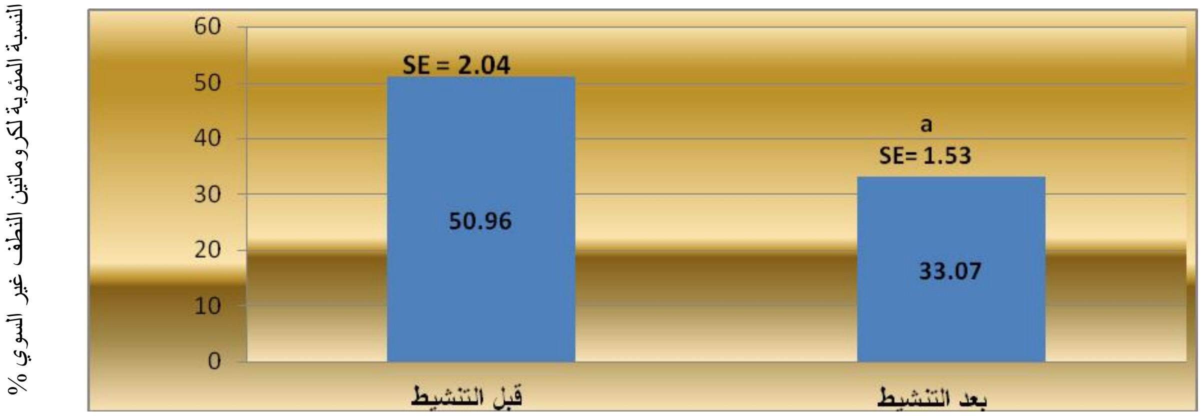
جدول (1)معالم النطف ومستوى المالون ثنائي الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي قبل التنشيط مقارنة ببعد التنشيط لمرضى قلة النطف Oligozoospermic patients باستخدام تقنية الطباقية البسيطة

تنشيط النطف / معالم النطف	تنشيط النطف باستخدام الوسط (IVF) ومدة حضن 30 دقيقة	
	قبل التنشيط	بعد التنشيط
تركيز النطف (مليون / مل)	14.90 ± 0.37	[a] 4.49 ± 0.20
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (%)	52.93 ± 1.61	[a] 68.75 ± 1.17
النسبة المئوية للنطف السوية (%)	33.86 ± 1.12	[a] 52.83 ± 1.09
النسبة المئويةلعيوشية النطف (%)	58.26 ± 1.24	[a] 74.85 ± 1.07
تركيز الخلايا الدائرية (مليون / مل)	4.22 ± 0.18	[a] 2.67 ± 0.15
تركيز المالون ثنائي الديهايد MDA (مايكرو مول/لتر)	7.99 ± 0.38	[a] 5.44 ± 0.30
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي (%)	50.96 ± 2.04	[a] 33.07 ± 1.53

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE ، عدد المرضى = 30 ، الحرف a يدل على وجود الفروق المعنوية (P<0.05)



شكل (1) تركيز المالون ثنائي الالديهايد MDA (مايكرومول/لتر) لمرضى قلة النطف بعد إجراء عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية الطبقية البسيطة عدد المرضى = 30. الحرف a يدل على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) .



شكل (2) النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى قلة النطف بعد إجراء عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية الطبقية البسيطة عدد المرضى = 30. الحرف a يدل على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) .

وأظهرت نتائج الدراسة الجدول (2) أن عملية التجميد السريع للنطف باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) ، وإجراء عملية الإذابة بعد مرور شهر واحد أدت إلى انخفاض معنوي (P<0.05) في كل من تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط ، ولوحظ حدوث زيادة معنوية (P<0.05) في معدلات كل من تركيز المالون ثنائي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي مقارنة مع معدلاتها ببعد التنشيط وكما مبين في الجدول .إما تركيز الخلايا الدائرية لم تظهر فرقا" معنويا" (P<0.05) مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط .

جدول (2) تأثير التجميد السريع والإذابة لمدة شهر في معالم النطف وتركيز المالون ثنائي الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى قلة النطف Oligozoospermic patients

تنشيط النطف / المعالم المدروسة	تنشيط النطف باستخدام الوسط (IVF) ومدة حضن 30 دقيقة بعد التنشيط	تجميد النطف باستخدام وسط تجميد النطف(Sperm Freeze) بعد التجميد والإذابة
تركيز النطف (مليون / مل)	8.93 ± 0.64	[a] 7.80 ± 0.61
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (%)	61.06 ± 1.100	[a] 29.14 ± 1.23
النسبة المئوية للنطف السوية(%)	50.25 ± 0.93	[a] 39.87 ± 1.21
النسبة المئويةلعيوشية النطف(%)	75.33 ± 1.123	[a] 29.50 ± 0.91
تركيز الخلايا الدائرية (مليون / مل)	2.71 ± 0.14	2.40 ± 0.09
تركيز المالون ثنائي الديهايد MDA (مايكرو مول/ لتر)	9.26 ± 0.44	[a] 14.26 ± 0.47
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي(%)	34.94 ± 1.48	[a] 67.38 ± 1.15

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE الحرف a يدل على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) عدد المرضى = 30

كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية الجدول (3)أن عملية التجميد السريع للنطف باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه 1 ملي مول من مضاد الأكسدة الكلوتاثايون أدى إلى زيادة معنوية (P<0.05) في كل من النسبة المئوية

للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون ثنائي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي و لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية وتركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

جدول (3) تأثير التجميد وإضافة (GSH) في معالم النطف وتركيز المالون ثنائي الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى قلة النطف Oligozoospermic patients

التجميد والاذابة / معالم النطف	بعد التجميد والإذابة	
	وسط التجميد بدون مضاد أكسدة	وسط التجميد+ GSH
تركيز النطف (مليون / مل)	4.05±0.369	4.40±0.40
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (%)	26.60±1.20	42.50±1.6 [a]
النسبة المئوية للنطف السوية(%)	42.60± 1.63	43.1± 1.55
النسبة المئويةلعيوشية النطف(%)	30.1 ± 1.66	43.30±1.99 [a]
تركيز الخلايا الدائرية (مليون / مل)	2.3±0.15	2.2±0.10
تركيز المالون ثنائي الديهايد MDA (مايكرو مول/ لتر)	12.13±0.6	9.38±0.43 [a]
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي(%)	61.1±1.48	47.7±1.58 [a]

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE الحرف a يدل على وجود الفروق المعنوية ($P<0.05$)

عدد المرضى = 30

المناقشة:

تبين من نتائج الدراسة إن لعمليات التجميد والإذابة تأثيرات سلبية في معايير النطف وتؤدي إلى حدوث زيادة معنوية ($p<0.05$) في تركيز المالون داي الديهايد و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي ، حيث أظهرت النتائج أن عملية التجميد السريع للنطف باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وإجراء عملية الإذابة بعد مرور شهر واحد في عينات مرضى قلة النطف أدت إلى حدوث انخفاض معنوي ($p<0.05$) في تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشية النطف والنسبة المئوية للنطف السوية مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط ، وجاءت نتائج الدراسة الحالية منسجمة مع دراسات سابقة توصلت إلى حدوث انخفاض معنوي في تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشية النطف والنسبة المئوية للنطف السوية والإذابة مقارنة بقبل التجميد (sinan *et al* ,2008 and Lee *et al*, 2012) وذكر Hammadeh وجماعته (2001) حدوث زيادة معنوية ($p<0.05$) في تركيز المالون داي الديهايد (أو مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة) بعد عملية التجميد للنطف وأشار Fraser و Strzezek (2004) إلى إن عمليات التجميد والإذابة تؤدي إلى حدوث زيادة معنوية ($p<0.05$) في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي أو الضرر في إلDNA ، قد يعود سبب ذلك إلى إن عملية التجميد للنطف تتضمن إجراء عدد من العمليات مثل عملية تخفيف الوسط المراد تجميده بإضافة مواد كيمياوية ذات أوزان جزئية واطئة تعرف بالمواد الحافظة للنطف من ضرر التجميد ، وكذلك عملية غمر المزيج في سائل النتروجين ذي درجة حرارة 196- م وعملية التدفئة والإذابة للعينات والتي تشمل بدورها عدد من العمليات من تدفئة بأسخدام الحمام المائي وإجراء عملية فصل الوسط التجميد بإجراء عملية الطرد المركزي وإضافة ميديا التنشيط وغيرها (Luvoni,

(2006 يعتقد أن كل خطوة من هذه العمليات تستحث حدوث تأثيرات سلبية قد تؤدي لتوليد الضرر في كل من التركيب والوظيفة للنطف (Woods *et al*,2004) .

كما أوضحت الدراسات إن عملية التجميد تؤدي إلى حدوث انخفاض معنوي في مستويات كل من مضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية حيث ذكرت دراسة Kumar وجماعته (2011) حدوث انخفاض معنوي في مستويات مضادات الأكسدة بعد إجراء عمليات التجميد والإذابة وحدوث زيادة في مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة ROS داخل الوسط . إن زيادة مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة وانخفاض مستويات مضادات الأكسدة قد يؤدي إلى زيادة معدلات الموت الخلوي المبرمج في مجتمع الخلايا النطفية (Wang *et al*, 2003)، و يؤدي زيادة مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة ROS على حساب مضادات الأكسدة لحدوث حالة الجهد التأكسدي oxidative stress ، والتي تكون كل المكونات الخلوية للنطف مثل الدهون والبروتينات والأحماض النووية والسكريات أهداف محتملة لتأثيرات الإجهاد التأكسدي السامة (Said *et al* ,2010) .

أظهرت نتائج الدراسة إن إضافة الكلوتاثايون إلى وسط التجميد Sperm freeze بتركيز 1mmأدى إلى تحسن معنوي في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشية النطف وانخفاض معنوي في كل من تركيز MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي مقارنة مع استخدام وسط التجميد لوحدة ، اذ ذكرت نتائج دراسة Gadea وجماعته

(2011) إلى إن إضافة الكلوتاثايون إلى وسط التجميد أدى إلى تحسن معنوي في كل من حركة النطف وعيوشيتها وانخفاض معنوي في مستويات الأنواع الفعالة للأوكسجين ، كما أظهرت دراسة (Gadea *et al* ,2005) إن إضافة الكلوتاثايون إلى وسط الإذابة أدى إلى تحسن معنوي في نوعية النطف المدروسة المتضمنة الحركة والعيوشية النطفية وكذلك سلامة الغشاء وخفض النسبة المئوية للضرر الكروماتيني وDNA . وسجل الباحث Gadea وجماعته (2005) إن إضافة 5 مايكرو مول من الكلوتاثايون إلى وسط التجميد أدى إلى زيادة معنوية في سلامةDNA لكنه لم يسجل تحسناً في زيادة الحركة النطفية أو خفض البيروكسيدة للدهون ، وقد يعزى ذلك لكون الكلوتاثايون احد مضادات الأكسدة غير الأنزيمية ذات التأثير الفعال في مكافحة الجذور الحرة القادرة على النفوذ إلى الخلايا ويكون منظم رئيسي لعملية الكسح لجزئيات أنواع الاوكسجينة الفعالة (Ansari *et al* ,2010) ، حيث يمتلك الكلوتاثايون دور رئيسي كمضاد أكسدة قادرة على التخلص من جزئيات أنواع الأوكسجين الفعالة ،وهو مركب أساسي حاوي على مجموعة الثايول له عدد من الأمور يؤديها في الخلايا للحيوانات الثديية ومنها نقل الأحماض الامينية ،تصنيع البروتينات والـ DNA والقيام بكسح الجهد ألتأكسدي حيث أظهرت مجموعة Sulphydrl أنها تشكل حماية ضد الضرر الخلوي المتولد من المؤكسدات والكهارل والجذور الحرة (Taylor *et al* ,2009)، إن مستوى هذا المركب ينخفض بشكل معنوي عند إجراء عملية التجميد حيث وثقت دراسة (Gadea *et al* ,2004) حدوث انخفاض بنسبة 64% من تركيزه مقارنة بتركيزه قبل إجراء العملية ورافق ذلك انخفاض في حركة النطف بحوالي 68% .

قد يفسر سبب تحسن الحركة إلى قدرة الكلوتاثايون على كسح بيرو كسيد الهيدروجين حيث يعمل الكلوتاثايون مع انزيم الكلوتاثايون بيرودكتيز على خفض مستوى حالة الاستقرار steady-state لبيرو كسيد الهيدروجين والبيروكسيدات الموجودة في الغشاء ألنطفي خلال عملية الإذابة الأمر المؤدي إلى تحسن كل من الحركة والعيوشية (Rossi *et al* ,2001) ، كما ذكرت دراسة إن مجموعة الثايول السطحية لها دور في الحفاظ على حركة النطف وان عملية التجميد تؤثر على خفض هذا التركيب مما يؤدي إلى التأثير على الحركة لذا فان إضافة GSH قد يؤدي إلى زيادة في النسبة المئوية للخلايا الحاوية على مجموعة الثايول مما قد يؤدي إلى زيادة الحركة.(Chatterjee *et al* ,2001) .

وأظهرت النتائج وجود زيادة معنوية في النسبة المئوية لعيوشية النطف ،وقد يفسر ذلك إلى قدرة الكلوتاثايون على اكتساح جزئيات الأنواع الفعالة للأوكسجين ومن ثم التقليل من شدة الضرر المتولد منها على الأغشية البلازمية (Gadea *et al* ,2011).

ولوحظ في النتائج حدوث انخفاض معنوي في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند استخدام الكلوتاثايون وقد يعود ذلك إلى كونة مضادات الأكسدة تقوم بدور مهم في حماية الكروماتين وال DNA ألنطفي إثناء عمليات التجميد والإذابة

(Bucak *et al* ,2010) وذلك من خلال قدرته على كسح جزئيات الأنواع الفعالة للأوكسجين ومن ثم التقليل من شدة الضرر المتولد منها على الأغشية البلازمية (Tuncer *et al* ,2010).

المصادر :

1) **السلطاني ، يحيى (1997)** : تنشيط النطف خارج الجسم لمرضى العقم والمصابين بقلة وابيضاض المني باستخدام المستنبتات الزراعية والهرمونات المحرضة للقند . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .

2) **Ansari, M. S., B. A. Rakha., N. Ullah., S. M. H. Andrabi., S. Iqbal., M. Khalid and S. Akhter.(2010).** Effect of exogenous glutathione in extender on the freezability of Nili-Ravi buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa. Anim. Sci. Pap. Rep., 28: 235-244.
3) **Bucak, M. N., P. B. Tuncer., S. Sarıözkan., N. Başpınar., M. Taşpınar., K. Coyan., A. Bilgili., P. P. Akalın., S. Büyükleblebici., S. Aydos., S. Ilgaz., A. Sunguroğlu and D. Oztuna.(2010).** Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. Cryobiology, 61: 248-253.
4) **Chatterjee, S. E., de Lamirande, Gagnon, C. (2001)** Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione, Molecular Reproduction and Development, 60 : 498.
5) **Curi , S.M.; Ariagno , J. I.; Chenlo , P. H. ; Mendeluk , G. R. ; Pugliese , M. M.; Sardi , L. M. ; Repetto , H. E. and Blanco, A. M. (2003)** . Asthenozoospermia : analysis of a large population arch. Androl ; 49 : 343 – 349 .
6) **Dohle , G.R., Jungwirth, A., Colpi,G., Giwercman,A.,Dimer,T.,and Hargrave.(2007) .** Guidelines On Male Infertility. European Association of Urology.
7) **Fraser, L. and Strzezek, J.(2004.).** The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 and 16ºC. Folia Histochemica et Cytobiologica, 42: 49–55.
8) **Gadea, J. E. Selles, M.A. Marco, P. Coy, C. Matas, R. Romar ,and S. Ruiz,(2004).** Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders, Theriogenology 62 : 690.
9) **Gadea, J., F. Garcia-Vazquez, C. Matas, J.C. Gardon, S. Canovas and D. Gumbao.(2005) .** Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. J. Androl. 26: 396-404.
10) **Gadea. , J. M. Molla, E. Selles ., M.A. Marco ., F.A. Garcia-Vazquez a,and J.C. Gardon . (2011).** Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders Cryobiology 62: 40–46 .
11) **Halliwell, B; Gutteridge, J. M. (1993).** "Free Radicals in Biology and Medicine" 3rd ed. New York: Oxford University Press: P 140-153.
12) **Hammadeh, M. E., S. Greiner., P. Rosenbaum and W. Schmidt. (2001).** Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure. J. Androl., 22: 1012–1018.
13) **Isidori , A. ; Latini , M. and Romanelli , F. (2005)** . Treatment of male infertility . Contraception ; 72 : 314 – 318 .
14) **Jungwirth, A., Diemer, T., Dohle, G.R. , Giwercman, A., Kopa, Z., Krausz, C. and Tournaye ,H. (2012)**. Guidelines on Male Infertility . European Association of Urology,p.p:7 .
15) **Kumar, R., G., Jagan. Mohanarao., Arvind and S. K. Atreja. (2011).** Freeze thaw induced genotoxicity in buffalo (Bubalus bubalis) spermatozoa in relation to total antioxidant status. Mol. Boil. Rep., 38: 1499-1506.
16) **Lee, C.Y., Lee, C.T., Wu, C.H., Hsu, C.S. and Hsu, M.I.(2012)** .Kruger strict morphology and post-thaw progressive motility in cryopreserved human spermatozoa. Andrologia. Vol 44:81-86 .
17) **Luvoni, G.C. (2006)** .Gamete cryopreservation in the domestic cat,Theriogenology, 66(1):101-111.
18) **Maxwell, S.R. and Lip, G. Y. (1997).** "Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease". Br. J. Clin. Pharmacol. 44 (4): 307.

19) **Mohammad, Baqer. Minaei., Mohammad, Barbarestani., Saeid, Nekoonam., Abbas, Abdolvahabi., Nasrin, Takzare., Mohammad, Hossein, Asadi., Azim, Hedayatpour. and Fardin, Amidi. (2012).** Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. Iran J Reprod Med Vol.10. No. 2.: 99-104.
20) **Muslih, R.K.; AL-Nimer, M.S. and AL-Zamely, O.M. (2002).** The level of malondialdehyde after activation with (H2O2) and (CuSO4) and inhibition by desferoxamine and molsidomine in the serum of patients with acute myocardial infarction. National Journal of Chemistry; 5: 139-148.
21) **Richard, E., Jones, Kristin., H. Lopez, .(2006).** Human Reproductive Biology , third edition . pp 437 – 440 .
22) **Rossi, T., Mazzilli, F., Delfino, M.and F. Dondero, (2001) .** Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure, Cell and Tissue Banking 2 :9–13.
23) **Said, T. M. , Gaglani, A. and A. Agarwal,(2010).** “Implication of apoptosis in sperm cryoinjury,” Reproductive BioMedicine Online, vol. 2 4, pp. 456–462.
24) **Sanocka, D. and kurpisz, M. (2004).** Reactive oxygen species and sperm cells. Reprod. Biol. Endocrinol ; 2 (4) : 12-19.
25) **Sasikumar, S. and Dakshayani, D. (2013).** Assessment of sperm DNA integrity by Toluidine blue staining technique in infertile patients and its relation to cryopreservation. Int.J.Curr. Microbiol .App. Sci ; 2(6): 280-292.
26) **Sinan, Ozkavukcu; Esra, Erdemli; Ayca, Isik;Derya, Oztuna, and Sercin, Karahuseyinoglu . (2008).** Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. J Assist Reprod Genet. August; 25(8): 403–411.
27) **Taylor, K. P., Roberts, K. Sanders, and P. Burton, (2009)** Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa, Reproductive Biomedicine Online 18 184–189.
28) **Tuncer, P. B., M. N. Bucak., S. Büyükleblebici., S. Sarıözkan., D. Yeni., A. Eken., P. P. Akalın., H. Kinet., F. Avdatek., A. F. Fidan and M. Gündoğan., (2010).** The effect of cysteine and glutathio sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. Cryobiology, 61: 303-307.
29) **Vieytes , A. L. ; Cisale, H. O. and Ferrari ,M. R. (2008).** Relationship between the nuclear morphology of the sperm of 10 bulls and their fertility. Veterinary Record;163: 625-629.
30) **Wang, X; Sharma, R.K.; Sikka, S.C.; Thomas, A.J.; Falcone, T. and Agarwal, A. (2003)**. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male-factor infertility. Fertil Steril 80: 531-535.
31) **WHO Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Sperm– Cervical Mucus Interaction, 4th ed. (1999)**. Cambridge, Cambridge University Press.
32) **WHO, Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Sperm– Cervical Mucus Interaction, 1ST ed. (2010).** Cambridge, Cambridge University Press.
33) **Woods, E.J.; Benson, J.D.; Agca, Y. and Critser, J.K. (2004).** Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology, 48:146-156.