



Cryopreservation Sperm Epididymis of Iraqi Camels and Activation After thawing by Using Q10

Ali Abdullah. al Saadoon¹

Muhammad Baqir
Fakhrildin²

Haider Muhammad al –
Jubouri¹

University of Al-Muthanna / College of Agriculture¹, Medical University of Jabir Ibn Hayyan²

Submission Track

Received : 2/2/2017

Final Revision : 26/4/2017

Keywords

Cryopreservation ,
Sperm Epididymis , Iraqi
Camels , Q10 .

Corresponding

E.mail :

haider1991@gmail.com

Abstract

This study is conducted at the laboratory of post-graduate studies / department of Animal Production / College of Agriculture / University of Al –Muthanna for the period from 17/2 to 14/9/ 2016 to investigate the ability of cryopreservation of epididymal sperms for Iraqi camels and the effect of adding of Q10 thawing solution. The testes are collected from the abattoir directly after slaughtering of animals and transferred to the laboratory in proper temperature. The sperms are collected from the cauda of epididymis and immersed in smart medium previously prepared. The experiment was divided in to third treatments the first (control) , the second thawing solution with 5μM Q10 concentration , the three thawing solution with 10μM Q10 concentration .The results of the study show significant superiority (P≤0.05) for the third treatment 10μM Q10 over the first and second treatments in the individual motility, mass motility and agglutination,. The individual motility types A,B,C are 15.4286 ± 0.53 , 15.4286 ± 0.70 17.0952 ± 0.52 respectively , significant superiority (P≤0.05) for first treatment over the second and third treatments The individual motility types(D) and agglutination are 60.1190 ± 1.18 , 20.4762 ± 0.33 respectively .

المقدمة

من اداء مهامه في سلسلة نقل الالكترون (Mahto وزملاؤه 2014)، اذ ان له دور مهم في رفع طاقة الجسم ويعزز نظام الجسم المناعي لان له دور مهم كمركب مضاد للاكسدة ويوقف انتاج الجذور الحرة الخطرة (Ernster وزملاؤه 1993، Puccio و Licitra، 2014) عند التعرض لأحد العوامل المساعدة على الاكسدة كالتعرض للأشعة فوق البنفسجية او عند كثرة التدخين عند الانسان فان مثل هذه العوامل تساعد على تكوين الجذور الحرة التي تكمن خطورتها على الخلية اذ تؤدي الى تلف DNA مما يعني الى اصابة الجسم بأمراض السرطان والقلب (Xamamoto و Xamashita، 1997) ويوجد Q10 في السائل المنوي وتركيزه يرتبط مع تركيز الحيوانات المنوية ولم تتغير مستوياته في حالة اصابه الذكور بالعقم (Mohammed، 2013). واكد Mancini وزملاؤه (1994) ان هنالك مستويات عالية في السائل المنوي ويرتبط تركيزه مع عدد الحيوانات المنوية. واكدت دراسات اخرى ان مساعد الانظيم يقوم بزيادة نشاط الحيوانات المنوية ويزيد من الولادات الحية (Lafuente وزملاؤه 2013) وفي احدى الدراسات استخدم Q10 في المختبر وجد حدوث انقسامات لأجنة الابقار في وقت مبكر مقارنة مع الاجنة التي لم يستخدم بها Q10 وكذلك وجد زيادة في كتلة الخلايا الداخلية وارتبطت هذه التغيرات بزيادة محتوى ATP نتيجة لوجود Q10 واثبت باحثون

يعد مساعد الانظيم Q10 احد المشتقات الكوينون الطبيعية واكتشف بوساطة Morton (1957) في الدهن الحيواني اما التركيب الكيميائي اثبته Crane في عام 1957 بعد ان قام بعزلة من ميتوكوندريا قلب الابقار (Crane، 1957، 2007) . وتم الحصول عليه أيضا من قيل Morton (1957) من كبد الفران ونتيجة للبحث المستمر للتعرف على الانظيم المساعد Q10 توصل Sastry وزملاؤه (1979) الى ان مساعد الانظيم يوجد في العديد من اجزاء الخلية وليس في الميتوكوندريا فقط . اطلق اسم Ubiquinone على مساعد الانظيم Q10 ويعني واسع الانتشار في العديد من الانسجة (Morton، 1957) وكذلك واسع الانتشار في جميع الانظمة البيولوجية سواء كانت بكتريا ، نباتية او الحيوانية) (Morton، 1957) وتم تحديد الصيغة الكيميائية لمساعد الانظيم (Coenzyme Q10) من قبل Folkers وزملاؤه (1958). و حصل العالم Mitchell على جائزة نوبل لعام 1978 وذلك لتوضيح دور مساعد الانظيم Q10 في السلسلة التنفسية داخل الميتوكوندريا (Mitchell، 1979) وكذلك لمساعد الانظيم Q10 دور فعال في نقل الالكترونات والبروتونات في عملية السلسلة التنفسية داخل الميتوكوندريا وبعد Q10 من المصادر الرئيسية التي تعمل على نقل الطاقة في الجسم (Matthews وزملاؤه، 1998) وهذا الدور يعطيه اهمية بيولوجية كبيرة. علما ان وجوده بشكل متأكسد تام يمكنه

The Research is part of M.Sc. for 3rd Author.



ثم اخذ منه 0.1 مل و اضيف له 0.4 مل من SMART medium ليتكون محلول التركيز العالي (10µM Q10) .

5- حركة ونشاط النطف البربخية :
قيست حركة الحيوانات المنوية تحت المجهر بقوة تكبير X400 اذ وضعت قطرة من النطف البربخ وبعد دقيقة تم العد في درجة حرارة 30-35 مئوية وفحص الحقل المجهرى بكل منتظم على فق (WHO، 2010) وصنفت حركة الحيوانات المنوية اعتمادا على طريقة (Fakhrildin 2014) الى 4 اصناف A حركة تقدمية عالية، B حركة دائرية فقط، C، و حركة دائرة محورية أو حركة الذيل فقط و D غير متحرك .

6- تكتل النطف :
تم حساب تكتل (تراص) النطف البربخية مثل التصاق الرأس مع الرأس او الذيل مع الرأس وهناك حيوانات غير قادرة على الحركة ملصقه مع بعضها البعض حسب طريقة (WHO، 2010) وتم قياسها بنفس شرائح قياس فعالية الحركة .

7- التحليل الاحصائي :
استخدم التصميم العشوائي التام في تحليل البيانات الاحصائية وحسب النموذج العلمي الاتي: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$ يمثل الصفة المدروسة
 μ : المتوسط العام للتجربة
 T_i : يمثل المعاملات (i=1,2,3)
 e_{ij} : الخطأ العشوائي
واستخدم في تحليل البيانات البرنامج الاحصائي SPSS نسخة 14 ولدراسة معنوية الفروقات استخدم اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan 1955)

النتائج والمناقشة

تبين من خلال الدراسة الحالية للصفات المدروسة وكما مبين في جدول (1). الحركة التقدمية (A) اذ حصل لها ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الثالثة على المعاملتين الاولى والثانية في حين لم نلاحظ زيادة معنوية بين المعاملة الاولى والثانية .

اما الحركة التقدمية (B) تبين حصول ارتفاع معنوي للمعاملتين الثانية والثالثة على المعاملة الاولى في حين لم نلاحظ وجود زيادة معنوية ($P \leq 0.05$) بين المعاملتين الثانية والثالثة، والحركة غير التقدمية (C) اذ حصل ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الثالثة على المعاملة الاولى في حين لم تظهر زيادة معنوية بين المعاملة الثالثة والثانية والمعاملة الثانية والاولى . اما النطف عديمة الحركة (D) اذ حصل ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الاولى على المعاملتين الثانية والثالثة في حين لم نلاحظ زيادة معنوية بين لمعاملة الثانية والثالثة ويعزى سبب تلك التغيرات في الحركة A و B و C و D الى ان مساعد الانظيم يعمل كمضاد للاكسدة (Crane، 2001)، ومن المعروف ان الاكسدة تعمل على تغيير خصائص الخلايا واضعاف حركة الحيوانات المنوية و يؤدي مساعد الانظيم وظيفة مهمة وهي دخوله في عمليات السلسلة التنفسية (Zhang، وزملاؤه، 1999؛ Brandt، 1999). ومساعد الانظيم له دورا اساسيا في السلسلة التنفسية اذ يستقبل الالكترونات من المواد المختزلة

اخرين ذلك حيث اكدوا زيادة الـ ATP بوجود الـ Q10 (Bentov وزملاؤه 2014).

وتهدف الدراسة الحالية الى :
1- امكانية تجميد النطف البربخية للجمال العراقية المذبوحة في المجزرة .
2- استخدام مساعد الانظيم كمنشط للنطف .

المواد وطرائق العمل

اجريت هذه الدراسة للفترة من 2016/2/17 ولغاية 2016 /9/14 في مختبر الدراسات العليا التابع لقسم الثروة الحيوانية كلية الزراعة جامعة المثنى باستخدام خصى تسعة عشر من ذكور الإبل العراقية تبلغ من العمر (5-8) سنة وحصل عليها من مجزرة محافظتي (الساووة والديوانية) وجمعت الخصى منها بعد ذبح الحيوانات مباشرة ثم بعد ذلك تم فحص النطف البربخية مباشرة وقسمت نطف كل خصية الى ثلاث معاملات وكما يلي :

- 1- المعاملة الاولى (السيطرة)
- 2- المعاملة الثانية بتركيز 5µM Q10
- 3- المعاملة الثالثة بتركيز 10µM Q10

1- جمع الخصى ونقلها :
ذبحت الإبل (2-4) صباحا ثم تم الحصول على العينات وقطعت بشكل كامل من دون أي اضرار ثم بعد ذلك نقلت بحافظة اعد بشكل خاص بدرجة حرارة مناسبة ونقلت الى المختبر بأسرع ما يمكن للحصول على افضل النتائج .
2- جمع النطف من البربخ :

بعد ان حضرت العينات الى المختبر ووضعت في درجة حراره الغرفة بعد ذلك فصل البربخ عن جسم الخصية مع الحرص على عدم حدوث اضرار اثناء استخراج البربخ بعدها تم التخلص من الاوردة والشرايين من على جسم البربخ بعد ذلك تم تقطيع ذيل البربخ الى قطع صغيره جدا ثم وضع محلول محضر (SMORT Medium) مسبقا للحصول على النطف البربخ ومزجت جيدا ثم تم استخلاص المحلول الحاوي على النطف وجرى لها فحص اولي تحت المجهر بقوة تكبي X100 .

3- محاليل التجميد:
أستخدم محلول التجميد يحتوي على 15% جلسرين ويحتوي ايضا على البومين المصل البشري لحماية الحيوانات المنوية من التلف (FertiPro N.V Industrie Park Noord 32, and 8730 Beernem, Belgium)
* محلول التجميد (Sperm Freeze) بلجيكي الصنع .

4- محاليل الاذابة :
اعد محلول الاذابة باذابة 400 ملغم من مساعد الانظيم Q10 في 40 مل لمحلول DMSO ووضع في حمام مائي 40 درجة مئوية مع التحريك المستمر لمدة 10 دقائق لحين حصول الاذابة التامة ليتكون لدينا محلول اساسي stock solution .
تم سحب 0.1 مل من المحلول الاساسي و اضيف الى 19.9 مل من SMART medium ثم تم سحب 0.1 مل منه و اضيف الى 0.4 مل من SMART medium ايضا ليتكون محلول التركيز الواطئ (5µM Q10). اما الى التركيز العالي تم سحب 0.1 مل من stock solution ونضيفه الى 9.9 مل من SMART medium ليتكون 10 مل من المحلول الاساسي



معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الثالثة على المعاملتين الثانية والاولى وحصل ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) ايضا للمعاملة الثانية على المعاملة الاولى ، اما النطف الغير متحركة الكلية حصل لها ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الاولى على المعاملتين الثانية والثالثة في حين لم تلاحظ زيادة معنوية بين المعاملتين الثانية والثالثة وقد يعود السبب الى ان استخدام مساعد الانظيم ادى الى زيادة النسبة المئوية للطف المتحركة على حساب النسبة المئوية للنطف الغير متحركة ويعزى سبب ذلك الى اسباب عديدة منها الدور المهم الذي يلعبه مساعد الانظيم كمضاد للاكسدة و دخول مساعد الانظيم (Q10) في عمليات الاكسدة الفوسفاتية تنتج منها جزيئات ATP وبالتالي توفر جزيئات ATP بعدد اكبر والتي تؤدي زيادة في حركة الحيوانات المنوية (Hosoe وزملاؤه، 2007).

وخالصة القول يمكن ان يستنتج مما تقدم ان استخدام مساعد الانظيم ادى الى تحسن في نشاط وحركة النطف البربخية لدوره المهم كمضاد للاكسدة واشراكه في عمليات السلسلة التنفسية.

النتيجة من عمليات الايض للحوامض الدهنية والكلوكوز وينقلها الى مواد مستقبلية اخرى وفي الوقت نفسه يقوم بنقل البروتونات الى الغشاء الخارجي (chance، 1995). ان مصدر الطاقة الاساسي لفعاليات الخلية هو جزيئات الادينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP) وان جزيئات ATP المتكونة من الفسفرة التأكسدية في الغشاء الداخلي للميتوكوندريا تنتقل الى النيببات الدقيقة لاستخدامها في الطاقة الحركية للحيوانات المنوية وان الضرر الذي يحصل للحيوانات المنوية اثناء الحفظ بالتجميد يؤدي الى ضرر حتمي في الميتوكوندريا والذي يؤدي الى ضرر في الفعالية التنفسية (Januskauskas، وزملاؤه 2003)، من خلال الدراسة ايضا تبين ان صفة تكتل النطف حصل لها ارتفاعا معنويا ($P \leq 0.05$) للمعاملة الاولى مقارنة مع المعاملتين الثانية والثالثة في حين لم تظهر زيادة معنوية بين المعاملتين الثانية والثالثة ويعزى سبب ذلك ان استخدام مساعد الانظيم ادى الى زيادة فعالية الحركة وبالتالي قلل من النسبة المئوية للنطف المتراسة.

اما النطف المتحركة الكلية اذ حصل لها ارتفاع

جدول (1) تأثير اضافة مساعد الانظيم بعد الاذابة على نشاط النطف البربخية

| المعاملة الثالثة 10 μ M | المعاملة الثانية 5 μ M | المعاملة الاولى السيطرة | المعاملات الصفات |
|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 0.53±15.428 a | 0.56 ±13.833 b | 0.72±12.238 b | الحركة التقدمية %A |
| 0.70±15.428 a | 0.62 ±14.952 a | 0.62±12.738 b | الحركة التقدمية %B |
| 0.52±17.095 a | 0.39 ±16.428 ab | 0.33±14.952 b | الحركة غير تقدمية %C |
| 1.34±52.142 b | 1.13±54.738 b | 1.18±60.119 a | عديمة الحركة %D |
| 0.62±17.714 b | 0.44±18.666 b | 0.33±20.476 a | التكتل % |
| 1.35±48.047 a | 1.13±42.261 b | 1.18±39.881 c | النطف المتحركة % |
| 1.34±52.142 b | 1.13±54.738 b | 1.18±60.119 a | النطف الغير متحركة % |

الأحرف المختلفة ضمن الصف الواحد تدل على وجود فروقات معنوية ($P \leq 0.05$) بين المعاملات

Oocyte Aneuploidy in women Undergoing IVF/ICSI Treatment. Clinical Medicine Insights Reproductive Health.;8:31-36

Brandt, 1999. Proton Translocation in the Respiratory Chain Involving Ubiquinone-a Hypothetical Semiquinone Switch Mechanism for Complex I Bio factors, 9, 95-102.

الاستنتاجات :

- 1- امكانية تجميد النطف البربخية
- 2- استخدام مساعد الانظيم بتركيز 10 μ M ادى الى تحسن معنوي في صفات النطف .

المصادر

Bentov Y, Hunnam T, Jursicova A. 2014. Coenzyme Q10 Supplementation and



- Mahto S, Ansari A, Singh P.,2014. Benefits of Co-enzyme Q10 –AReview. International Journal for Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS).;3(4):232-300.
- Mancini A, De Marinis L, Oradei A.1994. Coenzyme Q10 concentrations in normal and pathological human seminal fluid.Androl.;15(6):591-594.
- Matthews R, Yang L, Browne S, 1998. Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. Proceedings of the National Academy of Sciences.;95(15):8892-8897.
- Mitchell, 1979 .Respiratory Chain Concept and its Chemio-smotic Consequences. J. Science, 206, 1148-1159.
- Mohammed M. 2013.Effect of Coenzyme Q10 enriched to culture medium on outcomes of in vitro fertilization and early embryonic development in mice as a model for human being [Master thesis]. Al-Nahrain University, Iraq.
- Morton, , 1957. Quinone and Quinols as Inhibitors of Lipid Peroxidation, Lipids, 1, 282-284.
- Sastry, J. Jayaraman, T. Ramasarma.1961, Intra Cellular Distribution of Coenzyme Q, Nature, 189, 577-580 Science, 206, 1148-1159, (1979).
- World Health Organization.(WHO) 2010.Reference values and semen nomenclature. In: laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th. Ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland. ISBN 9789241547789.
- Xamamoto, and S. Xamashita, 1997.Mol. Aspect. Med., 18, 5, 79.
- Zhang, H. Deng, X. Klm, 1999.Structure and Reaction Mechanisms of the Multifunctional Mitochondrial Cytochrome bc1 Complex. Biofactor, 9, 103-110.
- Chance,G.R.Williams1995,Biochemistry",Kal yani,Publishers,Ludhiana New Delhi, P. 493-494
- Crane, 2007.Discovery of Ubiquinone (Coenzyme Q) and an overview of function, Mitochondrion. 19, 111-102
- Crane, Y. Hatefi, R. L. Lester, 1957. Widmer, Isolation of A quinone from Beef Heart Mitochondria, Biochem. Biophys, Acta, 25, 220-221
- Crane. 2001.Biochemical functions of coenzyme Q10. J Am Coll Nutr. ;20(6):591-598
- Ernster, K. Folkers, S. A. Mortensen , G.P. Littarru, T. Yamagami and G. Lenaz, 1993.The Clinical Investigator, 71, 8 .
- Fakhrildin M, Alsaadi R. Honey supplementation to Semen-Freezing Medium Improve Human Sperm Parameters post-thawing. Journal of Family and Reproductive Health. 2014;8(1):27-31.
- Folkers, D. E. Wolf, G.H. Hoffman, and N. R. Trenner ,J. Amr.1958. Chem. Soc., 80, 4752
- Hosoe, M. Kitano, H. Kishida, H. Kubo, K. Fujii and M. Kitahara: 2007.Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QH) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers. Regul Toxicol Pharmacol 47(1), 19-28 .
- Januskauskas A, A Johannisson, and H Rodriguez-Martinez, 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability,chromatin structure, and field fertility. Theriogenol. ; 60:743-758.
- Lafuente R, Gozales-Comadra M, Sola I.,2013. Coenzym e Q10 and male infertility: a met a-analysis. J Assist Reprod Gent.30(9):1147-1156.
- Licitra F, puccio H. 2014.An Overview of current Mouse Models Recapitulating Coenzyme Q10 Deficiency syndrome. Mol Syndromal.;5(3-4):180-186.



تجميد النطف البربخية للجمال العراقية وتنشيطها بعد الاذابة باستخدام مساعد الانظيم Q10

علي عبدالله السعدون¹ محمد باقر محمد فخر الدين² *حيدر محمد الجبوري¹

(كلية الزراعة / جامعة المثنى¹ ، كلية الطب جامعة جابر ابن حيان الطبية²)

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة في مختبر الدراسات العليا التابع لقسم الثروة الحيوانية- كلية الزراعة /جامعة المثنى للفترة من 17 /2 /2016 ولغاية 14 /9 /2016 بهدف معرفة إمكانية تجميد النطف البربخية للجمال العراقية، وتأثير إضافة مساعد الانظيم الى محلول الاذابة اذ جمعت الخصى من المجزرة بعد ذبح الحيوان مباشرة ونقلت بدرجة حرارة مناسبة الى المختبر وقطع ذيل البربخ الى قطع صغيرة واضيف الوسط الزراعي SMART Medium تم تحضيره مسبقا لاستخلاص النطف. وقسمت التجربة الى ثلاث معاملات الاولى سيطرة والثانية بتركيز (5µM Q10) والثالثة بتركيز (10µM Q10) وبينت النتائج وجود ارتفاع معنوي للمعاملة الثالثة بالنسبة للصفات A وB وC وكانت النتائج. 0.53 ± 15.4286 و 0.70 ± 15.4286 و 0.52 ± 17.0952 على التوالي. اما النطف عديمة الحركة (D) فحصل لها ارتفاع معنوي للمعاملة الاولى وكانت النتيجة 1.18 ± 60.1190 ، وتكتل النطف فحصل لها ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الاولى وكانت النتيجة 0.33 ± 20.4762 والنسبة الكلية للنطف المتحرك فحص لها ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الثالثة وكانت النتيجة 1.34 ± 52.1429 .

الكلمات المفتاحية : تجميد ، النطف البربخية ، الجمال العراقية ، الاذابة ، مساعد الانظيم Q10 .