JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره هفتم، شماره یکم، بهار و تابستان ۱۳۹۵

گزارش بالینی تاثیر تجویز داروهای GnRH , $PGF_2\alpha$ و Oxytocin بر تعداد اسپرم و حجم منی یک قلاده سگ مبتلا به الیگواسپرمی

نوید امینی[1*] ، اورنگ عطایی عمارلویی[2]، مهران فرهودی مقدم[2] ،سینا غزنوی[3]

۱-دانش اموخته دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه ازاد اسلامی ، کرج، ایران

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه ازاد اسلامی، کرج، ایران

۳- دانش اموخته دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه ازاد اسلامی، کرج، ایران

نویسنده مسئول : navid88amini@gmail.com

دریافت مقاله: ۳۰ خرداد ماه ۱۳۹۳ ،پذیرش نهایی: ۵ آبان ماه ۱۳۹۳

چکیده:

یک قلاده سگ نر میکس۲ ساله به وزن ۳۰ کیلوگرم جهت انجام یک پروژه پژوهشی به همراه ۷ قلاده سگ دیگر مورد مطالعه قرار گرفتند. طی ۳ مرحله اخذ مایع منی از این سگ به فواصل هر ۷ روز یک بار ،مشخص گردید که سگ مورد مطالعه دچار الیگواسپرمی می‌باشد. برای درمان این سگ، سه دارو با فواصل یک هفته‌ای مورد استفاده قرار گرفتند: الف) اکسی توسین با دوز IU / Dog ۱۰، به صورت داخل عضلانی، ۱۰ دقیقه قبل از نمونه‌گیری. ب) گنادوتروپین ریلیزینگ هورمون با دوز ۵۰میکرو گرم برای هرقلاده سگ بصورت زیر جلدی ۶۰ دقیقه پیش از نمونه‌گیری و ج)PGF2α با دوز ۵ میکروگرم برکیلوگرم ۱۵ دقیقه پیش از نمونه‌گیری به صورت عضلانی تزریق شد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که هر سه داروی اکسی توسین، پروستاگلاندین و گنادوتروپین بر تعداد اسپرم و حجم منی سگ مبتلا به الیگواسپرمی تاثیر گذاری مطلوبی دارند .

کلمات کلیدی: الکالاین فسفاتاز – تستسترون – گنادوتروپین – پروستاگلندین – اکسی توسین – سگ – الیگواسپرمی

توصیف بیمار:

یک قلاده سگ نر نژاد مخلوط دو ساله به وزن ۳۰ کیلوگرم که مبتلا به عارضه ی الیگو اسپرمی بود به همراه ۷ قلا ده سگ نرمال دیگر در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند تا تاثیر سه داروی GnRH ، اکسی توسین و پروستاگلاندیت بر این عارضه مورد بررسی قرار گیرد.

یافته های بالینی:

بدنبال سه مرحله اخذ سیمن از سگ تحت مطالعه به فاصله‌ی هر یک هفته یک بار و با روش ماساژ و پس از شمارش اسپرم های موجود، عارضه‌ی الیگواسپرمی این سگ مورد تایید قرار گرفت .

لازم به ذکر است که به منظور تایید صحت آزمایش غلظت (ALP(Alkaline Phosphatase سیمن نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین معنا که بر اساس منابع موجود چنانچه غلظت ALP کمتر از ۵۰۰۰ واحد در دسی‌لیتر منی باشد نشان دهنده ایراد در نحوه نمونه‌گیری و یا انسداد در مجاری ذخیره کننده و انتقال دهنده اسپرم می‌باشد. اما چنانچه غلظت این آنزیم بالای ۵۰۰۰ واحد در دسی لیتر بوده و تعداد اسپرم موجود در سیمن نیز کمتر از حد نرمال باشد ،نشان دهنده الیگو اسپرم بودن سگ می باشد با توجه به این موضوع که میزان ALP در تمامی نمونه های گرفته شده بیش از ۵۰۰۰ IU/dl می‌باشد، صحت نمونه گیری به تایید می‌رسد و کم بودن تعداد اسپرم در نمونه شاهد به علت الیگو اسپرم بودن سگ مورد مطالعه می‌باشد (۸،۵).

درمان و نتایج

برای درمان این سگ، سه دارو با فواصل یک هفته ای مورد استفاده قرار گرفتند . دوز دارو ها و فاصله زمانی میان تجویز دارو و نمونه‌گیری به شرح ذیل می‌باشد :

الف) اکسی توسین با دوز ۱۰ IU/Dog با نام تجاری وتوسین، به صورت داخل عضلانی، ۱۰ دقیقه قبل از نمونه گیری تزریق گردید. در هر میلی لیتر از دارو ۱۰ IU اکسی توسین موجود بود .(۹)

ب) گنادوتروپین ریلیزینگ هورمون با دوز ۵۰ میکرو گرم برای هر سگ تجویز گردید. در این مطالعه از گنادوتر وپین دی استات تری هیدرات با نام تجاری Cystorelin استفاده شد که در هر میلی لیتر آن ۵۰ میکروگرم ماده موثره GnRH وجود دارد . این دارو به صورت زیر جلدی ۶۰ دقیقه پیش از نمونه گیری تزریق شد . (۹)

ج) PGF2α با دوز ۰/۰۰۵ میلی گرم بر کیلو گرم (۵ میکروگرم برکیلوگرم) مورد استفاده قرار گرفت . PGF2α مورد مصرف در این مطالعه کلوپروستنول با نام تجاری Veteglan بود که در هر میلی لیتر آن ۰/۰۷۵ میلی گرم داروی موثره کلوپروستنول وجود دارد.این دارو با دوز ذکر شده ۱۵ دقیقه پیش از نمونه گیری به صورت عضلانی تزریق شد .(۹)

د)در ۷ قلاده سگ گروه شاهد از سرم نرمال سالین استفاده شد که با دوز ۱ میلی لیتر به ازای هر قلاده سگ و ۱۵ دقیقه پیش از نمونه گیری به صورت زیر جلدی تزریق شد. جیره غذایی سگ‌ها در مدت زمان مطالعه ثابت بود. جمع آوری نمونه به کمک تکنیک اسپرم‌گیری دستی (Manual semen collection technique) انجام گرفت. به دلیل عدم اشنایی حیوان با تکنیک اسپرم گیری دستی، سه هفته پیش از نمونه گیری اصلی، دو نوبت نمونه‌گیری ازمایشی انجام شد و هفت روز پس از آخرین نمونه گیری آزمایشی ، اولین نمونه گیری اصلی انجام

گرفت . سایر نمونه گیری ها هم با فاصله هفت روزه صورت پذیرفت تا در این مدت ذخیره اسپرمی تجدید گردد (۸) .

در حین نمونه‌گیری زمان نعوظ (Erection Time) و زمان انزال (Ejaculation Time) مورد ارزیابی قرار گرفت. اندازه گیری زمان های ذکر شده با استفاده از کرونومتر دیجیتال صورت پذیرفت . حجم نمونه (منی) با استفاده از لوله‌های مخروطی شکل مدرج محاسبه شد. محاسبه PH توسط PH سنج دیجیتالی انجام گرفت. پس از جمع آوری نمونه و انجام مراحل بالا، آنالیز نمونه به این شرح انجام گرفت :

میـزان حرکت رو بـه جلـوی سـلول های اسـپرم (Progressive Motility) با کمک میکروسکوپ نوری اندازه گیری شد. شمارش کلی تعداد اسپرم ها (Total Sperm Count) توسط لام هموسایتومتر پس از رقیق سازی یک به صد با محلول نمکی فسفات با خاصیت بافری (Phosphate Buffered Saline) انجام شد . جهت بررسی ریخت شناسی بر روی سلول‌های نمونه، یک قطره از نمونه بر روی لام قرار گرفت و پس از پخش شدن روی لام توسط دمای محیط خشک و با ریختن متانول بر روی لام فیکس گردید . پس از خشک شدن در دمای اتاق لام مورد نظر با رنگ گیمسا رنگ امیزی و به ارامی شست و شو داده شد و درصد اسپرم های با ظاهر طبیعی (morphologically normal cell) در زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردید.

میزان تستسترون خون این سگ قبل از تزریق هر دارویی توسط ازمایشگاه تعیین گردید (۱٫۸۸ng/ml) تا از صحت محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گنادها اطمینان حاصل شود .(۱۲) پس از استفاده از داروهای GnRH ،PGf2α و Oxytocin که در هفته‌های جداگانه مورد استفاده قرار گرفتند ودر مقایسه با سرم فیزیولوژی تزریق شده نتایج زیر حاصل شد :

جدول شماره ۱ – نتایج حاصل از تزریق GnRH،PGf2αو Oxytocin و مقایسه انها با saline در چهار هفته متوالی

	Week 1Saline	Week 2GnRH	Week 3Oxytocin	Week 4PGf2α
مدت نعوض	۴۵ ”	۴۰ ”	۴۰”	۲۹”
مدت انزال (ساعت)	۵:۳۰	۴:۰۸	۵:۱۵	۴:۲۳
Ease Score	۶	۳	۶	۳
حجم منی	۲ml	۲ml	۴ml	۵ ml
PH منی	۶/۹	۶/۵	۶/۹	۷/۱
در صد تحرک	%۳۰	%۷۰	%۵۰	%۴۰
$SC/ml \times 10^6$	۲۰	۵۰	۱۷۰	۹۶
شمارش کلی اسپرم $\times 10^6$	۴۰	۳۵۰	۶۸۰	۴۸۰
MN Sperm P.	%۷۰	%۸۰	%۶۵	%۳۰
$T' \times 10^6$	۱۲	۲۴۵	۳۴۰	۱۹۲
$TMNS \times 10^6$	۸/۴	۱۹۶	۲۲۱	۵۷/۶
ALP	۱۳۷۷۵۱	۱۸۷۶۸	۶۷۶۲۶	۳۸۹۱۳

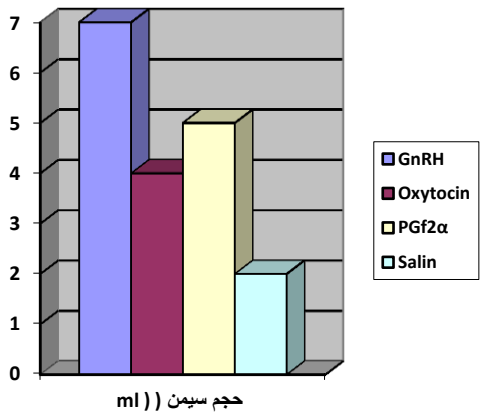
SC/ ml : Sperm concentration per ml

MN sperm p: Morphological normal sperm percent

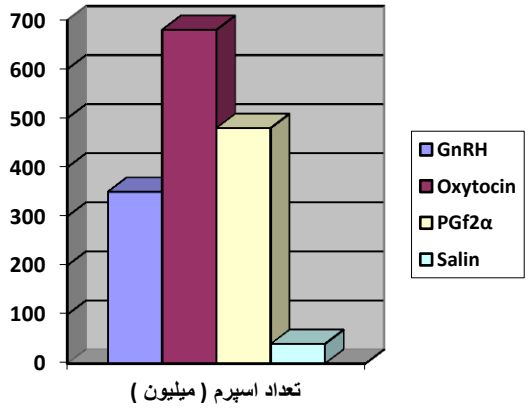
T ': total sperm cells that have progressive forward motility

TNMS : Total Normal Motile Sperm

ALP : Seminal Alkaline Phosphatase (ALKP)



نمودار شماره ۱ : مقایسه حجم منی پس از تزریق $PGf_2\alpha$ ،GnRH ،Oxytocin و saline



نمودار شماره ۲ : مقایسه تعداد اسپرم پس از تزریق $PGf_2\alpha$ ،GnRH ،Oxytocin و saline

همانطور که در نمودار شماره ۱ مشاهده می شود تاثیر گنادوتروپین بر حجم سیمن بیش از دو داروی دیگر می باشد و با توجه به نمودار شماره ۲ تاثیر اکسی توسین بر تعداد اسپرم در مقایسه با دو داروی دیگر به مراتب بیشتر است .

نتیجه گیری و کاربرد بالینی

چنانچه غلظت ALP کمتر از ۵۰۰۰ واحد در دسی لیتر منی باشد نشان دهنده ایراد در نحوه نمونه گیری و یا انسداد در مجاری ذخیره کننده و انتقال دهنده اسپرم می‌باشد. اما چنانچه غلظت این آنزیم بالای ۵۰۰۰ واحد در دسی لیتر باشد و تعداد اسپرم موجود در سیمن کم باشد نشان دهنده الیگو اسپرم بودن سگ می باشد با توجه به این موضوع که میزان ALP در تمام نمونه های گرفته شده بیش از IU/ml ۵۰۰۰ می باشد، صحت نمونه گیری به تایید می رسد و کم بودن تعداد اسپرم در نمونه شاهد به علت الیگو اسپرم بودن سگ مورد مطالعه می باشد (۵، ۸) . اندازه گیری تستسترون خون این سگ (۱،۸۸ ng/ml) پیش از تجویز هرگونه دارو ، صحت سلامت محور هیپوتالاموس – هیپوفیز – گنادها را تایید می نماید (۱۲) .

همچنین با مد نظر قرار دادن اثرات اکسی توسین و پروستاگلندین که موجب افزایش دامنه انقباضات در

ناحیه دیستال اپی دیدیم (distal epididymis) و بخش پروگزیمال مجرای دفران (proximal ductus deferens) می‌شوند (۶) و نیز تاثیر گنادوتروپین بر روی افزایش غلظت تستسترون خون (۳ و ۱۰) می‌توان به این نتیجه رسید که افزایش غلظت اسپرم و حجم سیمن در اثر تاثیر دارو های هورمونی بوده است . با توجه به نتایج بدست امده امکان وجود یک اختلال در مجاری مربوط به ذخیره سازی و انتقال اسپرم محتمل است اما به دلیل عدم انجام سونوگرافی دستگاه تولید مثل این سگ ادله کافی برای اثبات این موضوع موجود نیست .

Milan B. Hess در سال ۲۰۰۲ طی مطالعه ای که بر روی ۸ قلاده سگ انجام داد به این نتیجه رسید که اکسی توسین و پروستاگلاندین در افزایش حجم سیمن موثر هستند. او ۰/۱ mg/kg پروستاگلاندین را ۱۵ دقیقه قبل از نمونه گیری به صورت عضلانی و همچنین 2.5 units/dog اکسی توسین را ۱۰ دقیقه قبل از نمونه گیری به صورت عضلانی تجویز کرده بود. (۲)

البته Michelle A. Kutzler معتقد است که اکسی توسن و پروستاگلاندین با روشی که Milan B. Hess به کار برده است نه بر روی حجم سیمن و نه بر روی تعداد اسپرم موثر نمی باشند . (۴)

Farr و Ellis در سـال ۲۰۰۵ گـزارش کـردند که PGF2α در شرایط آزمایشگاهی قدرت انقباض لوله های سمینفروس را افزایش می‌دهد در حالی که مصرف PGE2 قدرت و شدت انقباضات را در این ناحیه کم می‌کند.(۱)

Voglmayr در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۴ انجام داد در داخل رت تستیس و مجرای دفران قوچ کتتر گذاری انجام داد تا اثر اکسی توسین را بر روی جریان مایع سمینال بررسی کند.

به دنبال این کتترگذاری IU/kg ۱۲ اکسی توسین به حیوان تزریق شد و این تزریق به شکل انفوزیون داخل وریدی۱/۵ IU/kg/min در عرض ۱ ساعت به حیوان انجام گرفت . با این دوز از دارو ترشح سیمن به شکل موج های متمایز که هر کدام ۳۰ تا ۴۰ ثانیه طول می کشیدند و پس از ۱تا۳ دقیقه دوباره ظاهر می شدند مشاهده شد ، همچنین حجم منی تقریباً ۲ برابر مقداری بود که در حالت کنترل و بدون تجویز اکسی توسین مشاهده شده بود . حجم منی که از کتتر قرار گرفته در رت تستیس جمع آوری شده بود نیز تا حدی در زمان تجویز اکسی توسین نسبت به حالت شاهد افزایش یافته بود. (۱۱)

Nicholson و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۱ تست مشابهی را برای قوچ های بیهوش شده انجام دادند، آن‌ها موفق به مشخص نمودن این موضوع شدند که مصرف میزان ۳۰ میلی گرم پروستاگلاندین می‌تواند به شکل قابل توجهی مقدار مایع و تعداد سلول های خارج شده از دم اپی دیدیم را افزایش دهد.

با اندازه‌گیری زمان‌های گوناگون پس از تجویز دارو Nicholson و همکارانش مشخص نمودند که پروستا – گلاندین می تواند ۱۵ دقیقه بعد از تجویز ، حجم مایع جمع آوری شده و تعداد سلول های اسپرم را به طور چشم گیری بالا ببرد. ذکر این نکته در این جا لازم است که این مقادیر تا ۴۰ دقیقه پس از درمان نیز به حد نمونه شاهد بر نمی گردد .(۷)

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان پیشنهاد کرد که هر سه داروی اکسی توسین، پروستاگلاندین و گنادو– تروپین بر تعداد اسپرم و حجم سیمن سگ مبتلا به الیگو– اسپرمی تاثیرگذاری مطلوبی دارند.

تقدیر و تشکر

با تشکر فراوان و آرزوی موفقیت برای مسئولین و نیروهای پایگاه یکم نیروی هوایی ارتش جمهوری اسلامی ایران که در انجام این مطالعه زحمات زیادی را متحمل شدند .

References:

1.Farr CH, Ellis LC.(1980). In-vitro contractility of rat seminiferous tubules inresponse to prostaglandins, cyclic GMP, testosterone and 2,4' dibromoacetophenone. J Reprod Fertil;58:37.

2.Hess MB. (2002).The effects of prostaglandin F2α,oxytocin and gonadotropin releasing hormone on ejaculate characte -ristics in the dog . 1-54.

3. Knol BW, Dieleman SJ, Bevers MM,Van den brom WE. (1993). GnRH in the male dog: dose response relation -ships with LH and testosterone. J Reprod Fertil;98:159.

4. Kutzler MA. Canine semen collection and management of male infertility,Ore -gon State University,Department of Ani -mal Science-Companion Animal Indust -ries, 312 Withycombe Hall Corvallis, OR 97331

5. Kutzler MA, Solter PF, Hoffman WE,Volkmann DH. (2003*):* Characterization and localization of alka -line phosphatase in canine seminal plas -ma and gonadal tissues. *Theriogenology* ;60(2):299-306.

6. Melin P.(1970). Effects in vivo of neu -rohypophysial hormones on the contra-ctile activity of accessory sex organs in male rabbits. Journal of reproduction and fertility. Jul;22(2):283-92.

7. Nicholson HD, Parkinson TJ, Lapwood KR. (1999). Effects of oxytocin and vaso -pressin on sperm transport from the cauda epididymis in sheep. J Reprod Fertil; 117:299.

8 . Payan-Carreira R, Miranda S.and Niz -anski W. (2011). Artificial Insemination in Dogs, Artificial Insemination in Farm Animals, Dr. Milad Manafi (Ed.), ISBN: 978-953-307-312-5, InTech, Available from:http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/artificial-insemination-in-dogs

9. Plumb DC. (2008). Veterinary Drug Handbook. Sixth ed. Ames: Iowa State University Press. 686.439.220

10. Purswell BJ, Wilcke JR.1993. Response to gonadotrophin-releasing hormone by the intact male dog: serum testosterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. Journal of reproduction and fertility [47:335-341]

11. Voglmayr JK. 1975. Output of spermatozoa and fluid by the testis of the ram and its response to oxytocin. J Reprod Fertil;43:119.

12. Simpson GM.(2004). *BSAVA Manual of Small Animal Reproduction and neonatology*. england: british small animal veterinary association. 61-94.