**مجله دانشکده پزشکی اصفهان**
**سال سی و چهارم/شماره‌ی ٤٠١/هفته‌ی اول آذر ماه ١٣٩٥**

**تاریخ دریافت:** ١٣٩٥/٥/٦
**تاریخ پذیرش:** ١٣٩٥/٧/٢

# اثرات نگهداری نمونه‌ی مایع منی در حرارت ۶–۴ درجه‌ی سانتی‌گراد بر روی حرکت، بقا و دناتوره شدن DNA اسپرم

زهره ناطقیان[۱]، غلامرضا دشتی[۲]، شکوفه بقازاده[۳]، فرهاد گلشن ایرانپور[۴]

**مقاله پژوهشی**

## چکیده

**مقدمه:** DNA اسپرم پستانداران، متراکم‌ترین DNA یوکاریوتیک است و این DNA متراکم می‌تواند در مقابل عوامل مختلف شیمیایی و محیطی مقاومت کند. از آن جایی که به طور معمول، مرگ سلولی معادل مرگ هسته و دناتوره شدن DNA اسپرم تلقی می‌شود، هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر نگهداری نمونه‌ی شسته شده‌ی مایع منی در یخچال (۶–۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) بر درصد بقا، حرکت کل و تمامیت DNA اسپرم مردان نورموزواسپرم و بررسی همزمانی مرگ سلولی با دناتوره شدن DNA آن بود.

**روش‌ها:** در این مطالعه‌ی تجربی، ۱۳ نمونه‌ی مایع منی مردان نورموزواسپرم دو بار در محیط کشت Ham's F10 شسته شد. این نمونه‌ها به مدت ۱۲ روز در حرارت ۶–۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. در روزهای صفر (بلافاصله پس از نمونه‌گیری)، ۱، ۲، ۵، ۷ و ۱۲، درصد اسپرم‌های زنده، متحرک و دارای DNA دو رشته‌ای اندازه‌گیری گردید. بقا و تمامیت DNA اسپرم‌ها به ترتیب با استفاده از رنگ‌آمیزی Eosin-Nigrosin و رنگ‌آمیزی Acridine orange اندازه‌گیری شدند.

**یافته‌ها:** میزان بقا و حرکت کل اسپرم‌ها به طور معنی‌داری در طی ۱۲ روز نگهداری نمونه‌ها در یخچال کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$). بر خلاف بقا و حرکت اسپرم‌ها، تمامیت DNA تا پایان ۱۲ روز نگهداری، تغییر معنی‌داری نداشت.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه پیشنهاد می‌کند که تمامیت DNA اسپرم حتی پس از ۱۲ روز نگهداری نمونه‌ی مایع منی در یخچال حفظ می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** دناتوره شدن DNA، نگهداری اسپرم، اسپرم

**ارجاع:** ناطقیان زهره، دشتی غلامرضا، بقازاده شکوفه، گلشن ایرانپور فرهاد. **اثرات نگهداری نمونه‌ی مایع منی در حرارت ۶–۴ درجه‌ی سانتی‌گراد بر روی حرکت، بقا و دناتوره شدن DNA اسپرم.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۴۰۱): ۱۱۸۶–۱۱۸۱

## مقدمه

DNA اسپرم پستانداران، متراکم‌ترین DNA یوکاریوتیک است و حداقل ٦ بار متراکم‌تر از DNA سلول‌های میتوتیک می‌باشد. به منظور دستیابی به چنین درجه‌ی بالایی از تراکم، پروتئین دیگری به نام پروتامین به جای هیستون به زنجیره‌ی DNA اسپرم باند می‌شود و کروماتین نظم خطی و پهلو به پهلو پیدا می‌کند. این DNA متراکم، می‌تواند در مقابل عوامل شیمیایی و محیطی مقاومت کند (۱). با چنین پیش‌فرضی، به نظر می‌رسد که تخریب هسته‌ی اسپرم نسبت به تخریب غشا و ارگانل‌های اسپرم، می‌تواند به تأخیر بیفتد (۲). در این صورت، ممکن است بازیابی اسپرم از اپیدیدیم، ابزاری قوی برای حفظ مواد ژنتیکی باارزش پس از مرگ جاندار باشد و نیز نگهداری کوتاه مدت اسپرم بدون منجمد کردن، می‌تواند از کاهش تحرک و باروری آن جلوگیری کند (٤–۳). تحقیقات انجام شده در این زمینه با نگهداری اسپرم‌های موجودات مختلف در محیط کشت انجام گرفته است.

Nichi و همکاران نشان دادند که نگهداری کوتاه مدت اپیدیدیم گاو در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد نسبت به دمای ٣٤ درجه‌ی سانتی‌گراد، اسپرم‌های با کیفیت بهتر و با قابلیت لقاح آزمایشگاهی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- کارشناس آزمایشگاه، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
**نویسنده‌ی مسؤول:** فرهاد گلشن ایرانپور
Email: fgolshaniranpour@yahoo.com

بالاتری فراهم می‌کند (۳). An و همکاران، موش‌های مرده را برای دوره‌های زمانی مختلف در یخچال نگهداری کردند و بقای اسپرم‌های ناحیه‌ی اپیدیدیم این موش‌ها را با روش لقاح آزمایشگاهی، کاشت جنین و انتقال جنین بررسی نمودند. ایشان دریافتند که اسپرم‌های موش نر می‌توانند ۲۱ درصد اووسیت‌ها را بعد از ۵ روز نگهداری در دمای ٦-٤ درجه‌ی سانتی‌گراد بارور کنند و نیز اسپرم‌های به دست آمده از نوعی موش هیبرید، ۳۹ درصد اووسیت‌ها را پس از ۷ روز نگهداری در دمای ٦-٤ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌توانند بارور نمایند (۵).

برخی از تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهند که تمامیت کروماتین اسپرم در نمونه‌ی مایع منی با مدت زمان نگهداری آن رابطه دارد که این مدت زمان در اسپرم سگ حداقل ۵ و گاهی تا ۱۵ روز در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بوده است. تحقیقات دیگر بر روی نگهداری مایع منی انسان به مدت ٤٨ ساعت و در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، تغییری در کروماتین را نشان نداده است. به نظر می‌رسد نگهداری اسپرم‌ها در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، می‌تواند باعث حفظ یکپارچگی کروماتین و نیز بهترین کیفیت مایع منی باشد (۸-٦).

در مطالعات پیشین، توجه لازم به خصوصیات منحصر به فرد اسپرم یعنی تراکم کروماتین و نیز توانایی مقاومت اسپرم در مقابل تخریب صورت نگرفته است. همچنین، مطالعه‌ی قبلی پژوهشگران بر روی اسپرم‌های به دست آمده از ناحیه‌ی اپیدیدیم موش در زمان‌های مختلف پس از مرگ جانور، حاکی از مقاومت DNA اسپرم در مقابل دناتوره شدن تا ۱۲ روز پس از مرگ است (۲). از این رو، هدف از این مطالعه بررسی همین مسأله در مورد اسپرم انسان بود. در واقع، چون همواره تخریب غشای سلول معادل مرگ آن تلقی می‌شود، اگر دناتوره شدن هسته‌ی اسپرم نسبت به تخریب غشای آن به تأخیر بیفتد، نشانگر آن است که مرگ سلول اسپرم، می‌تواند معادل مرگ هسته‌ی آن نباشد. در صورت اثبات مقاومت DNA اسپرم در مقابل دناتوره شدن و تخریب، می‌توان اطلاعات ژنتیک را حتی پس از مرگ اسپرم بازیابی کرد و این مسأله در آینده می‌تواند به روش‌های درمان ناباروری و نیز حفظ گونه‌های کمیاب کمک نماید.

## روش‌ها

این مطالعه، یک مطالعه‌ی تجربی بود که بر روی ۱۳ نمونه‌ی مایع منی انجام گرفت. جمعیت مورد مطالعه با استفاده از روش نمونه‌گیری تصادفی ساده از بین مردان (٤٧-١٩ ساله) نورموزواسپرم مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری بیمارستان شهید بهشتی اصفهان در سال ١٣٩٤ انتخاب شدند.

مردان مورد مطالعه حداقل ٤-٣ روز مقاربت نداشتند. نمونه‌های مایع منی در ظروف پلاستیکی استریل و دهان گشادی که از نظر نداشتن اثرات سمی بر روی اسپرم کنترل شده بودند، جمع‌آوری گردید و به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه جهت مایع شدن در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس، نمونه‌ها دو بار با محیط کشت Ham's F10 حاوی آلبومین شسته شدند و پس از آن، در دمای ٦-٤ درجه‌ی سانتی‌گراد (یخچال) به مدت ۱۲ روز نگهداری شدند. طی روزهای صفر (بلافاصله پس از نمونه‌گیری)، ۱، ۲، ۵، ۷ و ۱۲، میزان حرکت، بقا (درصد اسپرم‌های زنده) و نیز آسیب DNA اسپرم‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

روش تعیین میزان حرکت اسپرم‌ها: درصد حرکت اسپرم‌ها به صورت مشاهده‌ی مستقیم و در زیر عدسی ٤٠ میکروسکوپ نوری اندازه‌گیری شد. برای بررسی حرکت اسپرم‌ها، درصد کل اسپرم‌های متحرک (سریع، آهسته، درجا) و غیر متحرک (Immotile) در مجموع شمارش شد.

روش بررسی بقای اسپرم‌ها با رنگ‌آمیزی Eosin-Nigrosin: بقای اسپرم‌های هر گروه با رنگ‌آمیزی Eosin-Nigrosin بررسی گردید (۱۰-۹). به طور خلاصه، Eosin Y (Merck, Germany) ۱ درصد و Nigrosin (Merck, Germany) ۱۰ درصد در آب مقطر آماده شدند. ابتدا، یک حجم از نمونه با دو حجم Eosin مخلوط شد و پس از ۳۰ ثانیه نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، حجم مساوی از Nigrosin به مخلوط ساخته شده (اسپرم و Eosin) اضافه گردید. سپس، گسترده‌های نازکی (اسمیر) از مخلوط تهیه و پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی عدسی شیئی ۱۰۰ تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و نسبت درصد اسپرم‌های زنده محاسبه گردید. با توجه به نفوذ رنگ Eosin به اسپرم‌هایی که غشای آن‌ها صدمه دیده بود، سر اسپرم‌های زنده به رنگ سفید و سر اسپرم‌های مرده به رنگ قرمز مشاهده شدند.

روش بررسی زنجیره‌ی DNA با رنگ‌آمیزی Acridine orange: از رنگ‌آمیزی Acridine orange (Sigma, Germany) برای تشخیص DNA دو رشته‌ای از تک رشته‌ای (دناتوره) استفاده شد (۱۲-۱۱). جهت انجام این نوع رنگ‌آمیزی، ابتدا از نمونه‌ی مایع منی اسمیر خشک تهیه گردید. سپس، اسمیر خشک، حداقل به مدت دو ساعت در محلول کارنوی (۱/۳ متانول اسید استیک) قرار گرفت و بعد از آن، به وسیله‌ی محلول Acridine orange رنگ شد. محلول رنگ‌آمیزی، با اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر محلول استوک (شامل ۱ گرم Acridine orange در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب) به ٤٠ میلی‌لیتر سیتریک اسید ۰/۱ مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر از $Na_2HPO_4.7H_2O$ ۰/۳ مولار به دست آمد. نمونه‌ی به دست آمده، ظرف مدت حداکثر ٢٤ ساعت در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت (۱۱). به طور معمول، برای هر نمونه، سه اسلاید در نظر گرفته شد و در هر اسلاید،

۲۰۰ اسپرم شمرده شد و اسپرم‌های طبیعی با DNA دو رشته‌ای در زیر میکروسکوپ به رنگ سبز دیده شدند و به صورت درصدی محاسبه گردیدند. همچنین، اسپرم‌هایی که دارای DNA تک رشته‌ای (دناتوره) بودند، به رنگ نارنجی تا قرمز در آمدند.

پس از جمع‌آوری نتایج، آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد. آزمون‌های آماری مورد استفاده شامل آزمون تعقیبی Tukey و Repeated measurements ANOVA بودند.

## یافته‌ها

### تعیین تأثیر مدت زمان نگهداری بر درصد کل اسپرم‌های متحرک

بر اساس جدول ۱، هر چه مدت زمان نگهداری نمونه در یخچال افزایش می‌یافت، در درصد کل اسپرم‌های متحرک نیز کاهش دیده می‌شد ($P < ۰/۰۵۰۰$). بعد از ۲ روز نگهداری در یخچال، کاهش درصد کل اسپرم‌های متحرک قابل ملاحظه بود و این روند کاهشی در روزهای آتی نیز ادامه یافت. بدین ترتیب که در روز صفر، حدود ۶۳ درصد از اسپرم‌ها متحرک بودند، اما بعد از ۱۲ روز نگهداری نمونه در دمای یخچال هیچ اسپرم متحرکی وجود نداشت.

**جدول ۱. درصد حرکت کل اسپرم‌ها در روزهای مختلف نگهداری در یخچال**

| زمان بررسی نمونه (روز) | حرکت کل (درصد) (میانگین ± انحراف معیار) |
|---|---|
| ۰ | ۶۳/۸ ± ۱۵/۱ |
| ۱ | ۴۵/۰ ± ۱۲/۰ |
| ۲ | ۲۱/۳ ± ۶/۹ |
| ۵ | ۱۱/۰ ± ۵/۸ |
| ۷ | ۵/۲ ± ۳/۹ |
| ۱۲ | ۰/۰ ± ۰/۰ |
| مقدار P مقایسه‌ی روزهای مختلف با روز صفر | ۰/۰۰۰۱ |

### تعیین تأثیر مدت زمان نگهداری بر بقای اسپرم‌ها

بر اساس جدول ۲، هر چه مدت زمان نگهداری افزایش می‌یافت، درصد اسپرم‌های زنده کاهش داشت ($P < ۰/۰۵۰۰$). بعد از ۲ روز در دمای یخچال کاهش درصد اسپرم زنده قابل ملاحظه بود و این روند کاهشی ادامه پیدا کرد؛ به طوری که در روز صفر، حدود ۷۰ درصد از اسپرم‌ها زنده بودند؛ در حالی که بعد از ۱۲ روز، تنها ۱۱ درصد اسپرم‌ها زنده ماندند.

**جدول ۲. درصد اسپرم‌های زنده در روزهای مختلف نگهداری در یخچال**

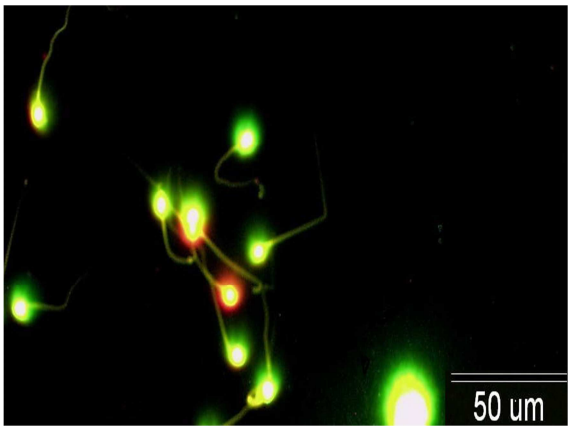
| زمان بررسی نمونه (روز) | بقا (درصد) (میانگین ± انحراف معیار) |
|---|---|
| ۰ | ۷۰ ± ۱۲ |
| ۱ | ۶۲ ± ۱۳ |
| ۲ | ۴۲ ± ۱۵ |
| ۵ | ۳۰ ± ۱۵ |
| ۷ | ۲۳ ± ۱۳ |
| ۱۲ | ۱۱ ± ۷ |
| مقدار P مقایسه‌ی روزهای مختلف با روز صفر | ۰/۰۰۰۱ |

### تعیین تأثیر مدت زمان نگهداری بر تمامیت DNA اسپرم

بر اساس جدول ۳ و شکل ۱، درصد اسپرم‌های با DNA دو رشته‌ای در طول مدت نگهداری در یخچال، تغییر معنی‌داری نکرد. بر این اساس، میزان درصد اسپرم با DNA سالم با مدت زمان نگهداری نمونه رابطه‌ی معنی‌داری نداشت ($P > ۰/۰۵۰۰$).

**جدول ۳. درصد اسپرم‌های با DNA سالم در روزهای مختلف نگهداری در یخچال**

| زمان بررسی نمونه (روز) | DNA سالم (درصد) (میانگین ± انحراف معیار) |
|---|---|
| ۰ | ۹۸/۰ ± ۰/۸ |
| ۱ | ۹۸/۳ ± ۰/۵ |
| ۲ | ۹۷/۷ ± ۰/۵ |
| ۵ | ۹۸/۷ ± ۰/۵ |
| ۷ | ۹۸/۳ ± ۰/۵ |
| ۱۲ | ۹۸/۷ ± ۰/۵ |
| مقدار P مقایسه‌ی روزهای مختلف با روز صفر | ۰/۹۹۹۹ |




**شکل ۱. رنگ‌آمیزی Acridine orange: نمایش اسپرم با DNA سالم دو رشته‌ای به رنگ سبز و DNA دناتوره‌ی تک رشته‌ای به رنگ نارنجی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ ×)**

## بحث

در نهایت پس از مرگ، اسپرم‌های موجود در بدن حیوانات دچار تخریب خواهند شد. ممکن است بازیابی اسپرم از اپیدیدیم تا مدتی پس از مرگ ابزار قدرتمندی برای حفاظت از مواد ژنتیکی با ارزش باشد (۲).

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که نگهداری اپیدیدیم حیوانات مختلف (گوزن قرمز، گراز و قوچ) در دمای ۵-٤ درجه‌ی سانتی‌گراد برای چندین روز، می‌تواند برخی از پارامترهای اسپرمی را حفظ کند (۱۵-۱۳).

Kishikawa و همکاران، اجساد موش‌ها را در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ روز نگهداری کردند و حرکت و بقای اسپرم‌های ناحیه‌ی اپیدیدیم آن‌ها را در روزهای صفر تا ۲۰ نگهداری، بررسی نمودند. این محققین نشان دادند که ۱۰ روز پس از مرگ موش، حدود ۳۰ درصد اسپرم‌های جمع‌آوری شده زنده بودند، اما توانایی آن‌ها در باروری اووسیت‌ها در لقاح آزمایشگاهی محدود شده بود و اگر اسپرم‌ها به داخل اووسیت تزریق شوند، میزان باروری، بالای ۸۰ درصد خواهد بود. ایشان دریافتند که اسپرم‌های غیر متحرک بازیابی شده تا ۲۰ روز پس از مرگ نیز قادر به تولید جنین‌های طبیعی می‌باشند (١٦).

در پژوهش قبلی پژوهشگران، اسپرم‌های ناحیه‌ی اپیدیدیم اجساد موش در دمای ٦-٤ درجه‌ی سانتی‌گراد تا مدت ۱۲ روز بعد از مرگ نگهداری شدند و در روزهای صفر، ۱، ۲، ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۲ مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در مدت ۱۲ روز، میزان بقا و حرکت اسپرم‌ها کاهش یافت، اما تمامیت کروماتین تغییری نکرد (۲). همچنین، نتایج بیانگر کاهش ناگهانی حرکت و بقا در روز سوم بعد از مرگ بود و نشان داد که اگر اسپرم‌های ناحیه‌ی اپیدیدیم موش را نتوان به سرعت جمع‌آوری کرد، میزان حرکت و بقای اسپرم‌ها تا ٤٨ ساعت پس از مرگ بالا می‌باشد و این اسپرم‌ها می‌توانند برای لقاح داخل آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرند (۲). نتایج مطالعه‌ی حاضر، مؤید نتایج مطالعه‌ی قبلی پژوهشگران بر روی موش است.

در مطالعه‌ی حاضر، نمونه‌های مایع منی شسته شده‌ی مردان نورموزواسپرم به مدت ۱۲ روز در یخچال نگهداری شدند. بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، تحرک و زنده ماندن اسپرم‌ها روندی کاهشی در طی مدت ۱۲ روز پس از نمونه‌برداری داشتند و این کاهش، به ویژه پس از ۲ روز نگهداری چشمگیرتر بود. آن چه در این میان جالب به نظر می‌رسید، عدم تغییر معنی‌دار در درصد اسپرم‌های با DNA دو رشته‌ای بود. در روز ۱۲ پس از نمونه‌برداری، ۱۱ درصد اسپرم‌ها هنوز زنده بودند و اسپرم متحرکی وجود نداشت. در حالی که درصد اسپرم‌ها با DNA دو رشته‌ای هنوز هم ۹۸درصد بود.

همان‌طور که اشاره شد، تفاوت زیادی بین کروماتین اسپرم و سلول‌های سوماتیک وجود دارد. DNA اسپرم پستانداران متراکم‌ترین DNA یوکاریوتی است و چنین تراکمی در اثر اتصال پروتامین‌ها به DNA و نظم خطی و پهلو به پهلوی کروماتین اسپرم به وجود می‌آید. نتایج مطالعه‌ی حاضر، بیانگر عدم هم‌زمانی مرگ سلول (تخریب غشای سلول) و تمامیت DNA در اسپرم انسان است. بر اساس نتایج این مطالعه، در حین نگهداری نمونه‌ی مایع منی، هسته‌ی اسپرم می‌تواند در برابر دناتوره شدن مقاومت کند. به طور کلی، مقاومت DNA اسپرم در برابر دناتوره شدن ممکن است به ما در بهبود روش معمول نگهداری اسپرم و پیدا کردن روش‌های جدید برای ذخیره‌سازی اسپرم مانند انجماد برای یک دوره‌ی زمانی طولانی کمک کند.

## تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی طرح ۳۹٤۹٥٤ مصوب معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله از این معاونت به دلیل حمایت مالی سپاسگزاری می‌گردد.

## References

1. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biol Reprod 1991; 44(4): 569-74.
2. Golshan Iranpour F, Rezazadeh Valojerdi M. The epididymal sperm viability, motility and DNA integrity in dead mice maintained at 4-6oC. Iran J Reprod Med 2013; 11(3): 195-200.
3. Nichi M, Goovaerts IG, Cortada CN, Barnabe VH, de Clercq JB, Bols PE. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. Theriogenology 2007; 67(2): 334-40.
4. Kaneko T, Fukumoto K, Haruguchi Y, Kondo T, Machida H, Koga M, et al. Fertilization of C57BL/6 mouse sperm collected from cauda epididymides after preservation or transportation at 4 degrees C using laser-microdissected oocytes. Cryobiology 2009; 59(1): 59-62.
5. An TZ, Wada S, Edashige K, Sakurai T, Kasai M. Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death. Cryobiology 1999; 38(1): 27-34.
6. Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudin E, Stornelli MC, Stornelli MA, de la Sota RL. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. Theriogenology 2006; 66(6-7): 1637-40.

7. Prinosilova P, Rybar R, Zajicova A, Hlavicova J. DNA integrity in fresh, chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. Vet Med - Czech 2012; 57(3): 133-42.
8. Riel JM, Yamauchi Y, Huang TT, Grove J, Ward MA. Short-term storage of human spermatozoa in electrolyte-free medium without freezing maintains sperm chromatin integrity better than cryopreservation. Biol Reprod 2011; 85(3): 536-47.
9. Dougherty KA, Urry RL, Cockett AT. Supravital staining of spermatozoa: relationship of eosin concentration to the percentage of cells staining live. J Urol 1977; 118(6): 1008-9.
10. Eliasson R. Supravital staining of human spermatozoa. Fertil Steril 1977; 28(11): 1257.
11. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. Fertil Steril 1984; 42(1): 87-91.
12. Varghese AC, Bragais FM, Mukhopadhyay D, Kundu S, Pal M, Bhattacharyya AK, et al. Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. Andrologia 2009; 41(4): 207-15.
13. Soler AJ, Perez-Guzman MD, Garde JJ. Storage of red deer epididymides for four days at 5 degrees C: effects on sperm motility, viability, and morphological integrity. J Exp Zool A Comp Exp Biol 2003; 295(2): 188-99.
14. Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, et al. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 degrees C. Theriogenology 1998; 50(4): 615-23.
15. Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, et al. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. Theriogenology 2003; 60(7): 1249-59.
16. Kishikawa H, Tateno H, Yanagimachi R. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4 degrees C. J Reprod Fertil 1999; 116(2): 217-22.

**Journal of Isfahan Medical School**

**Vol. 34, No. 401, 1st Week, December 2016**

Received: 27.07.2016

Accepted: 23.09.2016

# Effects of Keeping Semen Samples in 4-6 ˚C on Sperm Motility, Viability and DNA Denaturation

Zohreh Nateghian[1], Gholam Reza Dashti[2], Shekofeh Baghazadeh[3], Farhad Golshan-Iranpour[4]

**Original Article**

## Abstract

**Background:** Mammalian sperm DNA is the most compacted eukaryotic DNA and this compacted DNA can resist against different environmental and chemical factors. The aim of this study was to assess the effects of keeping washed semen sample in refrigerator (4-6 ˚C) on sperm viability, total motility and DNA integrity in normozoospermic men.

**Methods:** In this experimental study, 13 semen samples of normozoospermic men were washed twice in modified Ham's F10 medium. These samples were kept in refrigerator (4-6 ˚C) up to 12 days. On the 0 (immediately after sampling), 1st, 2nd, 5th, 7th and 12th days, the proportion of viable, motile, double stranded DNA spermatozoa were examined. Viability and DNA integrity of sperm cells were examined consecutively using eosin-nigrosin and acridine orange staining.

**Findings:** The viability and total motility of sperm cells significantly decreased ($P < 0.05$) during 12 days of storage in refrigerator (4-6 ˚C). In contrast with sperm viability and motility, DNA integrity was without significant changes up to 12 days of storage.

**Conclusion:** This study suggests that sperm DNA integrity is preserved even after 12 days of keeping semen sample in refrigerator.

**Keywords:** DNA denaturation, Sperm preservation, Spermatozoa

**Citation:** Nateghian Z, Dashti GR, Baghazadeh S, Golshan-Iranpour F. **Effects of Keeping Semen Samples in 4-6 ˚C on Sperm Motility, Viability and DNA Denaturation.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(401): 1181-6.

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Shahid Beheshti Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
**Corresponding Author:** Farhad Golshan-Iranpour, Email: fgolshaniranpour@yahoo.com