پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی
سال ۱۹، شماره‌های ۳ و ۴، صفحه ۱۸ (مهر-اسفند ۱۳۷۴)

توانایی مهار سوپرناتنت‌های* حاصله از سانتریفوژ نواحی مختلف بربخ (اپی‌دیدیم) موش

دکترامیراسماعیل نژاد مقدم**، دکتر احمد حسینی*** و دکتر مجتبی رضازاده****

خلاصه

مقایسه تاثیر سوپرناتنت‌های نواحی مختلف اپی‌دیدیم، روی تخمکهای تلقیح شده با اسپرمهای ظرفیت یافته (اسپرمهای ناحیه دم اپی‌دیدیم که ۱۲۰ دقیقه پری‌انکوبه شده بودند) انجام گرفت. از ۲۵۷ تخمک تلقیح شده، ۱۹۳ تخمک (۷۴/۵۱ درصد) در حضور سوپرناتنت اسپرمهای ناحیه سر اپی‌دیدیم، بارور شدند؛ در حالی که، درصد باروری در حضور سوپرناتنت‌های نواحی تنه و دم اپی‌دیدیم به طور معنی‌داری کاهش نشانداد: به طوری که از ۲۷۶ تخمک تلقیح شده در حضور سوپرناتنت ناحیه تنه، تنها ۳۲ تخمک (۱۱/۴۹ درصد)، و از ۳۶۲ تخمک تلقیح شده در حضور سوپرناتنت ناحیه دم، ۱۵ تخمک (۴/۱۵ درصد)، بارور شدند. از آنجایی که سوپرناتنت حاصله از اپی‌دیدیم، مشتمل بر ترشحات اپی‌دیدیم، به ویژه ماکرومولکولهائی که برای باروری نقش ممانعت کننده دارند، می‌باشند. لذا از تجربه حاضر این طور استنتاج می‌شود که ممانعت کنندگی سوپرناتنت از ناحیه ابتدایی به طرف انتهای اپی‌دیدیم به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد که احتمالا" بیانگر افزایش غلظت ماکرومولکولهای موجود در اپی‌دیدیم و یا افزایش فعالیت ماکرومولکولهای مزبور می‌باشد. از آنجا که بالا بودن توانایی مهارکنندگی سوپرناتنت حاصله از اسپرمها با بلوغ اسپرمها رابطه مستقیم دارد در نتیجه می‌توان گفت که گروه اسپرمهای بالغ در ناحیه انتهایی به مراتب بیشتر از ناحیه ابتدایی اپی‌دیدیم می‌باشد.

* قسمت شفاف بالای لوله آزمایش، بعد از سانتریفوژ کردن محلول

** عضو هیات علمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

*** استادیار بخش تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

**** استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

اسپرمها پس از ساخته شدن در بیضه به طرف اپی‌دیدیم که سه قسمت اصلی - سر، تنه و دم دارد - می‌رسد و در طول مسیر، درازای آن به حداکثر میزان توانایی باروری می رسند (۱-۵). ناحیه سر اپی‌دیدیم موش دارای دو قسمت ابتدایی و انتهایی می‌باشد (۶). اسپرمهای پستانداران بعد از عبور از سیستم تناسلی نر قابلیت باروری ندارند (۷) و این عدم توانایی به تعدادی عامل مهار کننده بستگی دارد که به سطح اسپرم‌ها می‌چسبند (۸-۱۲). در رابطه با عوامل مهارکننده، که در نهایت از باروری ممانعت می‌کند، تحقیقات متعددی به انجام رسیده است (۸-۱۳).

برداشت عوامل مهارکننده ظرفیت‌پذیر (Capacitation) از سطح غشاء اسپرم که در سیستم تناسلی ماده از طریق ترشحات موکوس گردن و حفره رحمی صورت می‌پذیرد (۱۴-۱۷) در آزمایشگاه توسط شستن و سانتریفوژ کردن و یا ۱۲۰ دقیقه نگهداری در گرمخانه (انکوباتور)، امکان‌پذیر می‌شود (۱۸ و ۱۹).

از سوی دیگر، پژوهشگران برای پی بردن به این مطلب که آیا اسپرمهای بالغ تنها در ناحیه دم اپی‌دیدیم یافت می‌شوند، توانایی باروری اسپرمهای نواحی مختلف اپی‌دیدیم را مورد بررسی قرار داده‌اند (۴، ۵، ۲۰ و ۲۱). به عنوان مثال بلندوا(Blandua) و همکارش در سال ۱۹۶۱ گزارش کردند که اسپرمهای ناحیه سر اپی‌دیدیم موش صحرایی هر چند به میزان پایین (۷/۵ درصد)، دارای قابلیت باروری می‌باشند (۲۰)، و مطالعه منتشر نشده ما روی اسپرمهای اپی‌دیدیم موش نیز نتایج آنان را تائید کرد (۲۱).

در تجربه حاضر، سوپرناتنت حاصله از سانتریفوژ محتویات نواحی مختلف اپی‌دیدیم موش برای تائید یکی از دو فرضیه زیر مورد بررسی قرار گرفت:

۱) پایین بودن میزان باروری اسپرمهای ناحیه سر اپی‌دیدیم، بخاطر کثرت اسپرمهای نـابالغ است؛ و یـا ۲) به خاطر بالا بودن قدرت مهارکنندگی عوامل مزبور در آن نواحی می‌باشد.

مواد و روشها

محیط کشت

در تجربیات ما محلول Ham's F_{10} که ۱۰ درصد سرم آلبومین انسانی به آن اضافه شده بود، به عنوان محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت.

باروری آزمایشگاهی

موشهای ماده بالغ - که بیش از هشت هفته سن دارند- با تزریق داخل صفاقی ۷/۵ واحد H.M.G و بعد از ۴۸ ساعت ۵ واحد hcG، جهت تحریک تخمک‌گذاری آماده شدند. ۱۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، موشها را کشتیم و لوله‌های فالوپ آنها را درون ظرف حاوی محیط کشت قراردادیم. در زیر استریومیکروسکوپ با برش لوله‌های فالوپ، تخمکها جمع‌آوری و بلافاصله درون ظرف حاوی قطرات سوپرناتنت نواحی مختلف اپی‌دیدیم و اسپرمهای ظرفیت‌پذیر، منتقل شدند.

آماده‌سازی سوسپانسیون اسپرم

یک سر موش نر بالغ (بیش از هشت هفته) کشته و ناحیه دم اپی‌دیدیم آن جدا شد و درون ظرفی که حاوی یک میلیلیتر محیط کشت بود، قرار گرفت و بعد از قطعه‌قطعه کردن، جهت ظرفیت‌پذیری اسپرمها، به مدت ۱۲۰ دقیقه در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 نگهداری شد. بعد از مدت مذکور نمونه ۱۰ مرتبه رقیق شد تا غلظتی حدود $۱-۲\times۱۰^{۶}$ اسپرم در میلیلیتر حاصل شود. ۳۰۰ میکرولیتر از این محلول به همراه سوپرناتنت حاصله از نواحی مختلف اپی‌دیدیم با غلظت مشخص، جهت

قطره‌گذاری مهیا شد و تخمکهای آماده در آن قرار گرفت.

آماده‌کردن سوپرناتنت

سه سر موش نر بالغ (بیش از هشت هفته) کشته و از هر یک، یک قسمت از نواحی مختلف اپی‌دیدیم (سر، تنه و دم) جدا و درون ۱ میلیلیتر محیط کشت غوطه‌ور شد. و بعد از قطعه‌قطعه کردن، جهت آزادسازی اسپرمها مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور نگهداری شدند. محلول حاصله به نسبت یک به سه (یک حجم محلول فوق و دو حجم محیط کشت) رقیق و در ۱۱۶۰۰g به مدت ۴ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شد.

به دلیل متفاوت بودن جمعیت اسپرم در نواحی مختلف اپی‌دیدیم و به منظور داشتن غلظت یکسان از ماکرومولکول ممانعت کننده، ۰/۱ میلیلیتر سوپرناتنت حاصله از ناحیه دم، ۰/۲۵ میلیلیتر سوپرناتنت ناحیه تنه و ۰/۵ میلیلیتر سوپرناتنت حاصله از ناحیه سر را با ۳۰۰ میکرولیتر محلول اسپرم از پیش آماده شده، مخلوط و قطره‌هایی در ظرفهای کشت یک بار مصرف - جهت قرار دادن تخمکها در آن - ساخته شد. این تجربه ۱۵ بار تکرارشد. لوله‌های آزمایشی مورد استفاده برای تهیه سوپرناتنت، ۱۵ سی‌سی و ظرفهای کشت مورد استفاده تماما" پلاستیکی ۳۰ میلیمتری بود و قطره‌ها توسط روغن پارافین پوشیده شدند. گاز استفاده شده برای انکوباسیون، ۵ درصد CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بود.

ارزیابی

تخمکهای تلقیح شده بعد از ۵-۶ ساعت انکوباسیون، جهت بررسی عمل باروری توسط استریوسیکروسکوپ مورد ارزیابی قرارگرفتند. ملاك تشخیص باروری، مشاهده پیش هسته‌ها (Pronuclei) بود. تحلیل آماری به روش Paired t-test انجام گرفت.

نتایج

به دنبال تلقیح تخمکها در حضور سوپرناتنت‌های اسپرم نواحی سر، تنه و دم اپی‌دیدیم به ترتیب از ۲۵۷ تخمک، ۶۴ (۳/۴۳ ± ۲۵/۴۹)، از ۲۷۶ تخمک، ۲۴۴ (۱/۳۵ ± ۸۸/۵۱) و از ۳۶۲ تخمک، ۳۴۷ (۰/۷۵ ± ۹۵/۸۵) تخمک مهارشده و باروری صورت نگرفت (جدول ۱).

بحث

وجود فعالیت عوامل مهارکننده باروری در ترشحات کیسه‌های منی‌ساز(Seminal vesicles) گونه‌های مختلف از قبیل خرگوش (۱۲)، گاو، انسان (۲۲)، اسب، میمون (۲۳)، سگ (۲۴)، و در ترشحات اپی‌دیدیم موش (۲۵) تائید شده است. مولر (Muller) در سال ۱۹۸۸ از ترشحات اپی‌دیدیم موش یک پلی‌لاکتوزومین شامل گلیکوپروتئین (PLaE) که باعث مهار باروری می‌شود، را جدا کرد که در اپی‌تلیوم قسمت انتهایی ناحیه سر اپی‌دیدیم موش ساخته می‌شود (۲۶).

Shur و همکارش در سال ۱۹۸۲، گلیکوپروتئینی را که به عنوان یک مانع ظرفیت‌یاب (Dicapacitation) عمل می‌کند در اپی‌دیدیم موش گزارش کردند. این گلیکوپروتئین باعث مهار اتصال اسپرم به کمربند شفاف (Zona Pellucida) اطراف تخمک می‌شود (۲۷). فراسر(Fraser) در سال ۱۹۸۴ نشانداد که سطح اسپرمهای ناحیه دم اپی‌دیدیم موش یک جزء مهارکننده دارد که از واکنش اکروزومی جلوگیری می‌کند. برداشت این جزء از سطح اسپرم که می‌تواند توسط سانتریفوژ در آزمایشگاه انجام شود منجر به افزایش قدرت باروری اسپرم و بالعکس افزودن آن به اسپرم ظرفیت یافته قدرت باروری اسپرم را کاهش می‌دهد

جدول ۱) تاثیر سوپرناتنت حاصله از نواحی مختلف اپی‌دیدیم بر روی باروری تخمکهای تلقیح‌شده با اسپرمهای ظرفیت پذیر

سوپرناتنت حاصله از نواحی مختلف اپی‌دیدیم	تعداد تخمکها			
	بارورنشده	درصد	بارورشده	درصد
سر	۶۴/۲۵۷	۲۵/۴۹ ± ۳/۴۳*	۱۹۳/۲۵۷	۷۴/۵۱ ± ۳/۴۳*
تنه	۲۲۴/۷۶	۸۸/۵۱ ± ۱/۳۵**	۳۲/۲۷۶	۱۱/۴۹ ± ۱/۳۵**
دم	۳۴۷/۳۶۲	۹۵/۸۵ ± ۰/۷۵	۱۵/۳۶۲	۴/۱۵ ± ۰/۷۵

* $P<0/0001$، درمقایسه با دو ناحیه دیگر

** $P=0/0001$، در مقایسه با ناحیه دم

(۱۱). این جزء یک انیونیک پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۴۰۰۰۰ دالتون می‌باشد (۱۴) که خود اسپرمها منبع تولید آن می‌باشند (۱۱).

میزان باروری ۷۴/۵ درصد (۱۹۳/۲۵۷) بعد از افزودن سوپرناتنت ناحیه سر اپی‌دیدیم، بیانگر این مطلب است که احتمالا" عوامل مهارکننده دارای غلظت کم هستند و یا در آن ناحیه فعالیت ضعیفی دارند. و از آنجا که تنها اسپرمهای بالغ اپی‌دیدیمی دارای این گونه مهار کننده‌های فعال هستند (۱۱) می‌توان نتیجه گرفت که ناحیه سر اپی‌دیدیم حاوی تعداد زیادی اسپرمهای نابالغ می‌باشد. افزودن سوپرناتنت نواحی تنه و دم اپی‌دیدیم به ۲۷۶ و ۳۶۲ تخمک تلقیح شده به ترتیب منجر به ۳۲ (۱۱/۴۹ درصد) و ۱۵ (۴/۱۵ درصد) تخمک بارور شدند که این می‌تواند به علت افزایش غلظت و یا فعالیت عوامل مهار کننده در این نواحی باشد.

تحقیقات نشانداده است که بعداز وازکتومی، سپرمهای ناحیه سر اپی‌دیدیم موش توانایی نسبت به اسپرمهای ناحیه دم توانایی باروری بالاتری را نشان می‌دهند؛ و دلیل این مطلب احتمالا" به خاطر آن است که اولا" اسپرم عمر محدودی دارد؛ و ثانیا" با گذشت زمان، عامل مهار کننده دچار خرابی و یا کاهش فعالیت می‌شود (۱۱). از اینرو اسپرمهای ناحیه دم اپی‌دیدیم یا می‌میرند و یا دچار واکنش اکروزومی می‌شوند که دیگر توانایی باروری را نخواهند داشت، اما اسپرمهای نابالغ ناحیه سر اپی‌دیدیم به توسط عامل PLaE بالغ شده (۲۶) و عامل مهار کننده واکنش اکروزومی را می‌سازد (۱۴) و ویژگی یک اسپرم بالغ در نمونه‌های غیروازکتومی را کسب می‌کند. از آنجا که در افراد قطع نخاعی هیچ تحریکی جهت انزال (Ejaculation) وجود ندارد، اسپرمهای ناحیه دم اپی دیدیم دچار خرابی و یا مرگ ومیر

فراوانی می‌شوند و توصیه می‌شود در درمان IUI و یا IVF برای این‌گونه افراد که گرفتن نمونه به روش الکتریکی (Electro Ejaculation) صورت می‌گیرد، قبل از درمان، از بیمار دو الی سه مرتبه - به فاصله سه روز- نمونه گرفته شود تا بتوان در روز نهایی اسپرمهای بالغ بیشتری به دست آورد.

تشکر

این تحقیق در بخش علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس با همکاری مرکز درمان نازایی رویان تهران انجام شد. از آقای دکتر کاظمی، مدیر عامل و آقای علیزاده، مدیر داخلی مرکز، به خاطر زحمات بی‌دریغشان سپاسگزاریم.

مراجع

1) Cooper TG: In defense of a function for the human epididymis. Ferti Steril 1990; 54:965-75.
2) Orgebin - Christ MC: Sperm maturation in rabbit epididymis. Nature 1967;216:816-8.
3) Idem: Studies on the functin epididymis. Biol Reprod 1969;1:155-75.
4) Belford JM: Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. J Exp Zool 1966;163:319.
5) Horan Ah & Bedford JM: Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the syrian hamster. J Reprod Fert 1972;30:417-23.
6) Jones R,et al: Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductoli efferents and ducts epididymis of the adult male rabbit. Am J Anat 1979;156:373-400.
7) Austin CR: Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust J Sci Res B 1951;4:581-96.
8) Oliphant G and Brakett BG: Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strength and reversible decapacitation with epididymal extracts. Fert Steril 1973; 24(12):948-55.
9) Eng LA & Oliphant G: Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. Biol Reprod 1978; 19:1083-94.
10) Reddy JM, Stark RA & Zaneveld LJD: A high molecular weight antifertility factor from human seminal plasma. J Reprod Fert 1979;57:437-46.
11) Fraser LR: Mouse sperm capacitation in vitro involves loss of a surface - associated inhibitory component. J Reprod Fert 1984;72:373-84.
12) Chang MC: A detrimental effect of rabbit seminal plasma on the fertilizing ability of sperm. Nature 1957;179:258-9.
13) Hui - Ling Han: Inhibition of the human sperm acrosome reaction by a high molecular weight factor from human seminal plasma. Fert Steril 1990; 54(6).
14) Fraser LR , Harrison RAP & Herod JE: Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. J Reprod Fert 1990;89:135-48.
15) Fraser LR: Requirements for successful mammalian sperm capacitation and fertilization. Arch Pathol Lab Med Vol 116,1992.
16) Fraser LR: Mechanism controlling mammalian fertilization. In: Clarke J(ed): Oxford Reviews of Reproductive Biology, Vol 6. Oxford University Press, 1984,p174.
17) Yanagimachi R: Mechanisms of fertilization in mammals. In: Mastroianni L, Bigger JD, Salder WA (eds): Fertilization and Embryonic Development in vitro. New York, plenum Press, 1981, p81.
18) Fitz Gerald Scott LA: In vitro fertilization. Technology and Methods. Reprod Med 1992. Vol. 12, No.3.
19) Fraser LR: Mouse sperm capacitation assessed

by kineticts and morphology of fertilization in vitro. J Reprod Fert 1983a;69:419-28.

20) Blandau RL & Ruth E Rumarry: Fertilizing capacity of rat spermatozoa recovered from various segments of the epididymis. Anat Rec 1961;139:209.

21) Moghaddam AEN: Comparison of the fertilizing of mouse sperm from different epididymal regions before after washing. (unpublished),1994.

22) Pinsker MC & Williams WL: Spermatozoan dicapacitation factor in human semen. Proc Soc Exp Biol Med 1968;129:466.

23) Dukelow WR & Chernoff HN: Primate sperm survival and capacitation in a foreign uterine environment. Amer J Physical 1969;216:682.

24) Thiman W: Presence of decapacitation factor in dog semen. Unpublished data cited by Williams WL In: Biology of Mammalian fertilization and Implantation. Moghissi KS and Hafez ESE (eds.) Thomas, Springfield, III, 1972.

25) Iwamatsu T & Chang MC: Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro. J Reprod Fert 1971; 26:147-208.

26) Muller CH: Mouse sperm fertilizing ability is modified by an epididymal polylactozamine-containing glycoprotein. Biol Reprod 1988; 38(1):143.

27) Shur BD & Hall G: Sperm surface galactosyl - transferase activities during in vitro capacitation. J Cell Biol 1982; 95: 567-73.

Inhibitory capacity of supernatants obtained from centrifuging of different epididymal mouse regions

Esmaeil Nejad A , Moghaddam A , Hosseini A , Rezazadeh M

Royan institute of IVF-ET and the university of Tarbiat Moddarres, Tehran, I.R.IRAN

SUMMARY

This study was conducted to shed light on to the factors contributing to fertilizing ability of the caput epididymal spermatozoa. In this content, it should be stated that seminal plasma and epididymal fluid of most mammalians contains inhibitory factors connected to spermatozoa surface. To do this, components of different regions of mouse epididymis centrifuged and a given volume of supernatants was added to capacitated (120 min preincubated) sperm. The eggs obtained from mature mice were inseminated in the presence of the supernatants. The eggs were studied after 5 to 6 hour of incubation to observe the presence of pronuclei.

Of the inseminated eggs (257)in the presence of caput supernatants only 25.49% (64) did not fertilize while the rate for the eggs inseminated in the presence of corpus (276) and cauda (362) ones, increased to 88.51%(244) and 95.85%(347), respectively.

On the basis of the results it could be concluded that proportion of immature spermatozoa in the caput epididymal region is considerably greater than those of the other two.

Additionally, the smaller capability of cauda epididymal spermatozoa to fertilize eggs, after vasectomy, could be refered to destruction of inhibitory factors, occurance of acrosome reaction due to long stop in the region.