بررسی اثر اینوزیتـول در جدا شدن قطره پروتوپلاسمی و الگوی حرکتی اسپرم دم اپیدیدیم گاومیش رودخانه‌ای

امیرعلی کاوه[1*]، پرویز تاجیک[2]، حمید قاسم‌زاده نوا[2]، کیوان عبدی[3]، پژمان میرشکرایی[4]

۱. دانش‌آموخته مامائی و بیماری‌های تولیدمثل دامپزشکی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲ .گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران
٤. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
* *نویسنده مسئول مکاتبات: dr.a.kaveh@gmail.com*
(دریافت مقاله: ۸۷/۸/۸ ، **پذیرش نهایی:** ۸۷/۱۰/۳۰)

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر اینوزیتول با غلظت ۱ نرمال بر جدا شدن قطره پروتوپلاسـمی و الگـوی حرکتـی اسـپرم‌هـای دم اپیدیـدیم گـاومیش رودخانه‌ای می‌باشد. بدین منظور، با مراجعه به کشتارگاه صنعتی ارومیه، از ماه فروردین تا ماه شهریور ۱۳۸٦، ۵۰ جفـت بیـضه از گـاومیش‌هـای نـر بـالغ بلافاصله بعد از کشتار جمع‌آوری و در مجاورت یخ ٤ درجه سانتی‌گراد در عرض نیم ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس اسپرم‌های ناحیه دم اپیدیـدیم با چند برش در ناحیه فاقد رگ‌های خونی جمع‌آوری و به محیط Hams F10 با pH نرمال اسپرم (٦/٧ الی٧/٤) در انکوباتور Co2 و به‌همراه ۱۰٪ سـرم جنین گاو منتقل و پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اینوزیتول با غلظت ۱ نرمال به اپندورف‌های حاوی اسپرم اضافه گردید. سپس در دقایق ۱۵، ۳۰، ٤۵، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲٤۰ و۳٦۰ از نمونه‌های فوق لام‌هایی با رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین تهیّه و هم‌زمـان بـا نـرم‌افـزار CASA جهت ارزیابی الگوهای حرکتی بررسی گردید. لام‌های رنگ‌آمیزی شده از نظر تعداد اسـپرم‌هـای زنـده و مـرده و اسـپرم‌هـای دارای قطـره و فاقـد قطـره پروتوپلاسمی پروگزیمال و دیستال شمارش گردید. داده‌های به‌دست آمده از نرم افزار CASA با آزمون تی (*t*-Test) آنالیز گردیـد. نتـایج نـشان داد کـه اینوزیتول ۱ نرمال تاثیر معنی‌دار در الگوهای حرکتی اسپرم‌ها نداشته امّا در زمان‌های ۳۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲٤۰ باعـث افـزایش معنـی‌دار (*p*<۰/۰۵) در تعـداد اسپرم‌های زنده فاقد قطره پروتوپلاسمی می‌گردد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۷، دوره ۲، شماره ۲، ۱٦۳-۱۵۳.
کلمات کلیدی: اسپرم، قطره پروتوپلاسمی، اینوزیتول، گاومیش رودخانه‌ای

مقدمه

باقی‌ماندهٔ سیتوپلاسم اسـپرماتید کـه در پایـان اسـپرماتوژنز باقی می‌ماند و در طی عبور اسپرماتوزوئیدها از اپیدیدیم و بلوغ نهایی آن‌ها جذب می‌شـود، قطـرات پروتـو پلاسـمیک نامیـده مـی‌شـوند. وجـود اسـپرم‌هـایی بـا قطـرات پروتوپلاسـمیک نشان‌دهندهٔ این است که بلـوغ اپیدیـدمی بـه‌طـور کامـل انجـام

نگرفته است. بیش از ۸۰٪ اسپرماتوزوئیدهای موجود در اپیدیدیم به‌ویژه در قسمت دم آن واجد قطره پروتوپلاسمی است حال آن‌که بیش از ۹۰٪ از اسپرم‌های انزالی پستانداران فاقد آن است (۱، ۲ و ۳). اسپرم‌های با قطرات پروتوپلاسمیک نزدیک سر نابالغ‌تر از آن‌هایی هستند که قطرات پروتوپلاسمیک انتهایی دارند. اگرچه اخیراً در این مورد بحث زیادی وجود دارد که قطرات پروتوپلاسمیک نزدیک به سر(Proximal droplet) از عوارضی هستند که در زمان تشکیل اسپرماتوزوئیدها (ناهنجاری‌های اولیه اسپرم) به‌وجود می‌آیند. قطرات پروتوپلاسمی اغلب در منی حیوانات نری که بیش از حد جفت‌گیری می‌کنند، دیده می‌شود. در استفادهٔ بیش از حد از حیوان نر نه تنها تعداد اسپرم‌های منی کاهش می‌یابد، بلکه به‌دلیل عبور سریع اسپرم‌ها از اپیدیدیم اغلب آن‌ها از نظر عملکرد نابالغ خواهند بود و در نتیجه، باروری چنین حیواناتی به‌طور غیرعادی کاهش می‌یابد (۱، ۲ و ۳).

تحرک اسپرم نیز یکی از فاکتورهای بسیار مهم در ارزیابی کیفیت منی و میزان توانایی باروری در حیوان نر است. چرا که برای انتقال اسپرم در طول مجرای تناسلی ماده و به‌ویژه نفوذ آن به داخل تخمک به‌منظور لقاح و باروری، تحرک اسپرم یک عامل ضروری و اساسی است (۲ و ۳).

در طی تحقیقاتی که طی سالهای اخیر انجام شده است، اغلب سعی بر آن بوده که با شناسایی عوامل مؤثر در الگوی تحرک اسپرماتوزوئیدها، به‌منظور افزایش توانایی باروری اسپرم‌ها گام‌های مؤثری برداشته شود (۲۸). تحقیقات مختلف نشان داده است که اسپرم‌ها در طی عبور از قسمت اپیدیدیم، قطرهٔ پروتوپلاسمی خود را از دست داده و به بلوغ کامل می‌رسند (۵ و ۱۸) برخی نیز عقیده دارند که ترشحات غدد ضمیمه دستگاه تناسلی باعث کنده شدن قطرات پروتوپلاسمی می‌شوند. اینوزیتول یکی از مواد موجود در ترشّحات غدد وزیکولی است (۲).

هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر اینوزیتول در محیط Hams F10، در زمان‌های مختلف، در کنده شدن قطرات پروتوپلاسمی اسپرم‌های اخذ شده از قسمت دم اپیدیدیم بیضه گاومیش رودخانه‌ای با توجه به مطالعه الگوی حرکتی اسپرم‌ها می‌باشد. تا کنون مطالعه‌ای در مورد نقش مواد موجود در ترشّحات غدد وزیکولی بر روی قطرات پروتوپلاسمی اسپرم اپیدیدمی و الگوی حرکتی آن‌ها در محیط آزمایشگاهی Hams F10 صورت نگرفته است و هنوز مشخص نیست که آیا اینوزیتول در زمان‌های مختلف می‌تواند باعث جدا شدن قطرات پروتوپلاسمی اسپرم‌ها شود یا خیر؟

مواد و روش‌کار

به‌منظور تهیّه نمونهٔ اسپرم اپیدیدمی، از ماه فروردین تا ماه شهریور سال ۱۳۸٦، هر شب با مراجعه به کشتارگاه اورمیه، ابتدا سلامت گاومیش‌های نر کشتاری از لحاظ بالینی بررسی و در صورت تأیید سلامتی به لحاظ بالینی، تعداد ۵۰ جفت بیضه بلافاصله بعد از کشتار جمع‌آوری و در فلاسک حاوی Ice pack در عرض نیم ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید.

طبق مطالعات Kaabi و همکاران در سال ۲۰۰۳، بهترین کیفیت اسپرم اپیدیدیمی از اپیدیدم‌هایی که در کنار یخ (۵ درجه سانتی‌گراد) حمل می‌شوند در مقایسه با آن‌هایی که در دمای محیط (۲٤ درجه سانتی‌گراد) منتقل می‌شوند، حاصل می‌گردد (۱۹). پس از خارج کردن اپیدیدیم از داخل تونیکا آلبوژنیه و قطع بافت‌های زاید، قسمت دم اپیدیدیم با سرم فیزیولوژی ۳۷ درجه سانتی‌گراد استریل شسته و با گاز استریل خشک می‌گردید. سپس با تیغ بیستوری نمره ۲۱، شکافی در قسمت فاقد عروق ایجاد گردیده و با فشار بر دم اپیدیدم یک قطره مایع سرشار از اسپرم به داخل پلیت حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط Hams F10 ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل می‌شد. به‌منظور جلوگیری از شناور شدن نمونه‌ها به میکروتیوب منتقل و با دور ۸۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و جهت ارزیابی اسپرم‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفتند.

در مرحله اول، رقت ۱۰۰ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر محیط Hams F10 تهیّه گردید. برای تهیّه رقت ۱۰۰ میلیون اسپرم، پس از حل کردن اسپرم استحصالی از اپیدیدیم در ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت و پاساژ آن در رقت‌های۱/۲، ۱/٤ و ۱/۸، اسپرم محتوی هر رقت با استفاده از لام نئوبار شمارش می‌گردید که معمولاً در رقت ۱/٤ غلظت اسپرم مورد نظر (۱۰۰میلیون در میلی‌لیتر) به‌دست می آمد. نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی ائوزین ـ نیگروزین بررسی شده و بعد از اضافه کردن ۰/۵ میلی‌لیتر محلول اینوزیتول ۱ نرمال، در زمان‌های ۱۵، ۳۰، ٤۵، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲٤۰ و ۳٦۰ دقیقه از هر نمونه مجدداً لام تهیّه کردند. لام‌های تهیّه شده از نظر میزان درصد اسپرم‌های زندهٔ واجد قطره پروتوپلاسمی، اسپرم‌های زندهٔ فاقد قطره پروتوپلاسمی، اسپرم‌های مردهٔ واجد قطره پروتوپلاسمی و اسپرم‌های مرده فاقد قطره پروتوپلاسمی بررسی می‌شد. ضمناً موقعیّت قرارگیری قطرهٔ پروتوپلاسمی(distal - proximal) نیز در اسپرم‌ها مشخص می‌شد. در مرحله بعدی در همان زمان‌ها الگوی حرکتی نمونه‌ها توسط دستگاه CASA ارزیابی شده و هر آزمایش ٦ بار تکرار می‌گردید. سیستم CASA شامل یک دوربین متصل به یک میکروسکوپ است که تصاویر موجود در زمینه انتخاب شده را با بزرگ‌نمایی ۱۰ به کامپیوتر منتقل می‌کند و نرم‌افزار با استفاده از تصاویر دیجیتالی ثبت شده از تحرک اسپرم‌ها، پارامترهایی را محاسبه می نماید که شامل موارد زیر است:

Class A: درصد اسپرم‌های متحرک با سرعت بالا (حرکت سریع)

Class B: درصد اسپرم‌های متحرک با سرعت پائین (حرکت آهسته)

Class C: درصد اسپرم‌هایی که حرکت در جا دارند.

Class D: درصد اسپرم‌های ساکن

Class A+B: مجموع درصدهای class A و class B

Class A+B+C (Live Ratio): مجموع درصدها C و B و Class A

VSL (Straight Line Velocity): میانگین سرعت اسپرم در یک خط مستقیم برحسب میکرومتر بر ثانیه

VCL (Curvilinear Velocity): میانگین سرعت اسپرم مسیر واقعی (به‌صورت منحنی) بر حسب میکرومتر برثانیه

VAP (Average Path Velocity): میانگین سرعت اسپرم در میانگین مسیر واقعی برحسب میکرومتر بر ثانیه

BCF (Beat Cross Frequency): فرکانسی که در آن سر اسپرم مسیر میانگین حرکت اسپرم (VAP) را قطع می‌کند، بر حسب هرتز

ALH (Amplitude of Lateral Head displacement): دامنهٔ حرکت سر اسپرم به‌طور جانبی بر حسب میکرومتر

MAP (Mean Angle Degree): مجموعه زوایایی که مسیر واقعی، میانگین مسیر واقعی را قطع می‌کند (در واقع VCL، VAP را قطع می‌کند)

LIN (Linearity): مشخص می‌کند که چقدر مسیر حرکت اسپرم واقعی به خط مستقیم نزدیک است (VSL/VCI)

STR (Straightness): مشخص می‌کند که چقدر مسیر حرکت اسپرم در میانگین مسیر واقعی به خط مستقیم نزدیک است (VSL/VAP)

WOB (Wobble) VAP/VCL

داده‌های به‌دست آمده از سیستم نرم‌افزاری CASA به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شده و توسط آزمون آماری تی (*t*-Test) به‌طور جداگانه در ساعات ۰، ۳۰، ٤۵، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲٤۰ و ۳٦۰ مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

نتایج این تحقیق نشان داد که اینوزیتول درزمان‌های ۱۵، ۳۰، ٤۵، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲٤۰ و ۳٦۰ دقیقه بعد از شروع

آزمایش بر روی درصد اسپرم‌های متحرک با حرکت سرعت پائین (Class B) و بر روی درصد اسپرم‌هایی که حرکت درجا دارند (Class C) و همچنین بر روی مجموع درصدهای Class A و Class B (Class A+Class B) در زمان‌های یاد شده تأثیر معنی‌داری ندارد. نتایج نشان می‌دهد که اینوزیتول در زمان ۱۲۰ دقیقه بعد از شروع آزمایش بر روی مجموع درصد اسپرم‌های زنده (Class A+Class B+Class C) دارای تأثیر معنی‌داری می‌باشد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۱). ارزیابی نتایج به‌دست آمده نشانگر آن است که اینوزیتول بر روی فاکتورهای VSL، VCL، VAP، BCF، ALH، MAP، LIN، WOB، STR تأثیرات معنی‌داری نداشته است ولی اینوزیتول در زمان ۱۲۰ دقیقه پس از شروع آزمایش به‌صورت معنی‌داری بر روی درصد اسپرم‌های زنده دارای قطره پروتوپلاسمی پروگزیمال تأثیر داشته به‌طوری‌که باعث کاهش آن شده است ($p<۰/۰۵$) (جدول۲). نتایج جدول ۳ نشان‌دهنده آن است که اینوزیتول در زمان ۳۰ دقیقه پس از شروع آزمایش، کاهش معنی‌داری را در درصد اسپرم‌های زنده با قطره (Class A) و بر روی درصد اسپرم‌های متحرک با سرعت پروتوپلاسمی دیستال سبب می‌شود. همچنین در زمان‌های ۳۰ و۲٤۰ دقیقه پس از شروع آزمایش تفاوت معنی‌داری در مجموع میزان اسپرم‌های زنده قطره‌دار (P+D) دیده می‌شود و نیز نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که اینوزیتول در زمان ۱۸۰ دقیقه پس از شروع آزمایش باعث افزایش معنی‌دار در میزان درصد اسپرم‌های زنده بدون قطره پروتوپلاسمی شده است (جدول ٤). نتایج به‌دست آمده از درصد کل اسپرم‌های مرده و درصد اسپرم‌های مرده دارای قطره پروتوپلاسمی پروگزیمال و درصد اسپرم‌های مرده بدون قطره پروتوپلاسمی، نشانگر آن است که اینوزیتول دارای تأثیر معنی‌داری نبوده ولی نتایج حاصل نشان می‌دهند که اینوزیتول در زمان‌های ۱۲۰ دقیقه پس از شروع آزمایش باعث افزایش معنی‌دار بر روی درصد اسپرم‌های مرده واجد قطره پروتوپلاسمی پروگزیمال و دیستال شده است (جدول۵).

جدول ۱- تأثیر اینوزیتول روی درصد اسپرم‌های زنده یا مجموع درصدهای Class A + Class B + Class C

زمان (دقیقه) / گروه	۰	۱۵	۳۰	٤۵	٦۰	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤۰	۳٦۰
کنترل	۸۹/٦±۲/۲	۸٦/۹±٤/۲	۸۷/۳±۲/۵	۸۵/۹±۰/۹	۹۰/۹±۰/۸	۸۸/٤±۲/۷	۸٦/۹±۱/٤	۸٤/۵±۱/۹	۸۰/۸ ± ٤/۹	۷٦±۳/٦
اینوزیتول	۷۷/۲±٤/۷	۸۹/۲±۱/۵	۸٤/۹±۳/۷	۸۷/۵۲±۰/۸	۸۷/۵±٤/۱	۸۵/۱±۲/۸	۸۸/۹ ±۲/۲	۹۱/۷ ±۱/۲*	۸۲/ ۲±۲/۱	۷۷/۲ ±۲/۸

*: $p<۰/۰۵$

جدول ۲- تأثیر اینوزیتول روی درصد اسپرم‌های زنده با قطره پروتوپلاسمی پروگزیمال

زمان (دقیقه) / گروه	۳۰	٦۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤۰	۳٦۰
کنترل	۱/۷±۰/٤	٤±۱/۲	۷/٤±۰/٤	۲/٤±۱/۳	٤/٤±۰/۹	۷/۷±۳/٦
اینوزیتول	۲/۷±۱/۵	۲/٤±۰/۹	۲/۷±۰/۹*	۳/۷±۱/۳	۲±۱/۲	۳/٤±۱/۹

*: $p<۰/۰۵$

جدول ۳- تأثیر اینوزیتول روی درصد اسپرم‌های زنده با قطره پروتو پلاسمی دیستال

زمان (دقیقه) / گروه	۳۰	٦۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤۰	۳٦۰
کنترل	۳۳/٤±٦/۷	۳٦±٦/۷	۳۹/۷±۲/۷	۳۷±٥/۳	٤٤/۷±۲/۷	۳۲/٤±۱۱
اینوزیتول	۱٤± ۳/۸ *	۲۲±۸/۱	۲۹/۷±۹/۹	۲٥±٦/۳	۳۰/۷±۲/۸	۲۸/٤±٥/٤

*: $p<۰/۰٥$

جدول ٤- تأثیر اینوزیتول بر روی درصد اسپرم‌های زنده بدون قطره پروتوپلاسمی

زمان (دقیقه) / گروه	۳۰	٦۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤۰	۳٦۰
کنترل	۳٦±٥	۳٤±۷/۷	۳٤/۷±۱/۸	۲۹/۷± ۳/۷	۳۲±۲/٦	۳۰/۷±٦/٤
اینوزیتول	٤٤/۷±٤/۷	٤٥±۱/٤	۳۹/۷±٥/۳	٤٥± ۳/۳ *	٤۱/۷ ±٦	٤۸ ± ٥

*: $p<۰/۰٥$

جدول٥- تأثیر اینوزیتول بر روی درصد اسپرم‌های مرده قطره دار (P+D)

زمان (دقیقه) / گروه	۳۰	٦۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤۰	۳٦۰
کنترل	۱۲±۱	۱۲±۲/۱	۷/٤±٤	۱٦/۷±٥/۳	۷±۱/۲	۱٥/۷±٤/٤
اینوزیتول	۱٥/۷±٥	۱٦±٦/٦	۱۹/٤±٥/۳*	۱٦/٤±٥/۸	۱۳/٤±۱/۳	۱۱/٤±۱/۹

*: $p<۰/۰٥$

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از پارامترهای مهم برای ارزیابی کیفیت منی و بررسی میزان توانایی باروری حیوان نر تحرک اسپرم است چرا که برای نفوذ اسپرم به‌داخل تخمک جهت لقاح و باروری عامل تحرک اسپرم ضروری است (۲۸). به‌طور کلی عقیده بر آن است که تحرک اسپرم یکی از شاخص‌های ضروری جهت نشان دادن توانایی انجام عمل لقاح، زنده بودن و طبیعی بودن سایر ساختارهای اسپرم می‌باشد (۲۰).

Amann (۲۰۰۰) و Auger (۱۹۹۳) نشان داده‌اند که میزان باروری تخمک انسان و سایر حیوانات در آزمایشگاه ارتباط معنی‌داری با تحرک اسپرم دارد (٦ و ۷). در موش‌های صحرایی

ارتباط مؤثر و مثبتی بین میزان سرعت در خط مستقیم اسپرم‌ها و میزان لقاح در IVF گزارش شده است (۲٦). در خوک نر سرعت در خط مستقیم اسپرم‌ها ارتباط معنی‌داری با تعداد توله‌های به‌دنیا آمده در آبستنی‌ها داشته است (۱٦).

در مطالعاتی که توسط Loram (۲۰۰۳) و Leidl (۱۹۹۳) و Thundathil (۲۰۰۱) برروی اسپرم انسان صورت گرفته است، اختلاف سرعت در خط مستقیم اسپرم‌ها در مردان بارور و آن‌هائی‌که دچار ناباروری بودند. به‌وضوح نشان داده شده است (۲٤، ۲٦ و ۳۲) اگرچه سیستم CASA دارای معیارهای ارزیابی مختلفی برای کیفیت منی می‌باشد، اما هنوز در مورد توانایی این سیستم در پیشگویی باروری اسپرم‌ها، جای سؤال وجود دارد. البته اغلب مطالعات نشان‌دهنده این هستند که بین معیارهای ارزیابی این سیستم و باروری منی ارتباط مثبت زیادی وجود دارد و به ندرت عکس این موضوع گزارش شده است (۱٤ و ۱۵). در مورد گاو نر تفاوت‌های فردی زیادی در تحرک اسپرم‌ها و شاخصهای حرکتی اسپرم‌ها وجود دارد اما با این حال بین میزان تحرک و شاخص های حرکت اسپرم‌ها با میزان باروری گاوهای نر ارتباط معنی‌داری دیده شده است. در مطالعه‌ای بین الگوی حرکتی اسپرم‌ها و عدم بازگشت به فحلی در تلیسه‌ها بعد از ۵۹ روز از زمان تلقیح، ارتباط معنی‌داری دیده شده است (۱۳). با وجودی‌که بعضی از شاخص‌های حرکت اسپرم برای ورود به‌داخل تخمک و باروری آن مهم هستند (٤)، اما هنوز کاملاً معلوم نشده است که کدام‌یک از این شاخص‌های الگوی حرکتی که توسط سیستم CASA ارزیابی می‌شوند، دارای ارزش بالینی موثرتری برای پیش‌گویی میزان لقاح و باروری هستند. در یک گزارشی توسط Holt و همکاران (۱۹۹٤)، گفته شده است که سرعت در خط منحنی اسپرم انزالی، به‌طور مؤثر و قوی با میزان لقاح آزمایشگاهی در ارتباط می‌باشد (۱۷). Chan و همکاران (۱۹۹۰) نیز گزارش کرده‌اند که دامنه حرکت جانبی سر اسپرم‌های متحرک که با روش Swim up جدا شده بودند، با میزان موفقیّت در لقاح آزمایشگاهی ارتباط معنی‌داری داشته است. همچنین Chan و همکارانش (۹) گزارش‌نموده اند که سرعت در خط منحنی اسپرم‌های جداسازی شده عامل مهم موفقیّت در لقاح آزمایشگاهی است امّا دامنه حرکت جانبی سر اسپرم اثر مهمی در میزان لقاح یا افزایش درصد آبستنی ندارد. در مطالعه حاضر با افزودن اینوزیتول تفاوت معنی‌داری در میزان سرعت در خط منحنی اسپرم‌ها (VCL) و دامنه حرکت جانبی سر(ALH) در زمان‌های مورد مطالعه دیده نشد. به‌عبارتی می‌توان گفت که افزودن اینوزیتول با اینکه سبب افزایش معنی‌دار در فاکتورهای یاد شده نگشته است اما از طرفی، سبب کاهش آن‌ها نیز نشده و تأثیر منفی درحرکت اسپرم‌های اپیدیدیمی نیز نداشته است. گزارش شده است که حرکت بیش فعال در اسپرم چندین گونه از پستانداران با استفاده از محیط دارای کلسیم در حد میلی‌مولار القاء شده است (۸). در برخی مطالعات مستقیم بودن حرکت (LIN) در الگوی حرکتی اسپرم‌ها با باروری ارتباط داشته است (۳۰) چرا که خطی بودن مسیر حرکت اسپرم، نسبت سرعت در خط مستقیم به سرعت در خط منحنی است و با باروری ارتباط دارد و اسپرم‌هائی‌که نسبت سرعت در خط مستقیم, به سرعت در خط منحنی بالایی دارند ظاهراً کم بارور هستند. سرعت در خط مستقیم و متوسط سرعت مسیر در پیشگویی باروری دام اهمیّت دارد و این امر احتمالاً دلیل بر اهمیّت ظرفیت‌پذیری اسپرم است.

در این تحقیق افزودن اینوزیتول در زمان‌های یاد شده تأثیری در افزایش میزان سرعت درخط مستقیم (VSL) اسپرم‌ها نداشت و به‌طورکلی با گذشت زمان بعد از ۹۰ دقیقه میزان VSL کاهش یافت که در نمونه‌های شاهد نیز، چنین الگویی دیده می‌شد. به‌نظر می‌رسد با گذشت زمان و افزایش مصرف منابع انرژی توسط اسپرم‌ها سرعت در خط مستقیم کاهش یافته و اینوزیتول به‌عنوان یک قند و منبع تأمین انرژی نتوانسته است مورد استفاده اسپرم‌ها قرار گیرد.

اسپرم گاوهای نری که قدرت باروری بالایی دارند (With Superior Fertility)، تحرک بیشتری داشته و از نظر میزان اسپرم‌های زنده، سرعت در خط مستقیم و اختلالات مورفولوژیک کمتر و قابلیت بیشتر در Swim up و میزان نفوذ بیشتر در ترشحات مخاطی سرویکس با اسپرم سایر گاوهای نر متفاوت است و محقّقین زیادی ارتباط معنی‌دار بین شاخص‌های الگوی حرکتی اسپرم و قابلیت باروری اسپرم گاو نر را گزارش نموده‌اند (۱۸). در تحقیق صورت گرفته توسط Cox و همکاران بر روی الگوی حرکتی اسپرم بز و ارتباط آن با نفوذ و حرکت در داخل موکوس سرویکس نشان داده شده است که بین سرعت در خط منحنی و متوسط سرعت مسیر با قابلیت نفوذ در موکوس سرویکس بز ارتباط معنی‌داری وجود دارد و نتیجه‌گیری شده است که شاخص‌های به‌دست آمده در بررسی الگوی حرکتی توسط CASA می‌توانند توانایی اسپرم در رسیدن به محل اتصال اویدوکت (Uterotubal junction) به رحم و پس از آن لقاح تخمک را پیش‌گویی کنند (۱۱). Lauram و همکاران (۲۰۰۰) با مطالعه روی اسپرم بوقلمون مشاهده کردند که اسپرم‌هایی که دارای تحرک بالاتری هستند، میزان سرعت در خط مستقیم بیشتری نیز دارند که این امر نشان‌دهنده توانایی کافی این اسپرم‌ها جهت عبور از مجرای تناسلی ماده و رسیدن به محل لقاح می‌باشد (۲۳).

در بررسی حاضر افزودن اینوزیتول تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمار در زمان‌های یاد شده در میزان اسپرم‌های زنده دارای حرکت سریع (Class A) و اسپرم‌های دارای حرکت آهسته (Class B) و اسپرم‌های دارای حرکت درجا (Class C) ایجاد نکرد. میزان اسپرم‌های دارای حرکت سریع مشابه الگوی گروه شاهد با گذشت زمان کاهش یافت که این امر با کاهش ذخایر انرژی جهت حرکت اسپرم‌ها منطقی به‌نظر می‌رسد. همچنین تعداد اسپرم‌های دارای حرکت آهسته در طول مدت آزمایش باگذشت زمان بیشتر شده و طبیعی است که هرچه از تعداد اسپرم‌های Class A کمتر شود، به تعداد اسپرم‌های Class B افزوده خواهد شد. اما همچنان که در جدول ۵ دیده می‌شود، در مجموع اسپرم‌های زنده (A+B+C) تفاوت زیادی در ابتدا و انتهای آزمایش دیده نمی‌شود و این امر شاید به‌علت وجود اینوزیتول به‌عنوان یک قند جهت تأمین انرژی توجیه داشته باشد، به‌طوری‌که علی‌رغم افزایش نیافتن اسپرم‌های Class A اینوزیتول توانسته است ماندگاری اسپرم‌های زنده را بهبود بخشد. قطرات پروتوپلاسمی توده‌های کروی با قطر ۳-۲ میکرومتر هستند (۲۷) که این قطرات در ابتدا، در ناحیه گردن اسپرم قرار داشته سپس طی مهاجرت اپیدیدیمی در ناحیه دم اپیدیدیم از ناحیه گردن به ناحیه قطعه میانی اسپرم کشیده می‌شوند (۳۱). در ناحیه دم اپیدیدیم درصد قطرات نزدیک کمتر شده و به‌صورت قطرهٔ دیستال در اسپرم اپیدیدمی مشاهده می‌شوند. مکانیسم این کشیده شدن معلوم نیست، لکن در مورد بز و خوک با سانتریفیوژهای مکرر اسپرم بیضه توانسته‌اند قطره را از ناحیه گردن به سمت پائین هدایت کنند. انقباضات دودی مجرای اپیدیدیم بر روی غلظت بالایی از اسپرم‌ها، در مهاجرت و کشیدن شدن قطره در طول دم اسپرم می‌تواند نقش داشته باشد. حضور مقدار کم قطرات پروتوپلاسمی در اسپرم‌های انزالی خوک، گاو، قوچ و بز نشان‌دهندهٔ جدا شدن قطره در حوالی زمان انزال می‌باشد (۱۰). گزارش شده است که در گاو نر غلظت کاتیون‌های سدیم، کلسیم، منیزیم و همچنین غلظت اسید سیتریک و فروکتوز در ترشّحات آمپول بیش از اپیدیدیم می‌باشد (۳۳). از طرفی ترشّحات غدد وزیکول سمینال نیز سبب جدا شدن قطرات پروتوپلاسمی اسپرم‌های اپیدیدیمی و بیضه گاو نر شده است (۲۹).Kato و همکاران گزارش نمودند که در گاو نر درصد اسپرم‌های قطره‌دار در ناحیه آمپول کانال دفران به‌طور مشخص کاهش پیدا می‌کند و ترشّحات غدد ضمیمه در جدا کردن این قطرات نقش مهمی را ایفاء می‌کنند (۲۱). به‌علاوه پروتئین متصل شونده به فسفولیپید (فاکتور همولیتیک) که توسط آمپول و غدد وزیکول سمینال ترشّح می‌شود (در ترشحات اپیدیدیمی

وجود ندارد) قادر به جداسازی قطرات پرتوپلاسمی اسپرم‌های نابالغ و بالغ چندین گونه بوده است.

در این مطالعه با افزودن اینوزیتول مشاهده گردید که در زمان۱۲۰ دقیقه بعد ازشروع آزمایش تعداد اسپرم‌های زنده دارای قطره پروتوپلاسمی پروگزیمال کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته است و نیز تعداد اسپرم‌های دارای قطره پروتوپلاسمی دیستال در زمان۳۰ دقیقه بعد از شروع آزمایش کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته است.

همچنین مشاهده می‌شود که اسپرم‌های واجد قطره پروتوپلاسمی دیستال تحت تأثیر اینوزیتول در مدت زمان کمتری قطره خود را از دست داده‌اند. به‌نظر می‌رسد هرچه قطره به قسمت سر اسپرم نزدیک‌تر باشد کنده شدن قطرات به‌مدت زمان بیشتری نیاز دارد و احتمالاً اینوزیتول باید مدت طولانی‌تری در دسترس اسپرم‌ها قرار داشته باشد.

در زمان ۳۰ دقیقه بعد از شروع آزمایش تفاوت معنی‌داری در مجموع اسپرم‌های زنده قطره‌دار (پروگزیمال و دیستال) دیده می‌شود که احتمالاً قسمت اعظم اسپرم‌های واجد قطره دیستال در زمان ۳۰ دقیقه و قسمت عمده اسپرم‌های دارای قطره پروگزیمال در مدت زمان بیشتری (۱۲۰ و۱۸۰ دقیقه) تحت تأثیر اینوزیتول قطرات خود را از دست داده‌اند.

حضور قطرات پروتوپلاسمی دیستال با کاهش باروری ناشی از کاهش درصد آبستنی و کاهش میزان توله‌زایی در خوک همراه بوده است. وجود و حضور قطرات سیتوپلاسمی چه به‌صورت قطرهٔ دور و چه به‌صورت قطره نزدیک در اتصال اسپرم اختلال ایجاد می‌کند. در موش‌های صحرایی نیز کاهش باروری در اثر باقی‌ماندن قطرات سیتوپلاسمی اسپرم در داخل رحم موش‌های ماده دیده شده است (۳۱).

در بررسی‌های آزمایشگاهی مشاهده شده است که اسپرم‌های حاوی قطره پروتوپلاسمی پروگزیمال قادر به عبور از سدیم هیالورونات به‌عنوان تست عبور از موکوس سرویکس نبوده و نیز این اسپرم‌ها در آزمایش Swim up نیز ناتوان هستند و این بیانگر اختلالات حرکتی اسپرم‌های قطره‌دار بوده و نیز از نظر قدرت اتصال به زونا پلوسیدا، این اسپرم‌ها توانایی اتصال و نفوذ کمتری نسبت به اسپرم‌های بدون قطره دارند. احتمالاً میزان بالای هیدرولاز موجود در قطره سبب چنین اختلالی می‌شود. از طرفی میزان بالای آنزیم‌های کراتین کیناز و گلوکز ٦- فسفات دهیدروژناز موجود در قطره پروتوپلاسمی می‌تواند سبب افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن شود که در انسان ارتباط منفی بین این رادیکال‌های آزاد و اتصال اسپرم به تخمک ثابت شده است و نیز ارتباط معنی‌داری بین باقی‌ماندن قطره و افزایش فعالیّت کراتین کیناز در قطره پرتو پلاسمی وجود دارد که باعث اکسیداسیون چربی غشاء اسپرم و تولید متابولیت‌های مضر می‌گردد. بنابراین هرگونه اختلالی در جدا شدن قطره باعث ایجاد اختلال در عملکرد اسپرم شده و در طی پروسه لقاح خدشه ایجاد می‌کند.

در این تحقیق افزودن اینوزیتول به محیط حاوی اسپرم‌ها تفاوت معنی‌داری در میزان اسپرم‌های مرده واجد قطره پروتوپلاسمی پروگزیمال و دیستال نداشت و چنین به‌نظر می‌رسد که تنها اسپرم‌های زنده هستند که با وجود اینوزیتول در محیط قادر به جدا کردن بیشتر قطرات پروتوپلاسمی از خود می‌باشند. به‌عبارت بهتر وجود قطرات پروتوپلاسمی در اسپرم‌های مرده نشان‌دهنده این می‌تواند باشد که اسپرم‌ها قبل از این‌که فرصت جدا کردن قطرات را از خود داشته باشند مرده‌اند و شاید بتوان نتیجه گرفت که جدا شدن قطره‌های پروتوپلاسمی در اسپرم‌های زنده صورت می‌گیرد و وجود اینوزیتول می‌تواند نقش مثبتی دراین فرایند داشته باشد، اما این‌که اینوزیتول با چه مکانیسمی باعث جدا شدن این قطره‌ها در اسپرم‌های زنده می‌شود، موردی است که نیاز به تحقیقات و مطالعات بیشتری دارد. از طرف دیگر کاهش فعالیت آروماتاز در دم اپیدیدیم با جدا شدن آن ارتباط دارد و باقی‌ماندن قطره‌های پروتوپلاسمی پس از درمان با ترکیبات توکسیک و

سموم ارگانوفسفره در موش‌های صحرایی، همراه با کاهش باروری دیده شده است.

سموم ارگانوفسفره باعث باقی‌ماندن قطره پروتوپلاسمی به‌میزان ۹۵-۶۰٪ شده و باعث مهار تحرک اسپرم‌های اپیدیدمی گردیده است (۵).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که افزودن اینوزیتول به محیط کشت اسپرم به‌عنوان یک منبع انرژی در الگوهای حرکتی اسپرم گاومیش رودخانه‌ای تأثیر معنی‌داری نداشته اما بر جدا شدن قطرات پروتوپلاسمی مؤثر بوده است، به‌طوری‌که در نهایت باعث افزایش تعداد اسپرم‌های زنده فاقد قطره پروتوپلاسمی، در مقایسه باتعداد اسپرم‌های زنده دارای قطره پروتوپلاسمی می‌گردد.

فهرست منابع

۱. آرتور، ج. (۱۳۷۹) : تولید مثل و مامایی دامپزشکی (تالیف)، ترجمه: علوی شوشتری، م. انتشارات دانشگاه ارومیه، صفحات: ۱۲۹-۱۲۶.

۲. ای.اس.ای حافظ بی. حافظ(۱۳۸۲): تولیدمثل در حیوانات مزرعه‌ای (تالیف)، ترجمه: محمودزاده، ع. انتشارات دانشگاه گیلان، صفحات: ۲۳۱-۲۲٤.

۳. زمیانیس، ر. (۱۳۸۲): تکنیک‌های تشخیصی و درمانی در تولیدمثل (تالیف)، ترجمه: هورشتی پ. و بلورچی، م. انتشارات نوربخش، صفحات: ٤۹-٤۷.

4. Aitken, R.J., Sutton, M., Warner, P. and Richardson, D.W. (1985): Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. J. Reprod. Fertil., 73,441–449.
5. Akbarsha, P., Latha, N.L. and Murugaian, P. (2000): Retention of cytoplasmic droplet by rat caudal epididymal spermatozoa after treatment with cytotoxic and xenobiotic agents., Journal of Reproduction and Fertility, 120: 385–390.
6. Amann, R.P., Seidel, G.E. and Mortimer, R.G. (2000): Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. Theriogenology, 54: 1499-515.
7. Auger, J., Leonce, S., Jouannet, P. and Ronot, X. (1993): Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. J. Histochem. Cytochem., 41: 1247- 1251.
8. Breitbart, H. and Nass-Arden, L. (1995): Relationship between intracellular calcium, energy metabolism and motility of ram sperm. Arch. Androl., 35: 83-92.
9. Chan, S.Y., Tsoi, W.L., Leung, J., Ng, V., Lo, T. and Wang, C. (1990): The accuracy of sperm concentration determination by the automated cell soft semen analyzer before and after discontinuous Percoll gradient centrifugation. Andrologia, 22:55-61.
10. Cooper, T.G. (2005): Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? Human Reproduction, 20(1): 9-10.

11. Cox. J.F., Alfaro,V. Montenegro,V. and Rodriguez-Martinez, H. (2006): Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. Theriogenology, 66: 860–867.
12. Donnelly, E.T., Lewis, S.E., McNally, J.A. and Thompson, W. (1998): In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology in IVF outcome. Fertil. Steril., 70: 305–314.
13. Farrell, P.B., Presicce, G.G., Brockett, C. and Foote, R.H. (1998): Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. Theriogenology, 49: 871–879.
14. Grunert, J.H., De Geyter, C., Bordt, J., Schneider, H.P.G. and Nieshlag, E. (1989): Does Computerized image analysis of sperm movement enhance the predictive value of semen analysis for in vitro fertilization results? International Journal of Andrology, 12: 329-338.
15. Hinting, A., Comhaire, F., Vermeulen, L., Dhont, M., Vermeulen, A. and Vandekerckhove, D. (1989): Value of sperm characteristics and the results of in vitro fertilization for predicting the outcome of assisted reproduction. Journal of Andrology, 13: 59-66.
16. Holt, C., Holt, W.V., Moore, H.D.M., Reed, H.C.B. and Curnock, R.M. (1997): Objectively measured boar sperm motility measurements correlate with the outcomes of on-farm inseminations: Results of two fertility trials. Journal of Andrology, 18(3): 312-323.
17. Holt, W., Watson, P., Curry, M. and Holt, C. (1994): Reproducibility of computer-aided semen analysis: Comparison of five different systems used in a practical workshop. Fertility and Sterility, 62: 1277-1282.
18. Janulis, L., Hess, R.A., Bunick, D., Nitta, H., Janssen, S., Asawa, Y. and Bahr J.M. (1996): Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase, which decreases as sperm traverse the epididymis. Journal of Andrology, 17: 111–116.
19. Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Rouissi, H., Herraez , P. and Anal, L. (2003): Effect of epididimis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. Theriogenology, 60: 1249-1259.
20. Kathiravan, P. (2007): Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes, Anim. Reprod. Sci., 19: 174-183.
21. Kato, S., Toshitaka S.A., Hdiroshi, H. and Yasuyuki, K. (1996): Timing of shedding and disintegration of cytoplasmic droplets from boar and development, 42: 237-241.
22. Kvist, U., Givercman, A., Haugan, T.B., Suominen, J. and Bjorndahl, L. (2002): Manual on Basic Semen Analysis Nordic Association for Andrology and Special Interest Group on Andrology.
23. Lauram, K., Deniser, H. and Annm, D. (2000): Correlation of CASA velocity and linearity parameters with sperm mobility phenotype in turkeys. Journal of Andrology, 21: 65-71.
24. Leidl, W., Kato, H., Hollerrieder, J. and Braun, J. (1993): Analysis of sperm motility by computer assisted methods, with special consideration of in vitro fertilization. Molecular Reproduction and Development, 36: 222-228.

25. Liu, D.Y., Clarke, G.N. and Baker, H.W.G. (1991): Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn Motility Analyzer and fertilization rates in vitro. Journal of Andrology, 12: 231-239.
26. Moore, H.D.M. and Akhondi, M.A. (1996): Fertilizing Capacity of Rat Spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis: Epididymal rat Spermatozoa from the proximal cauda have a greater fertilizing capacity in vitro than those from the distal Cauda or vas deferens. Journal of Andrology, 17: 50-60.
27. Mortimer, S.T., Schoe¨vae¨rt, D., Swan, M.A. and Mortimerm, D. (1997): Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa. Hum. Reprod., 12: 1006–1012.
28. Saling, P.M. Sperm maturation. In: Bavister, B., Cummins, J. and Rolan, E.R.S. (1990): Fertilization in mammals. Sereno symposia, USA, Norwel, Massachusetts, pp: 49.
29. Setchell, B.P. and Brooks, D.E. Anatomy, vasculature, innervations and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil, E. and Neill, J. (1988): The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, 1: 753–836.
30. Sukcharoen, N., Sithipravej, T., Promviengchai, S., Chinpilas, V. and Boonkasemsanti, W. (1998): Sperm morphology evaluated by computer (IVOS) cannot predict the fertilization rate in vitro after intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 69: 564-568.
31. Thundathil, A.T., Palasz, A.D., Barth, R.J. and Mapletoft, B. (2001): The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. Animal Reproduction Science, 65: 181–192.
32. Wainer, R., Merlet, F., Bailly, M., Lombroso, R., Camus, E. and Bisson, J.P. (1996): Prognostic sperm factors in intra-uterine insemination with partner's sperm. Contraception, Fertility, Sexuality, 24: 897-903.
33. Youngquist, S. and Threlfall, R. (2007): Current Therapy in Large Animal Theriogenology, Saunders, London, pp: 221-237.