

بررسی و ارزیابی بلوغ آزمایشگاهی اسپرم رت توسط CASA

دکتر محمد مهدی آخوندی - استادیار، متخصص باروری آزمایشگاهی، پژوهشکده ابن سینا (مرکز پژوهشی بیولوژی و بیوتکنولوژی تولید مثل و نازایی)

پروفسور هری مور - متخصص بیوتکنولوژی تولید مثل، دانشگاه شفیلد انگلستان

چکیده

اسپرم پستانداران، پس از انتقال از بیضه ها به اپیدیدیم، حرکت پیشرونده کمی را از خود نشان داده و عمدتاً بی حرکت می باشند. اسپرم همزمان با عبور از اپیدیدیم، بتدریج توان حرکت پیشرونده را کسب می نماید. این پروسه که پس از عبور اسپرم از بیضه ها اتفاق می افتد و نیازمند فاکتورهای ترشح از اپیتلیال اپیدیدیم است، بلوغ و باروری اسپرم نامیده می شود. هدف از این مقاله، تنظیم و ارزشیابی استفاده از آنالایزر کامپیوتری اسپرم برای ارزیابی حرکت اسپرم رت می باشد. داشتن یک سیستم ارزشمند و توانمند کامپیوتری ما را قادر به مطالعه پروسه باروری و بلوغ اسپرم در *in vivo*، *in vitro* مینماید.

مواد و روشها: نمونه های اسپرم از نواحی مختلف اپیدیدیم و پس از رها شدن از بدن رت، تهیه شد. کشت های اولیه ای از اپیتلیوم اپیدیدیم رت فراهم شد، سیستم جدیدی از آنالایزر کامپیوتری اسپرم (CASA) برای آنالیز مشخصه های حرکتی بلوغ اسپرم رت در داخل و خارج بدن و همچنین در حضور کشت همزمان بکاربرده شد. از یک آنالایزر تصویری نیز برای آنالیز تصویری حرکات اسپرم نواحی مختلف اپیدیدیم نیز استفاده شد.

نتایج: نتایج حاصل این مطالعه که در آن از یک نوع جدید CASA و آنالایزر تصویری برای نمایش و آنالیز حرکتی اسپرم در پروسه بدن بکار گرفته شد، نشان می دهد که اسپرم رت در مجاورت هم کشتی با اپیدیدیم، امکان بلوغ باروری را در خارج از بدن نیز دارا می باشد. این مطالعه همچنین نشان داد که این نوع از CASA و آنالایزر تصویری، توأمآ قادر به ارائه جزئیات مشخصه های حرکتی اسپرم رت (که از نظر شکلی و قرینه بودن سر، متفاوت با اسپرم انسان است) می باشند. توانمندی این سیستم بهترین امکان را برای بررسی بلوغ اسپرم در *in vitro* فراهم می نماید.

واژه های کلیدی: اسپرم رت، آنالایزر کامپیوتری اسپرم (CASA)، آنالیز تصویری، بلوغ اسپرم، بلوغ آزمایشگاهی اسپرم

آدرس مکاتبه: تهران - اوین - دانشگاه شهید بهشتی - انتهای بلوار - پژوهشکده ابن سینا

صندوق پستی ۱۷۷-۱۹۸۳۵

مقدمه

بررسی های متعدد آزمایشگاهی، مؤید این حقیقت است که اسپرم پستانداران پس از خارج شدن از بیضه ها و داخل شدن در اپیدیدیم، حرکت پیشرونده ای نداشته و یا این حرکت بسیار ناچیز بوده است (۵). اسپرم پس از انتقال و عبور از طول اپیدیدیم، بتدریج توانایی کامل برای حرکت پیشرونده را کسب مینماید. اگرچه اسپرم در داخل بدن پستانداران (بیضه و اپیدیدیم) ساکن و بی حرکت است، ولی توانایی حرکتی اسپرم با رقیق شدن در محیط کشتهای مناسب آزمایشگاهی، قابل بازیافت و مطالعه است (۲۱).

در ارتباط با بررسی میزان تغییرات و بلوغ اسپرم در طول اپیدیدیم و همچنین بررسی تأثیر سلولهای اپیتلیال اپیدیدیم بر بلوغ اسپرم، وجود یک متد کمی اندازه گیری حرکت اسپرم ضروری است (۱۶ و ۱۷). هدف از این تحقیق و مطالعه، بررسی امکان استفاده از آنالیزر کامپیوتری اسپرم [Computer Assisted Sperm Analyser (CASA)]، برای داشتن یک مقیاس روشن اندازه گیری حرکت اسپرم رت میباشد. پس از ارزش گذاری و بدست آوردن معیارهای ارزیابی مناسب، این سیستم قادر خواهد بود که بلوغ آزمایشگاهی اسپرم را بررسی نماید.

آنالیزر کامپیوتری اسپرم (CASA) با داشتن یک آنالیز تصویری کامپیوتری پیشرفته و جالب (شامل سخت افزار و نرم افزار)، امکان ردیابی الکترونیکی اسپرم را دارا است (۱۱). مطالعه بر روی اسپرم تعدادی از پستانداران نشان داده است که پارامترهای حرکتی اسپرم بعنوان مثال حرکت پیشرونده Progressive velocity، جابجایی سر اسپرم (Lateral head displacement) بستگی

مستقیمی به توانایی باروری اسپرم در داخل بدن و یا خارج از بدن را دارد (۱۰ و ۱۶ و ۱۹).

تلاش برای اندازه گیری تغییرات کمی حرکت اسپرم رت در روند بلوغ (۷) شامل ارزش گذاری منحصر به اسپرم رت (۸ و ۲۰) اندازه گیری تعداد زدن دم (۹) و استفاده از CASA میباشد (۲۳) در آخرین گزارشها تنها تعداد نسبتاً کمی از اسپرم (۳۰۰-۱۰۰۰) بطور مداوم و مرتب و حداکثر در فواصل زمانی کوتاه مدت ۶۷٪ ثانیه مورد آنالیز قرار گرفته است.

مطالعه حاضر از آنالیزر کامپیوتری اسپرم (CASA) با برتری های ویژه برای آنالیز (Hobson Sperm Tracker) و همچنین آنالیزهای تصویری دیگر برای اندازه گیری جزئیات تغییر در پارامترهای حرکتی اسپرم رت در هنگام روند بلوغ و پس از انزال استفاده شده است.

مواد و روش ها

حرکت اسپرم رت در روند بلوغ داخل بدن

تهیه و آماده سازی اسپرم اپیدیدیم رت

رت های بالغ با ضربه ای محکم بر سر آنها کشته شدند. اپیدیدیم در شرایط استریل، از بدن خارج و در داخل محیط کشت RPMI-1640 از خون و چربی عاری و شستشو داده شده و سپس در یک پتری دیش کوچک آزمایشگاهی (۳۵ میلی متری) و در محیط کشت محتوی آنتی بیوتیک قرار داده شد. اپیدیدیم به چند قسمت مجزا تقسیم و این تقسیمات هرکدام در داخل یک خانه از پلیت ۲۴ خانه حاوی ۰/۵-۰/۲۵ میلی لیتر از محیط کشت فوق حاوی BSA (آلبومین سرم گاوی) و آنتی بیوتیک قرار داده شد. قطعات اپیدیدیم مجدداً با قیچی به قطعات ریزتری تقسیم و بمدت ۲۰-۱۵ دقیقه داخل انکوباتور 37°C قرار داده شد. سپس بافت های قطعه

قطعه شده از محیط کشت خارج و سوسپانسیون اسپرم بدست آمده، مجدداً تا زمان استفاده در انکوباتور نگهداری شد.

تهیه و آماده سازی اسپرم انزال شده رت

متأسفانه جمع آوری اسپرم حاصل از انزال رت با تحریک مستقیم حیوان ممکن نیست. بنابراین اسپرم باید پس از ارتباط جنسی طبیعی از واژن جنس مخالف جمع آوری شود. بدین منظور رت های ماده ۲۵۰-۳۰۰ گرمی در داخل قفس های مجزای از رت های نر قرار داده شده و تحت مشاهده مستقیم قرار گرفتند. رت های ماده در زمان ایستروس رفتار جنسی متفاوتی را همراه با ارتباط جنسی در مدت ۲-۵ دقیقه پس از قرار داده شدن در قفس نشان میدادند. پس از ۳۰ دقیقه و انجام حدود ۴۰-۵۰ بار انزال توسط رت نر، رت ماده از قفس جدا و به روش توضیح داده شده کشته شد. ناحیه تناسلی در شرایط استریل خارج و موضع بالای واژن و پائین رحم باز شد. توده اسپرم بسیار غلیظ و با ویسکوزیته بالا بوسیله اسپاچولای استریل کوچک برداشته و بداخل ۱-۰/۵ میلی لیتر محیط کشت منتقل شد. رت هایی که در مدت ۲-۵ دقیقه هیچگونه ارتباط جنسی را نشان ندادند، از هم جدا و به قفس های خود بازگردانده شدند.

تهیه رقت مناسب از اسپرم با روش قطره ای (Droplet Method)

مقداری اسپرم از سوسپانسیون تهیه شده اصلی برداشته و بمیزان 5×10^6 اسپرم در هر میلی لیتر رقیق و سپس $2 \mu\text{l}$ از این اسپرم رقیق شده به داخل $27 \mu\text{l}$ از قطره محیط کشتی که وسط یک پتری دیش کوچک ۳۵ میلی متری اضافه شد که سطح آن با روغن پارافین پوشیده شده بود.

تهیه رقت مناسب از اسپرم با روش لام و لامل (Coverslip Method)

۳۰ میکرولیتر از اسپرم رقیق شده با روش فوق در وسط یک پتری دیش کوچک ۳۵ میلی متری قرار داده شده و با یک لامل شیشه ای به ابعاد 22×22 میلی لیتر پوشانده شد. عمق این میزان محیط کشت حاوی اسپرم، بین لامل و کف پلیت حدود ۶۰ میکرومتر میباشد و این در صورتی است که محیط کشت از اطراف لامل منتشر نشود. روی لامل برای کنترل رطوبت و گرما با روغن پارافین پوشیده شد.

آنالیز حرکت اسپرم نواحی مختلف اپیدیم رت توسط آنالایزر کامپیوتری اسپرم (CASA)

اسپرهای آماده شده به روشهای فوق در داخل میکروسکوپ اینورت نیکون (Nikon UK, Ltd.) که اطراف آن با یک کابینت، با قابلیت تنظیم درجه حرارت هوای داخل آن بطور اتوماتیک روی 37°C قرار داده شد. میکروسکوپ حاوی یک صفحه اتوماتیکی (Prior Scientific Instruments Ltd., UK)، یک دوربین ویدیویی (Pulnix Ltd.) London, 05 Lux متصل به آنالایزر حرکتی اسپرم (Hobson Sperm Tracker, Hobson Tracking System Ltd; Sheffield, UK) و یک ویدئو بود.

استفاده از این نوع آنالایزر اسپرم، تأثیر جدی بر نتایج بررسی داشت. تنظیم این آنالایزر اسپرم بگونه ای است که دقیقاً همان تصویری که در آنالایزر تصویری مشاهده می شود، قابل شناسایی و آنالیز است. لذا باید برای هر نوع اسپرم از پستانداران مختلف، یک تنظیم صحیح، شناسایی و انجام شود. در این ارتباط شکل سر اسپرم، شکل دم اسپرم و اندازه اسپرم و ضمائم نظیر قطره سیتوپلاسمی، باید در نظر گرفته شود. این بررسی ها

۱۵ ثانیه (با قابلیت اندازه گیری ردیابی صدها اسپرم) تا ۵ دقیقه (ردیابی هزاران هزار اسپرم) را دارد.

ردیابی دقیق بوسیله یک امکان نصب شده بر روی این آنالایزر، تحت عنوان trail draw انجام میپذیرد. در بهترین شکل تنظیم، صفحه مونیتر آنالایزر قادر است همزمان در حدود ۲۰۰ اسپرم را آنالیز و بررسی نماید. معمولاً در غلظت تهیه شده $10^6/10^7$ اسپرم در هر میلی لیتر، فقط ۸۰-۵۰ اسپرم متحرک در هر مشاهده با یک عدسی شیئی $10\times$ ، قابل رؤیت است. لذا این دستگاه با این تنظیم، قادر به مطالعه تعداد قابل توجهی اسپرم خواهد بود.

آنالایزر HST همچنین قادر است که پارامترهای متعدد حرکتی اسپرم را اندازه گیری نماید. (VCL (Curvilinear velocity) (مجموع فواصل پیموده شده در مسیر عبور در هر تصویر تقسیم بر مجموع زمان ردیابی)، VAP (Velocity Average Path) (راه پیموده شده بر اساس معدل تعداد نقطه های بدست آمده در مسیر حرکت، تقسیم بر زمان ردیابی)، VSL (Velocity Straight Line) (فاصله مستقیم بین مسیر پیموده شده در هر ردیابی، تقسیم بر زمان هر ردیابی)، MAD (Mean Angular Displacement) (معدل تغییر جهت سر اسپرم در هر تصویر)، BCF (Beat Cross Frequency) (نقاط چرخش سر اسپرم)، LHD (Lateral Head Displacement) (معدل انحراف سر اسپرم از یک مسیر مستقیم) و Linearity، LIN (فاصله خط مستقیم مسیرهای پیموده شده تقسیم بر مجموع فواصل مسیرهای پیموده شده $100\times$). علاوه بر آن میزان اسپرمهای متحرک، غلظت و میزان درصد اسپرم های متحرک نیز قابل اندازه گیری است. در این مطالعه فقط اندازه های اصلی

با عدسی شیئی $4\times$ و $10\times$ فاز کنتراست بالا و منفی نیکون صورت پذیرفت. استفاده از این نوع اپتیک موجب ایجاد بهترین کنتراست برای سر اسپرم جوندگان (که داس مانند است) می شود. بخصوص زمانی که اسپرمها ضمن حرکت پیشرونده خود، بدون هیچگونه مانعی در حال چرخش هستند. این موضوع از این جهت قابل اهمیت است، که تحت حالت فاز کنتراست نرمال، سرهای اسپرم جوندگان، ضمن حرکت پیشرونده و در حال چرخش، بصورت متناوب روشن و تیره میشوند. این امر منجر به قطع ردیابی حرکت اسپرم توسط آنالایزرهای حرکتی اسپرم میشود. بهترین و مناسب ترین تنظیم در این آنالایزر (HST = Hobson Sperm Tracker) بر اساس استفاده از دستورالعمل ارائه شده توسط تولیدکننده دستگاه و با تکرار آنالیزهای انجام شده از روی نوار ضبط شده ویدئویی حرکت اسپرم تعیین گردید. تنظیمها برای آنالیز تصویری عدسی شیئی $10\times$ بر اساس ذیل بود:

search radius=15.31 μm , predict=off ,
video=pal , aspect=1049 .refresh time=1
second,threshold=+20/-66 و filter
weighting 1=-2,2=4,3=3,4=4.

آنالایزر Hobson Sperm Tracker میتواند تصاویر مورد نظر را بمیزان ۲۵، ۳۰ و یا ۶۰ تصویر در هر ثانیه گرفته و مورد آنالیز قرار دهد. در این مطالعه ۲۵ تصویر در هر ثانیه مورد استفاده جهت آنالیز اسپرم قرار گرفت. برتری قابل ذکر در این آنالایزر در مقابل با CASA سیستم های دیگر این است که در آنالایزرهای دیگر، میدان دید مورد مشاهده تنها در زمان بسیار کوتاهی (کمتر از یک ثانیه) مورد مطالعه قرار میگیرد درحالیکه این آنالایزر (HST) قادر به آنالیز حرکتی میدان دید مورد مشاهده در زمان تنظیم شده و قابل کنترل بین

تحرك اسپرم (VSL, VAP, VCL) مورد آنالیز و بررسی قرار گرفت.

آنالیز تصویری از حرکت اسپرم

حرکت اسپرم بطور جزئی ترودقیقترو بصورت تصویر به تصویر، توسط آنالیزر تصویری و از طریق نوار ضبط شده حرکت اسپرم، تصویر برداری گردید. این تصویرها بوسیله تسهیلات موجود در انتخاب تصویر (Improvisation Ltd.) و نرم افزار آنالیزر تصویری (NIH, Washington, USA) ۱/۵۲ انجام شد. با انتخاب حداقل ۱۰ تصویر برای هر اسپرم، حرکت واقعی هر اسپرم در مراحل مختلف بلوغ، بصورت تصویری بدست آمد. نتیجه این آزمایش قابل مقایسه با ردیابی انجام شده در مرحله قبلی آزمایش (trail draw) توسط CASA می باشد.

آنکوباسیون ج) ۲۴ ساعت پس از آنکوباسیون. از آنجا که بررسی حرکتی اسپرم توسط CASA در حضور سلولهای اپیتلیال امکان پذیر نبود، لذا برای رفع این مشکل، بمیزان ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون محیط کشت حاوی اسپرم به یک پتری دیش کوچک مشابه آنچه قبلاً توضیح داده شده بود، منتقل و آنالیز انجام پذیرفت.

نمایش ردیابی حرکت اسپرم در روند انجام هم کشتی همزمان با انجام آنالیز حرکتی اسپرم توسط CASA، نمایش ردیابی حرکت اسپرم بوسیله trail draw بدست آمد. این نمایش ترسیم کننده حرکت حداقل یک اسپرم در نواحی مزبور در روند آزمایش بود.

محاسبات آماری

اطلاعات بدست آمده به برنامه نرم افزاری آماری (Fig.P. Software Corporation, Scientific Figure Processor, Durham, N.C., USA) منتقل و سپس محاسبات آماری انجام گردید. محاسبات آماری برای هر کدام از پارامترهای حرکتی اسپرم (VCL, VAP, VSL) بصورت Paired "t" test انجام شد.

نتایج

حرکت اسپرم رت در روند بلوغ داخل بدن آنالیز اسپرم توسط تکنیک قطره ای (droplet Method)

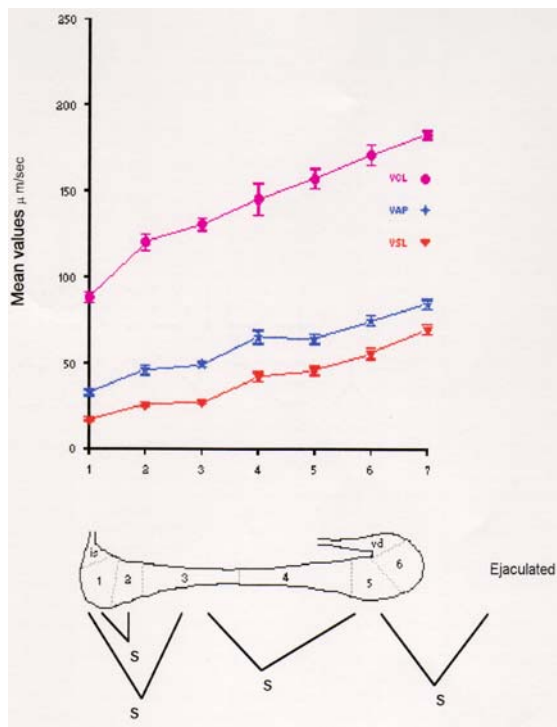
بررسی و آنالیز اسپرم از نواحی مختلف اپیدیدیم براساس آنچه توضیح داده شد، برای شش رت انجام شد.

حرکت اسپرم رت در روند بلوغ خارج از بدن آنکوباسیون اسپرم روی کشت سلولهای اپیدیدیم اسپرم ناحیه انتهایی caput و ناحیه ابتدایی Corpus اپیدیدیم رت براساس آنچه در بالا توضیح داده شد، تهیه گردید. اسپرمها بمیزان 5×10^5 در هر میلی لیتر به مدت ۲۴ ساعت بر اساس سه الگوی ذیل آنکوبه شدند. الف) بطور مستقیم بر روی سلولهای کشت داده شده اپیدیدیم. ب) داخل محیط کشت برداشته شده از کشت سلولهای اپیدیدیم پس از ۲۴ ساعت ج) داخل محیط کشت

آنالیز حرکت اسپرم، در مدت انجام کشت همزمان (آنکوباسیون) اسپرم با سلولهای اپیتلیال اسپرم استفاده شده در آزمایشات فوق، توسط CASA و براساس زیر آنالیز شد: الف) همزمان با شروع آنکوباسیون ب) ۴/۵ ساعت پس از

آنالیز اسپرم توسط تکنیک لام و لامل (coverslip method)

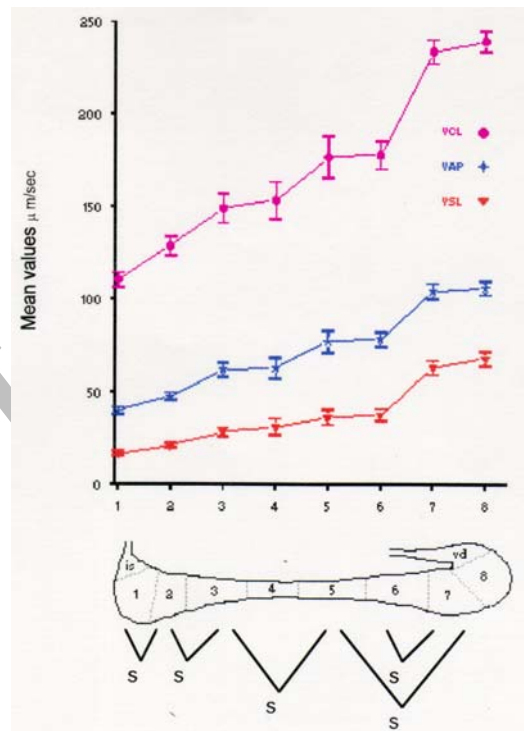
بررسی و آنالیز اسپرم از نواحی مختلف اپیدیدیم بر روی ۶ رت انجام شد، همچنین ۶ آنالیز از اسپرم انزال شده نیز مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. معدل (mean) مربوط به حرکت پیشرونده اسپرم (VCL، VAP و VSL) مربوط به نواحی مختلف اپیدیدیم و همچنین اسپرم انزال شده در شکل شماره ۲ نمایش داده شده است.



شکل ۲- آنالیز حرکت پیشرونده اسپرم رت در روند بلوغ
داخل بدن با استفاده از تکنیک لام و لامل

در این شکل مقایسه ای از پارامترهای حرکتی در نمونه های اسپرم رت و برداشته شده از شش ناحیه از اپیدیدیم و اسپرم رت پس از انزال، نشان داده شده است. شماره های روی نمودار نشاندهنده ناحیه نمایش داده شده با همان شماره بر روی شکل شماتیک اپیدیدیم و از قرار ذیل است: ۱- ناحیه ابتدایی caput، ۲- ناحیه انتهایی caput، ۳- ناحیه ابتدایی corpus، ۴- ناحیه انتهایی corpus، ۵- ناحیه ابتدایی cauda، ۶- ناحیه انتهایی cauda، ۷- اسپرم جمع آوری شده پس از انزال. مقادیر نشان دهنده $SD \pm (mean)$ برای حرکت پیشرونده (VCL، VAP و VSL) برای ۶ رت می باشد. اختلاف معنی داری در مقادیر حرکت پیشرونده بین نواحی (۱ و ۲)، (۲ و ۳) و (۳ و ۴) دیده شده و با S نشان داده شده است.

نمونه های برداشته شده از نواحی caput با توجه به زمان حرکت محدود اسپرم در آن ناحیه و فرصت بسیار کوتاه جهت بررسی حداقل ۱۲ بار آنالیز شد، در حالیکه نمونه های برداشت شده از نواحی corpus و cauda حداقل ۱۸ مرتبه آزمایش شد. معدل (mean) مربوط به حرکت پیشرونده اسپرم (VCL، VAP، VSL) از نواحی مختلف اپیدیدیم در شکل شماره ۱ نمایش داده شده است.



شکل ۱- آنالیز حرکت پیشرونده اسپرم رت در روند بلوغ داخل بدن با استفاده از تکنیک قطره ای

در این شکل مقایسه ای از پارامترهای حرکتی در نمونه های اسپرم رت از هشت ناحیه از اپیدیدیم نشان داده شده است. شماره های روی نمودار نشان دهنده ناحیه نمایش داده شده با همان شماره بر روی شکل شماتیک اپیدیدیم و از قرار ذیل است: ۱- ناحیه ابتدایی caput، ۲- ناحیه انتهایی caput، ۳ و ۴- ناحیه ابتدایی corpus، ۵ و ۶- ناحیه انتهایی corpus، ۷- ناحیه ابتدایی cauda، ۸- ناحیه انتهایی cauda. مقادیر نشان دهنده معدل $SD \pm (mean)$ برای حرکت پیشرونده (VCL و VAP و VSL) برای ۶ رت می باشد. اختلافات آماری معنی داری در مقادیر حرکت پیشرونده فوق بین نواحی (۱ و ۲)، (۲ و ۳)، (۳ و ۴) و (۴ و ۵) دیده شد (که با S نشان داده شده است). در حالیکه VSL در بین نواحی (۵ و ۶) بشکل معنی داری تغییر نموده است.

می یابد. به همین دلیل ردیابی در ناحیه انتهایی cauda به ۳ ثانیه و در اسپرم انزال شده به ۲ ثانیه تقلیل می یابد.

این ردیابی انعکاس معدل اطلاعات حرکتی اسپرم ارائه شده در شکل ۱ و ۲ می باشد. اسپرم ناحیه ابتدایی اپیدیدیم (initial segment)، حرکت پیشرونده بسیار کمی داشت.

اسپرمهای برداشته شده از ناحیه ابتدایی و انتهایی Caput، دارای حرکت تاژی دم، بشکل پهن آن بودند. این نوع حرکت دم منجر به حرکت پیشرونده بسیار ناچیزی برای اسپرم می باشد.

اسپرم برداشت شده از ناحیه اولیه corpus، دارای حرکت دورانی بودند.

تغییر این حرکت به سمت حرکت مستقیم و پیشرونده در اسپرم نواحی انتهایی corpus، با کاهش پهنای حرکت تاژی دم دیده می شود.

اسپرم ناحیه اولیه cauda نمایش حرکتی پیشرونده کاملتری از اسپرم برداشت شده از ناحیه انتهایی cauda داشت. ولی پس از انزال، اسپرم نمایش حرکت پیشرونده کاملتری از همه نواحی اپیدیدیم داشت.

پارامترهای حرکتی اسپرم بر اساس آنالیز با

برنامه کامپیوتری ۱/۵۲ Image

با این روش، پارامترهای حرکتی اسپرم از هر ناحیه از اپیدیدیم با استفاده از انتخاب تصاویر متناوب و منظم از فیلم ویدئویی حرکت اسپرم، بصورت انیمیشن برای مشاهده و همچنین امکان چاپ و نمایش تصویری بررسی و تهیه شد.

تصاویر اسپرم از ناحیه انتهایی caput، ابتدایی و انتهایی corpus و همچنین از ناحیه انتهایی cauda در شکل ۴ الی ۷ بترتیب نمایش داده شده است.

پارامترهای حرکتی اسپرم بر اساس آنالیز با trail draw

بوسیله استفاده از امکان ثبت و مشاهده حرکت اسپرم trail draw بر روی HST، نمایش ردیابی حرکتی اسپرم نواحی مختلف اپیدیدیم و پس از انزال در شکل ۳ تهیه شد.

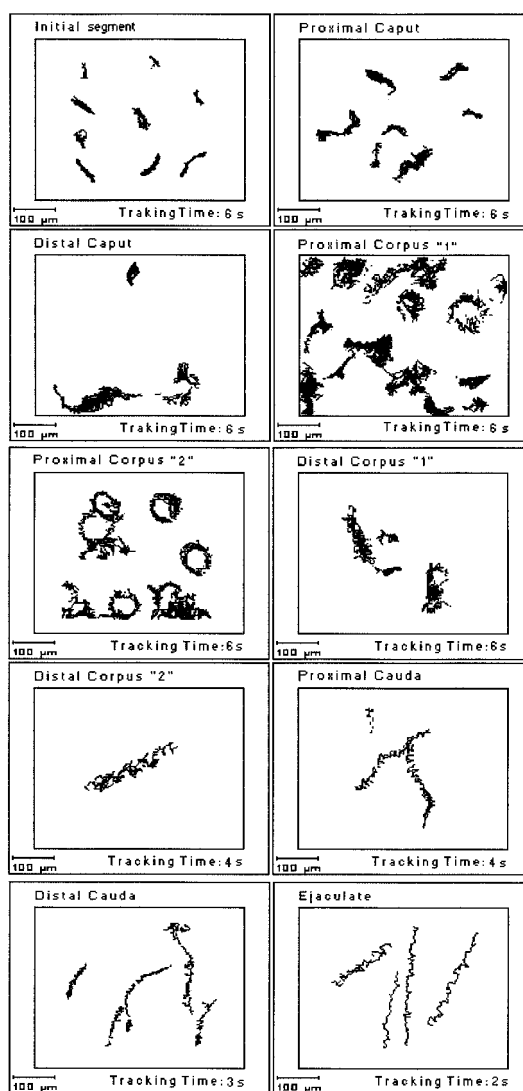


Figure 26 Characteristics of rat sperm movement by "Trail draw"

شکل ۳- نمایش پارامترهای حرکتی اسپرم رت توسط

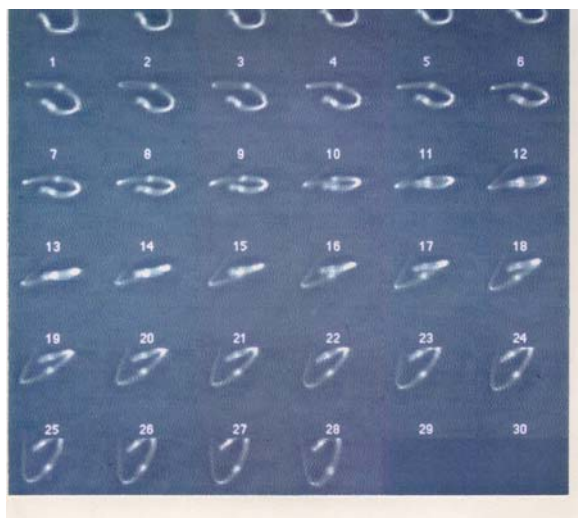
trail draw

این شکل ردیابی حرکت اسپرم رت در روند بلوغ داخل بدن از ۹ ناحیه اپیدیدیم و همچنین پس از انزال می باشد، که بوسیله آنالیز کامپیوتری Hobson Sperm Tracker تهیه شده است. ردیابی به مدت زمان ۶ ثانیه از ناحیه ابتدایی اپیدیدیم (initial segment) شروع شده است. از ناحیه ابتدایی corpus بدلیل افزایش حرکت پیشرونده، زمان ردیابی به ۴ ثانیه تقلیل

این اشکال و تصاویر بیانگر وجود تغییرات اساسی در حرکت اسپرم رت و در روند بلوغ آن در اپیدیدیم می باشد .

اسپرم ناحیه انتهایی caput (شکل ۴) دارای حرکت پهن و کمانی زدن دم از ناحیه قسمت میانی دم بود.

شکل ۵- نمایش پارامترهای حرکتی اسپرم ناحیه ابتدایی corpus

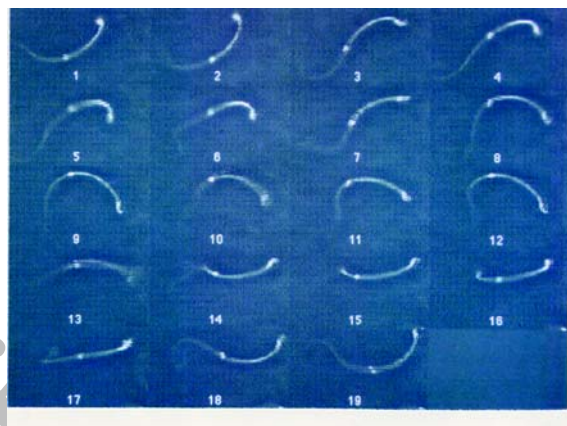


اپیدیدیم رت توسط نرم افزار تصویری ۱/۵۲

در این شکل تصاویر حرکت یک اسپرم رت از ناحیه ابتدایی corpus دیده میشود. هرکدام از تصاویر ۲۸ گانه (۱/۲۵ ثانیه) با استفاده از امکان انتخاب تصاویر متناوب و منظم و با درشتنمایی ۱۰× بدست آمده است. مجموعه تصاویر نشان دهنده نوع و میزان حرکت اسپرم در این ناحیه میباشد. اسپرم این ناحیه در مقایسه با ناحیه انتهایی caput، دارای حرکت سریعتر بود. حرکت دورانی از پارامترهای حرکتی اسپرم این ناحیه میباشد.

ولی تغییرات مشخصی در پارامترهای حرکتی اسپرم در ناحیه انتهایی corpus (تصویر ۱ الی ۱۴ شکل ۶) بوجود می آید.

این تغییرات نشان دهنده انعطاف کمتر تاژک در ایجاد حرکت پهن بود، این مسأله میتواند بواسطه استحکام بیشتر دم اسپرم در این ناحیه باشد.



شکل ۴- نمایش پارامترهای حرکتی اسپرم ناحیه انتهایی caput اپیدیدیم رت توسط نرم افزار تصویری ۱/۵۲

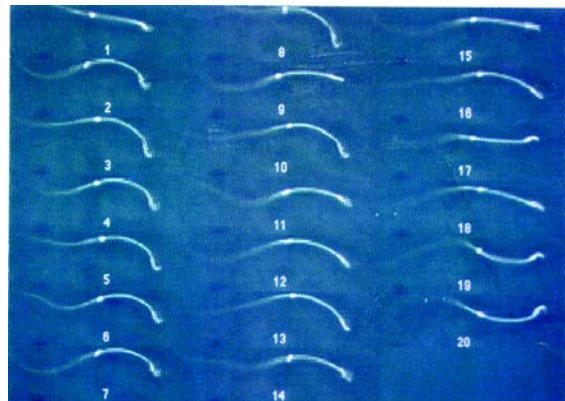
در این شکل تصاویر حرکت یک اسپرم رت از ناحیه انتهایی Caput دیده میشود. هرکدام از تصاویر ۱۹ گانه (۱/۲۵ ثانیه) با استفاده از امکان انتخاب تصاویر متناوب و منظم و با درشتنمایی ۱۰× بدست آمده است. مجموعه این تصاویر نشان دهنده نوع و میزان حرکت اسپرم در این ناحیه میباشد، که در این تصویر اسپرم دارای حرکت پهن و کمانی زدن دم و از ناحیه میانی آن میباشد. ناچیز بودن حرکت پیشرونده اسپرم در این ناحیه با مقایسه میزان پیشرفت سر اسپرم بین تصاویر ۱ الی ۱۹ قابل تشخیص است.

این نوع حرکت دم، موجب حرکت بسیار کم پیشرونده و پیشرفت کم سر اسپرم به سمت جلو در مقایسه تصویر ۱ الی ۱۶ بود. اسپرم ناحیه ابتدایی corpus، حتی بیش از ناحیه انتهایی caput دارای حرکت پهن زدن دم ولی بصورت سریعتر بود، که منجر به داشتن حرکت دورانی میشد (تصویر ۱ الی ۲۸ شکل ۵).

آوردن تصویر مناسب از این ناحیه بعلت سرعت حرکت پیشرونده با درشت نمایی $\times 10$ بسیار مشکل بوده و با درشتنمایی $\times 4$ نیز حرکت سریع و پیشرونده اسپرم قابل مشاهده است.

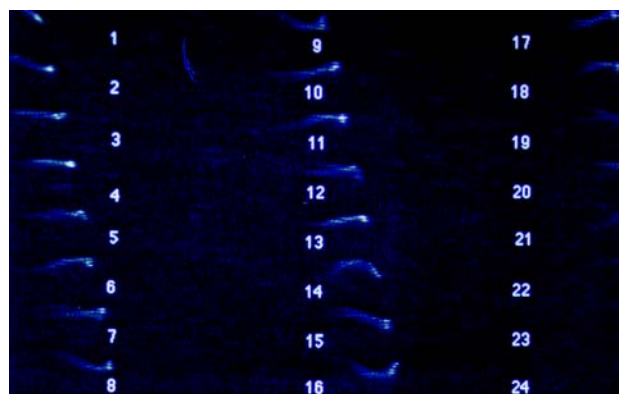
حرکت اسپرم رت در روند بلوغ آزمایشگاهی آنالیز حرکتی اسپرم در مدت انکوباسیون بر روی سلولهای اپیتلیال اپیدیدیم

اپیتلیال اپیدیدیم ناحیه caput و corpus بر اساس روش مندرج در مقاله (۱). بمدت ۳ روز کشت داده شد. اسپرهای تهیه شده از نواحی مختلف اپیدیدیم جهت بررسی تأثیر هم کشتی اسپرم بر بلوغ آزمایشگاهی آن، مورد استفاده قرار گرفت. اسپرم ناحیه انتهایی و ناحیه ابتدایی corpus بر روی کشتهای اپیدیدیم فوق کشت داده شد و همزمان آزمایشات مشابهی با انکوباسیون اسپرم نواحی فوق در محیط کشت برداشته شده از کشت سلولهای اپیتلیوم اپیدیدیم پس از ۲۴ ساعت از کشت (Conditioned medium) و محیط کشت به تنهایی انجام شد. حرکت اسپرم ناحیه انتهایی caput و

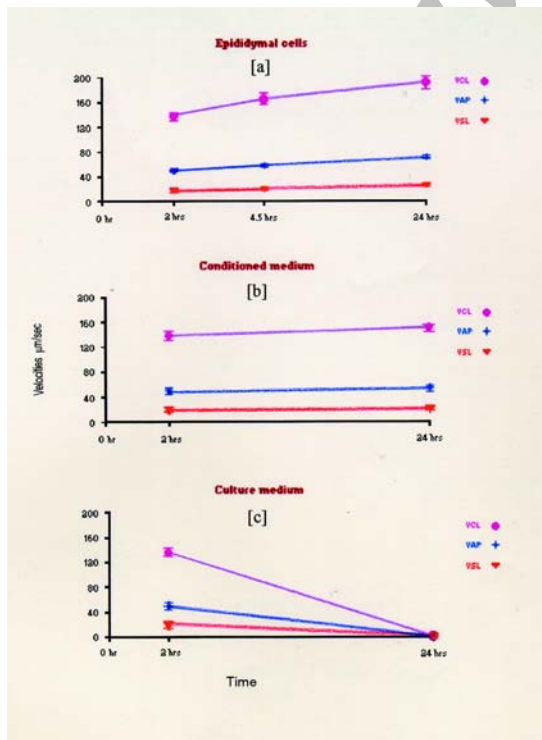


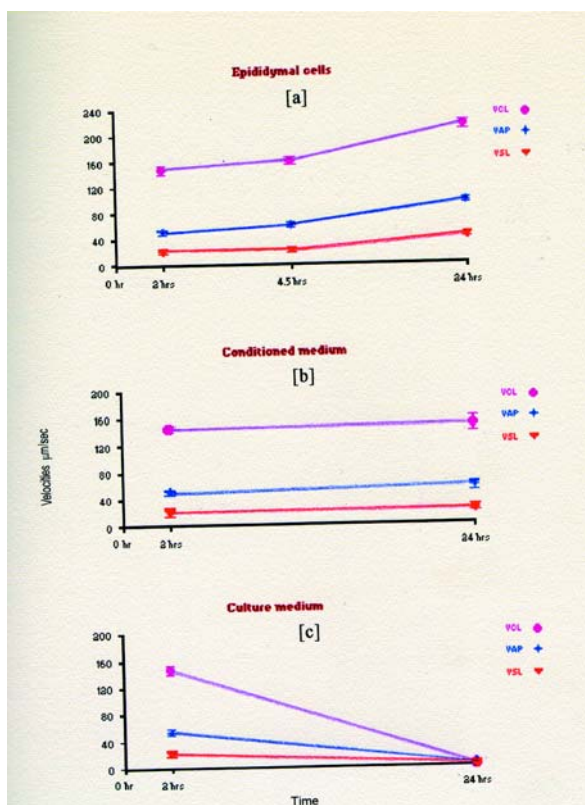
شکل ۶- نمایش پارامترهای حرکتی اسپرم ناحیه انتهایی corpus اپیدیدیم رت توسط نرم افزار تصویری ۱/۵۲ در این شکل تصاویر حرکت یک اسپرم رت از ناحیه انتهایی corpus دیده میشود. هرکدام از تصاویر بیست گانه (۱/۲۵ ثانیه)، با استفاده از امکان انتخاب تصویرهای متناوب و منظم و با درشت نمایی $\times 10$ بدست آمده است. مجموعه تصاویر نشاندهنده نوع و میزان حرکت اسپرم در این ناحیه میباشد. اسپرم این ناحیه تغییرات مشخصه حرکتی را که در انعطاف کمتر تاژک و تبدیل حرکت دورانی به حرکت مستقیم را نشان میدهد.

این نوع حرکت دم، موجب افزایش حرکت پیشرونده اسپرم در ناحیه انتهایی cauda شده است (تصویر ۱ الی ۱۶ شکل ۷)، که گرفتن و نمایش تصویر این ناحیه بواسطه سرعت زیاد حرکت اسپرم بسیار مشکلتر از نواحی دیگر اپیدیدیم بود.



شکل ۷- نمایش پارامترهای حرکتی اسپرم ناحیه انتهایی cauda اپیدیدیم رت توسط نرم افزار تصویری ۱/۵۲ در این شکل تصاویر حرکت یک اسپرم رت از ناحیه انتهایی cauda دیده میشود. هرکدام از تصاویر هجده گانه (۱/۲۵ ثانیه) با استفاده از امکان انتخاب تصاویر متناوب و منظم و با درشتنمایی $\times 4$ بدست آمده است.





شکل ۸- آنالیز حرکتی اسپرم ناحیه انتهایی caput اپیدیدیم رت در روند بلوغ خارج از بدن

اسپرم ناحیه انتهایی caput اپیدیدیم رت بمدت ۲۴ ساعت، در سه موقعیت مختلف زیر انکوبه شد. [a] کشت سه روزه اپیتلیال اپیدیدیم رت از ناحیه caput و corpus، [b] محیط کشت برداشته شده از کشت فوق الذکر، [c] محیط کشت به تنهایی. حرکت اسپرم در موارد متنوع فوق در طول مدت انکوباسیون CASA اندازه گیری شد. اسپرم در حضور سلولهای کشت داده شده اپیدیدیم، افزایش حرکت معنی داری را (۰/۱/۰ < p) در حرکت پیشرونده VCL، از خود نشان داد. اسپرم انکوبه شده در محیط کشت به تنهایی، پس از این مدت زمان ۲۴ ساعته بی حرکت بود. در حالیکه اسپرم اینکوبیت شده در محیط کشت برداشته شده از کشت سلولهای اپیتلیال، تغییری در افزایش و یا کاهش حرکت را پس از مدت زمان ۲۴ ساعته انکوباسیون مشاهده نشد.

ناحیه ابتدایی corpus با اندازه گیری بوسیله CASA در آماده سازی های متعدد در شکل ۸ و ۹ بترتیب ارائه شده است.

اسپرم ناحیه انتهایی Caput در حضور کشت اپیتلیال اپیدیدیم، بمیزان قابل توجهی افزایش حرکت را در مدت انکوباسیون از خود نشان داد.

در حالیکه در conditioned medium، اسپرم ناحیه انتهایی Caput، تنها حرکات ابتدایی را در مدت انکوباسیون از خود نشان داد و جالب توجه اینککه همین اسپرم در محیط کشت معمولی، پس از انکوباسیون بدون حرکت بود.

مشاهدات بر روی هم کشتی اسپرم ناحیه ابتدایی corpus تقریباً مشابه آنچه در قسمت انتهایی caput گفته شد، بود.

ولی تنها تغییرات حرکتی اسپرم در این ناحیه و در مجاورت کشت سلولهای اپیتلیال، بسیار بهتر از ناحیه انتهایی caput بود.

شکل ۹- آنالیز حرکتی اسپرم ناحیه ابتدایی corpus اپیدیدیم رت در روند بلوغ خارج از بدن

اسپرم ناحیه ابتدایی corpus اپیدیدیم رت بمدت ۲۴ ساعت، در سه موقعیت [a] و [b] و [c] مشابه آنچه در شکل ۸ آمد، انکوبه شد. حرکت اسپرم در موارد متنوع فوق و در طول مدت انکوباسیون بوسیله CASA اندازه گیری شد. اسپرم ناحیه ابتدایی corpus در حضور سلولهای کشت داده شده اپیدیدیم، افزایش حرکت معنی داری را (۰/۰۰۰۱/۰ < P) در حرکت پیشرونده VCL از خود نشان داد. اسپرم انکوبه شده در محیط کشت پس از ۲۴ ساعت، بی حرکت بود. در حالیکه اسپرم انکوبه شده در conditioned medium پارامترهای حرکتی خود را پس از زمان ۲۴ ساعت حفظ نمود.

بحث

در این مطالعه از یک سیستم جدید CASA، برای نمایش تغییرات حرکت اسپرم، همزمان با بلوغ آن در داخل بدن، در اپیدیدیم و پس از بلوغ و انزال و همچنین همزمان با بلوغ آن در آزمایشگاه با انکوباسیون بر روی سلولهای اپیتلیال اپیدیدیم و محیط کشت، استفاده شد.

این نکته پذیرفته شده و بدیهی است که نتایج بدست آمده توسط CASA، بستگی به چگونگی

می نماید ولی وقتی که اسپرم در بین لام و لامل و با عمق تقریبی $60 \mu\text{m}$ و در زیر روغن قرار گیرد، این عمق احتمالاً برای حرکت آزاد اسپرم بمدت نسبتاً طولانی کافی به نظر میرسد. اگرچه مقادیر حرکتی بطور محسوسی در اسپرم موجود در قطره محیط کشت (droplet) که عمق آن بیش از $200 \mu\text{m}$ است، افزایش می یابد.

این موضوع ممکن است بیانگر این مطلب باشد که روش لام و لامل (coverslip) موجب محدود نمودن حرکت اسپرم میشود. اگرچه فاکتورهای دیگری نظیر تبادلات گازی نیز ممکن است بر تحرک اسپرم اثر گذارد.

آنالیز تصویری با استفاده از trail draw و نرم افزارهای تصویری مورد استفاده در این بررسی بیانگر این مطلب است، که بلوغ حرکتی اسپرم اپیدیدیم رت در سه فاز مختلف صورت می پذیرد. فاز اول از ناحیه ابتدایی اپیدیدیم (Initial segment) تا ناحیه انتهایی caput، که اسپرم حرکت تنظیم نشده و غیر متقارن تاژک را بدست میآورد. و این یک حرکت غیرپیشرونده و با زدن دم در پهنای وسیع آن است. فاز دوم از ابتدای ناحیه corpus، و این فاز، بوسیله حرکت کاملاً دایره ای اسپرم شناخته شده است. این حرکت انعکاس حرکت ناقص تاژک در قسمت انتهایی دم است. حرکت دایره ای اسپرم برای عبور از ناحیه اتصال رحم به لوله ها، در اسپرم رت (۸) و اسپرم هامستر (۱۲)، کافی بنظر نمی رسد. فاز سوم بوسیله افزایش حرکت پیشرونده اسپرم و شروع آن از اسپرمهای ناحیه انتهایی corpus مشاهده می شود. تغییرات ناشی از استحکام و سختی تاژک در اسپرمهای این ناحیه، احتمالاً مربوط به اکسیداسیون پل های دی سولفید، در قسمت انتهایی فیبرها است. این تغییر میتواند زمینه حرکت پیشرونده را همچنانکه در هامستر نیز مشاهده شده است (۲۳و ۲۴)، فراهم آورد.

تنظیم الکترونیکی آن دارد (۱۳) و لذا میتواند تأثیر مشخصی را بر نتایج آنالیز بگذارد. این تنظیم الکترونیکی، مشخص کننده این مطلب است که، آیا اسپرم بخوبی توسط CASA شناسایی شده است؟ اینکه چگونه اسپرم بعنوان یک متحرک توسط CASA تشخیص داده میشود؟ و اینکه آیا تنظیم دقیق جهت ردیابی پارامترهای مختلف حرکتی اسپرم صورت گرفته است؟

این تنظیم الکترونیکی براساس پارامترهای عملکردی انواع مختلف CASA، متنوع و همچنین بستگی به نوع اسپرم حیوانی دارد که مورد آنالیز قرار می گیرد. در حال حاضر سیستم های متنوعی از CASA در حال ارزشیابی هستند. استراتژی مشخصی که برای ردیابی اسپرم توسط CASA استفاده میشود، متنوع و بستگی به امکانات و توانایی های استفاده ساختمانی آن دستگاه ها دارد. برای HST، تنظیم دقیق بر اساس ردیابی بدون انقطاع اسپرم و همچنین عدم تداخل ردیابی حرکت دو اسپرم، صورت میپذیرد.

در CASA معمولاً بطور طبیعی از برخورد تابش نور بر سر قرینه اسپرم و با موقعیت فاز کنتراست میکروسکوپ، استفاده می شود. مشکل وقتی ایجاد میشود که اسپرم، با سر غیر قرینه، نظیر اسپرم رت مورد بررسی قرار می گیرد. علاوه بر آن، قطره سیتوپلاسمی که معمولاً در اسپرم های نواحی ابتدایی اپیدیدیم و قبل از بلوغ کامل اسپرم و در کنار سر اسپرم دیده می شود، منجر به ارائه نتایج غیر واقعی می گردد. ولی با

HST (Hobson Sperm Trachor)، امکان فائق آمدن بر این مشکلات، با تنظیم دقیق آستانه وجود دارد.

حرکت اسپرم به عمق نمونه تهیه شده نیز بستگی دارد (۱۱). اگر خیلی عمیق باشد، حرکت تاژک اسپرم تغییر نموده و اسپرم در ابعاد مختلف حرکت

حرکت پیشرونده میتواند زمینه عبور اسپرم را از اتصال رحم به لوله ها و نفوذ اسپرم در زوناپلوسیدا و اتصال اسپرم با ویتلوس را (۲۲)، فراهم آورد. مطالعات دیگر نیز نشان داده است که قدرت باروری اسپرم رت در آزمایشگاه بستگی مستقیمی به VSL دارد (۱۶).

توجه به این نکته بسیار جالب و با اهمیت است که تغییرات در حرکت اسپرم اپیدیدیم و بلوغ آن، نیز میتواند در آزمایشگاه انجام شود، و آن وقتی است که اسپرم اپیدیدیم در مجاورت کشت اپیتلیال اپیدیدیم قرار گیرد (۲). مطالعات نشان داد که باقی ماندن اسپرم در قسمت اولیه اپیدیدیم بدلائل انسدادی، نتوانسته است موجب افزایش حرکت پیشرونده اسپرم شود.

این نکته بیانگر این مطلب است که فاکتورهای مربوط به اپیتلیوم اپیدیدیم برای بلوغ اسپرم بسیار بااهمیت هستند. این ایده همچنین با انجام هم کشتی اسپرم هامستر با سلولهای اپیتلیال اپیدیدیم، که نتایج مفیدی بر بلوغ حرکتی اسپرم و زنده ماندن آن در آزمایشگاه داشته اند، نشان داده شده است، محیط کشت برداشته شده از کشت سلولهای اپیتلیال اپیدیدیم (conditioned medium) نیز برای این بلوغ مفید است و نشان دهنده این مطلب است که ترشحات اپیتلیال اپیدیدیم مسئول تأثیرات این بلوغ اسپرم هستند (۱۶).

محیط کشت به تنهایی هیچ تأثیری بر بلوغ حرکتی اسپرم نداشته و حتی امکان زنده نگه داشتن اسپرم اپیدیدیم را در مدت زمان مشابه هم کشتی های فوق نداشته است.

References

1. Akhondi, M., Chapple, C. and Moore H.D.M. Prolonged survival of human spermatozoa when co-incubated with epididymal cell cultures. *Human Reproduction*. 1997; 12:514-522
2. Bedford, J. M. Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. *Journal of Experimental Zoology*. 1967; 166: 271-282.
3. Bedford, J. M. and Yanagimachi, R. Initiation of sperm motility after mating in the rat and hamster. *Journal of Andrology*. 1992; 13: 444-9.
4. Chapin, R. E., Methods for assessing rat sperm motility. *Reproductive Toxicology*. 1992; 6:267-273.
5. Cooper, T. G. The epididymis, sperm maturation and fertilization. 1986; (Heidelberg: Springer-Verlag).
6. Cornwall, G. A., Induction and enhancement of progressive motility in hamster caput epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 1986; 35: 1065-1074.
7. Dostal LA, Faber CK, Zandee Sperm motion parameters in vas deferens and cauda epididymal rat sperm. *J Reprod Toxicol*. 1996; 10(3):231-5.
8. Gaddum-Rosse, P. Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat *American Journal of Andrology*. 1981; 160:333-341.
9. Hinton, B. T., Measurement of the motility of rat spermatozoa collected by micropuncture from the testis and from different regions along the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1979; 55: 167-172.
10. Holt, W. V., The value of sperm swimming speed measurements in assessing the fertility of human frozen semen. *Human Reproduction*. 1988; 4: 292-297.
11. Katz, D. F. and Davis, R. O. Automatic analysis of human sperm motion. *Journal of Andrology*. 1987; 8: 170-181.
12. Kann, M.L. and Raynaud, F. In vitro fertilization after initiation of sperm motility in the hamster - epididymis. *Reproduction, Nutrition and Development*. 1982; 22: 455-463.
13. Knuth, U. A., Computerized semen analysis: Objective measurement of semen characteristics is biased by subjective parameter setting. *Fertility and Sterility*. 1987; 48: 118-124.
14. Moore, H. D. M. The epididymis. In *Scientific Foundation of Urology*, G. D. Chisholm and W. R. Fair, eds. London: (Heinemann). 1990; pp. 399-410.
15. Moore, H.D.M. and Akhondi, M. A. 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*. 1996; 17(1):50-60.
16. Moore, H. D. M. and Akhondi, M. A. The in vitro maturation of mammalian spermatozoa. In *Reviews of Reproduction*. 1996.
17. Slott VL, Suarez JD, Poss PM, Linder RE, Strader LF, Perreault SD. Optimization of the Hamilton-Thorn computerized sperm motility analysis system for use with rat spermatozoa in toxicological studies *Fundam Appl Toxicol*. 1993; 21(3):298-307.
18. Slott VL, Suarez JD, Perreault SD. Rat sperm motility analysis: methodologic considerations *Reprod Toxicol*. 1991; 5(5):449-58.
19. Toth GP, Stober JA, Zenick H, Read EJ, Christ SA, Smith MK. Correlation of sperm motion parameters with fertility in rats treated subchronically with epichlorohydrin *Journal Androl*. 1991; 12(1):54-61.
20. Turner, T. T. and Giles, R. D. The effects of carnitine, glycerylphosphorylcholine, caffeine and egg yolk on the motility of rat epididymal spermatozoa. *Gamete Research*. 1981; 4:283-295.
21. Yeung, C. H., Characterization of the motility of maturing rat spermatozoa by computer-aided objective measurement. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1992; 96: 427-41.
22. Yanagimachi, R. Mammalian fertilisation. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J. D. Neill, eds. (New York: (Raven Press). 1994; pp: 189-317.
23. Yeung, C. H., Maturation of hamster epididymal sperm motility and influence of the thiol status of hamster and rat spermatozoa on their motility patterns. *Molecular Reproduction and Development*. 1994.