بررسی اثر دوزهای متفاوت هیالورونان بر مورفولوژی، موتیلیتی، ویتالیتی و میزان لقاح اسپرم های موش سوری

سیروس صیادی[۱]
دکتر محمد اکبری[۱]
دکتر علیقلی سبحانی[*۱]
دکتر فرید ابوالحسنی[۱]
نسرین تک زارع[۱]
دکتر پریچهر پاسبخش[۱]

۱. بخش آناتومی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به این که هیالورونان نقش مهمی در نفوذ پذیری، موتیلیتی اسپرم و عمل متقابل گامت ها دارد و این عمل می تواند نقش مهمی در میزان باروری افراد داشته باشد، در تحقیق حاضر اثر دوزهای ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ میکرو گرم در میلی لیترهیالورونان روی عوامل مورفولوژی، موتیلیتی، ویتالیتی و میزان لقاح اسپرم های موش سوری مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تعداد ۴۰ سر موش (۲۰ سر نر و ۲۰ سر ماده) به صورت تصادفی انتخاب شدند. اسپرم های به دست آمده از هر حیوان نر به چهار گروه تقسیم شدند که یکی از آن ها به عنوان گروه کنترل (درمحیط کشتRPMI ، فاقد هیالورونان)، گروه های دوم، سوم و چهارم به مدت ۲ ساعت به ترتیب در معرض دوزهای ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر هیالورونان قرار گرفتند. بعد از انکوباسیون، شمارش اسپرم ها با استفاده از لام نئوبار، مورفولوژی آن ها توسط رنگ آمیزی پاپانیکولا و بررسی ویتالیتی آن ها با رنگ آمیزی فوق حیاتی ائوزین B مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین موتیلیتی اسپرم ها با مشاهده میکروسکوپی طبق استاندارد WHOو میزان لقاح آن ها بعد از IVF با شمارش جنین های دو سلولی حاصل از آن بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد که دوز ۷۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر، بیشترین تاثیر را روی موتیلیتی، ویتالیتی و میزان لقاح اسپرم ها دارد، تاثیر دوز ۱۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر بر روی عوامل فوق نیز مثبت بود اما از دوز ۷۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر پایین تر بود. تاثیر دوز ۱۲۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر بر روی عوامل فوق منفی بود و در این مطالعه هیچ تاثیری از دوزهای فوق الذکر هیالورونان روی مورفولوژی اسپرم ها مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته های این مطالعه، به نظر می رسد که دوز مناسب هیالورونان (۷۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر) باعث افزایش تحرک، ویتالیتی و میزان لقاح در طی فرایند IVF می شود.

کلمات کلیدی: هیالورونان، موتیلیتی اسپرم، مورفولوژی اسپرم ، IVF

* ***نشانی***: تهران، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی، تلفن: ۷۷۵۳۶۵۸۶،
پست الکترونیک:sobhani@sina.tums.ac.ir

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]

مقدمه

هیالورونان یا هیالورونیک اسید (Hyaluronic acid) برای اولین بار در موکوس جسم زجاجیه چشم یافت گردید [۱]. ساختارهای استخراج شده از آن، یک گلیکوزآمینوگلیکان اسیدی را آشکار کردند که از یک دی ساکارید تکراری -1,3N acetylglucosamine-ß1,4 و D-glucuronic acid ß تشکیل شده است که در خارج از بدن به صورت یک پلی آنیون یافت می شود [۲]. سنتز هیالورونان برای اولین بار در باکتری استرپتوکوک پیوژن (SPHAS) مشخص شد [۳]. بـعدا سه آنزیم Hyaluronan (HAS3,HAS2,HAS1) 1, 2, 3 santetas و تمام همولوگ های آنزیم استرپتوکوکی و با درجه کمتری سنتز کیتین در مهره داران از جمله انسان و موش و جوجه و گزنوپوس یافت شدند [۴ , ۵]. اخیرا یک نوع HAS کاملا متفاوت در باکتری پاتوژنیک Pasteurella Multocida مشخص شده است که دارای دو دامنه جداگانه می باشد که همولوگ هایی از گلیکوزیل ترانسفرازها می باشند. در این ارگانیسم ها سنتز هیالورونان در انتهای تغییر نیافته زنجیره رشد اتفاق می افتد [۶].

ده سال پیش با کشف دو گیرنده هیالورونان در سطح سلول یعنی CD44 [۷] و RHAMM1 [۸]، برای نخستین بار نقش هیالورونان در تنظیم مستقیم موتیلیتی، مهاجرت و نفوذ پذیری سلول مشخص شد [۹].

هیالورونیک اسید که به طور فراوان در ماتریکس خارج سلولی کومولوس اووفروس وجود دارد، در تسهیل عمل لقاح نقش داشته، تعدادی از اعمال اکروزوم را بعد از اتصال اسپرم به زونا پلاسیدا افزایش می دهد [۱۰] و در تکامل اووسیت های بالغ و لقاح یافته در مرحله بلاستوسیت نقش دارد [۱۱]. هیالورونان به عنوان یک ترکیب مهم در نفوذ پذیری اسپرم و عمل متقابل گامت ها دخالت دارد ، نقش مهمی در تحرک اسپرم بازی می کند و در انتخاب اسپرم در محیط کشت برای ایزوله کردن اسپرم های متحرک در عمل IVF به کار می رود. علاوه بر آن، افزایش فسفریلاسیون را به خوبی فسفریلاسیون In vivo با HABP1 نشان می دهد که در اسپرم های فاقد حرکت این عمل اتفاق نمی افتد [۱۲]. از آنجایی که تحرک اسپرم یک عامل مهم در عمل لقاح می باشد، لذا هیالورونان می تواند به عنوان یک عامل افزایش دهنده تحرک اسپرم در لقاح مطرح باشد [۱۲].

هیالورونان، اسپرم های ذوب شده را در طی تکامل In vitro محافظت می کند و پایداری واستحکام غشای آن را بعد از انجماد بر عهده دارد. گزارش شده است که اضافه نمودن هیالورونان به محیط کشت می تواند پلی اسپرمی را در طول IVF کاهش دهد [۱۳] که این اثر احتمالا مربوط به توانایی آن در به تاخیر انداختن توان یابی اسپرم و عمل اکروزوم باشد. با توجه به این که گیرنده های هیالورونان در ورود هیالورونان به داخل سلول موثر هستند و این گیرنده ها محدود می‌باشند به نظر می رسد تاثیر پذیری اسپرم ها از هیالورونان وابسته به دوز باشد و نیز با توجه به این که هیالورونان نقش مهمی در موتیلیتی اسپرم ها دارد و این امر می تواند نقش مهمی در میزان باروری افراد داشته باشد، لذا می توان نتیجه گرفت که یک دوز مناسب از هیالورونان برای افزایش تحرک اسپرم لازم است [۱۴]؛ اما تا بحال دوز مناسب آن مشخص نشده است، هم چنین این که دوزهای مختلف هیالورونان می تواند بر روی موتیلیتی، مهاجرت و نفوذپذیری اسپرم ها موثر باشند و یا دوز های مورد نظر می توانند طبق رنگ آمیزی مرسوم اسپرم ها (رنگ آمیزی پاپانیکولا) بر روی مورفولوژی اسپرم نقش متفاوت داشته باشند نیز دقیقا معلوم نیست. لذا در تحقیق حاضر اثر دوزهای ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیالورونان بر میزان مورفولوژی، موتیلیتی، ویتالیتی و میزان لقاح اسپرم های موش سوری در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]

روش بررسی

برای این کار تعداد ۴۰ سر موش نژاد سوری (۲۰ سر نر و۲۰ سر ماده) به صورت تصادفی انتخاب شدند، سپس نمونه های اسپرمی تهیه شده ازهر موش نر به ۴ گروه به شرح زیر تقسیم بندی شد: گروه ۱ (کنترل) نمونه هایی بودند که تنها در معرض محیط RPMI قرار گرفتند و هیچ دوزی از هیالورونان به این محیط اضافه نشد. گروه های ۲، ۳ و ۴ نمونه هایی بودند که به مدت ۲ ساعت به ترتیب در معرض دوزهای ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیالورونان قرار گرفتند. سپس تعداد (غلظت) اسپرم ها در هر گروه با استفاده از لام نئوبار شمارش شد. برای تعیین موتیلیتی، اسپرم ها در چند میدان میکروسکوپی مشاهده شده و سرعت آن ها با استفاده از درجات قراردادی سازمان بهداشت جهانی (WHO) که سرعت حرکت اسپرم ها را در چهار گروه به شرح زیر طبقه بندی می کند، به دست آمد: ۱- اسپرم های فاقد حرکت، ۲- اسپرم هایی که دم هایشان تکان می خورد ولی حرکت رو به جلو ندارند، ۳- اسپرم هایی که در مسیری منحنی و پیچ دار و با سرعت آهسته در مسیر مستقیم به طرف جلو حرکت می کنند و ۴- اسپرم هایی که به طور سریع در مسیر مستقیم به طرف جلو شنا می کنند.

برای مشخص کردن درصد اسپرم های زنده، از رنگ آمیزی فوق حیاتی آئوزین استفاده شد. برای این منظور یک قطره از نمونه اسپرم بر روی یک لام تمیز قرار داده و روی آن یک قطره از رنگ فوق اضافه شد (باید توجه شود که اندازه قطره آئوزین حدود یک سوم قطره نمونه اسپرم باشد زیرا افزایش آن می تواند باعث مرگ اسپرم ها شود)، سپس نمونه و رنگ را به سرعت (برای جلوگیری از مرگ اسپرم های زنده) با هم مخلوط کرده، روی لام قرار داده بعد از گذاشتن لامل با بزرگنمایی ۴۰ مشاهده شد. در زمان رنگ آمیزی اگر اسپرم ها زنده باشند، رنگ ائوزین را به خود نمی گیرند، در نتیجه قسمت سر و تنه آنها رنگ روشن تری خواهد داشت (سبز روشن) در حالی که اسپرم های مرده به دلیل نقص در غشای پلاسمایی خود، رنگ ائوزین را به خود گرفته و سر آن ها به رنگ قرمز در می آید. با محاسبه تعداد اسپرم های رنگ نگرفته به کل تعداد اسپرم های موجود، درصد اسپرم های زنده به دست آمد. این کار ۳ بار تکرار و سپس میانگین نتایج به صورت جدول ثبت گردید.

مورفولوژی اسپرم را می توان در نمونه تازه و با میکروسکوپ فاز کنتراست در ۱۰۰ عدد اسپرم مورد ارزیابی قرار داد. تا به حال بهترین روش برای تشخیص مورفولوژی نرمال از غیر نرمال، استفاده از رنگ آمیزی پاپانیکولا بوده است که به تازگی در این رابطه نظرات ضد و نقیضی ارائه شده اند [۱۵]، اما با توجه به این که هنوز هم در آزمایشگاه های جنین شناسی به طور معمول از این روش استفاده می شود، لذا در تحقیق حاضر هم از رنگ آمیزی فوق استفاده شد.

IVF با اسپرم های مورد آزمایش

برای دست یابی به اووسیت های متافاز II ، ابتدا ۱۰ واحد PMSG داخل صفاقی به موش های نژاد سوری تزریق شد و بعد از ۴۸ ساعت، ۱۰ واحد HCG به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. روز بعد با استفاده از جابجایی مهره های گردنی، موش ها کشته شدند. بعد از باز نمودن ناحیه شکم، لوله رحم را که در بین انتهای هر یک از شاخ های رحم و تخمدان طرف مربوطه قرار داشت جدا نموده ودر زیر میکروسکوپ معکوس اووسیت های متافاز II با پاره کردن لوله های رحم از داخل آن خارج شدند.

نمونه اسپرم ها به مدت ۲ ساعت در داخل انکوباتور Co2 انکوبه شدند تا ظرفیت پذیری را به دست آورند و اووسیت های مرحله متافاز II را در قطرات محیط کشت T6 قرار داده بعد اسپرم ها به محیط حاوی اووسیت متافاز II اضافه گردیدند و به مدت ۶-۴ ساعت در انکوباتور Co2 انکوبه

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]

شدند. سپس جهت شستشو، اووسیت ها به محیط کشت جدید منتقل شدند تا اووسیت های لقاح یافته در محیط کشت جدید (حاوی مواد غذایی کافی) رشد نموده و به مرحله دو سلولی برسند. در نهایت در صبح روز بعد، تعداد جنین های دو سلولی را شمارش نموده و از این طریق میزان لقاح در هر یک از گروه‌های آزمون و کنترل محاسبه گردید.

در این مطالعه برای مقایسهٔ گروه‌های آزمون با گروه کنترل، از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری t-test استفاده شد.

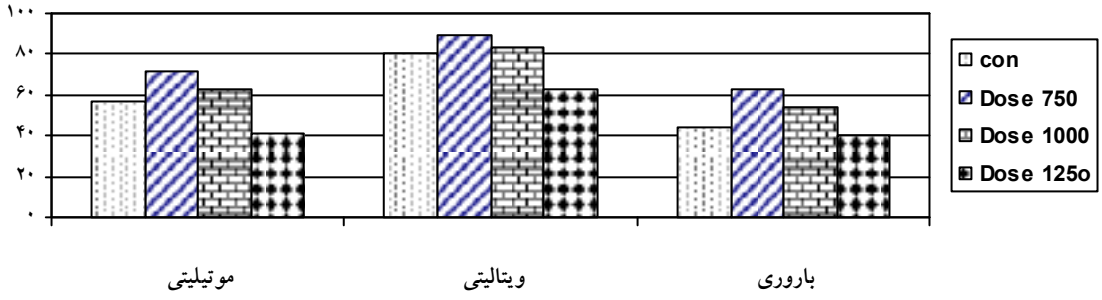
یافته ها

با توجه به این که اسپرم های با موتیلیتی درجهٔ ۳و۴ در فرایند لقاح موثر هستند، لذا در تحقیق حاضر میانگین مجموع موتیلیتی درجهٔ ۳ و۴ اسپرم ها به عنوان موتیلیتی کل در نظر گرفته شد.

میانگین موتیلیتی در گروه کنترل ۵۶/۰۶ و در گروه های آزمون ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۷۱/۸۰۰، ۶۲/۴۵۰ و۴۲/۱۰ بود که این اختلافات از نظر آماری در گروه ۱ با P= ۰/۰۰۰ و در گروه ۲ با P= ۰/۰۰۴ معنی‌دار بود، یعنی هر دوی این گروه‌ها دارای اثر مثبت روی موتیلیتی اسپرم ها بودند. در گروه ۳ نیز P= ۰/۰۰۰ بود اما اثر این گروه معکوس بود (نمودار ۱).

میانگین ویتالیتی در گروه کنترل ۸۰/۳۰ و در گروه های آزمون ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۸۹/۰۵، ۸۳/۷۰۰ و۶۳/۰۵ بود که این اختلاف ها نیز از نظر آماری در گروه ۱ با P= ۰/۰۰۰ و در گروه ۲ با P= ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود، یعنی هر دوی این گروه‌ها دارای اثر مثبت روی ویتالیتی اسپرم‌ها بودند. در گروه ۳ نیز P= ۰/۰۰۰ بود اما اثر این گروه در مقایسه با کنترل معکوس بود (نمودار ۱).

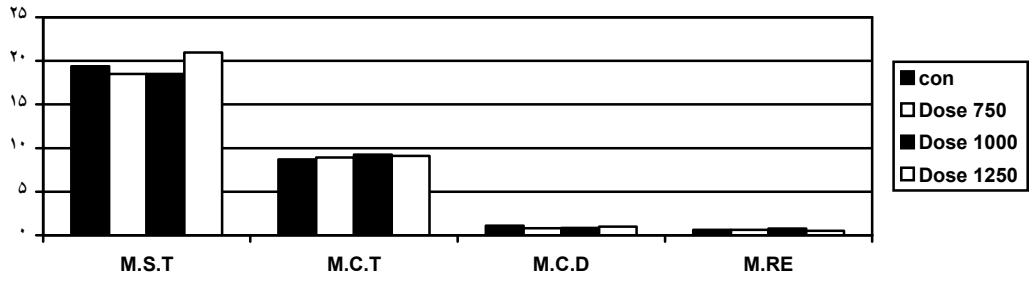
میانگین باروری در گروه کنترل ۴۳/۶۵۰ و در گروه های آزمون ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۶۳/۲۰۰، ۵۴/۱۰ و۴۰/۳۰۰ بود که این اختلاف ها از نظر آماری در گروه ۱ و۲ با P= ۰/۰۰۰ معنی‌دار بود، یعنی هر دوی این گروه ها دارای اثر مثبت روی باروری اسپرم‌ها بودند. در گروه ۳ نیز P= ۰/۰۰۰ بود اما اثر این گروه معکوس بود (نمودار ۱)



نمودار ۱- مقایسه میانگین باروری، ویتالیتی و موتیلیتی در گروه‌های کنترل با آزمون

. از مقایسهٔ میانگین عوامل مورفولوژی اسپرم‌ها (Stumped tail, Coiled tail, Cytoplasmic Droplet , Remanent) در گروه کنترل با گروه‌های آزمون ۱، ۲ و ۳ مشخص شد که هیالورونان اثر معنی‌داری روی عوامل مذکور ندارد (نمودار۲).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]



نمودار ۲- مقایسه میانگین عوامل مورفولوژی در گروه های کنترل با آزمون

Morphology =M Remanent = RE, Stumped tail = S.T, Coiled tail = C.T, Cytoplasmic Droplet = C.D,

بحث

هیالورونان یا هیالورونیک اسید، بر اعمال فیزیولوژیکی مهم اسپرماتوزوا مانند نفوذ پذیری و موتیلیتی نقش مهمی دارد [۱۶]. در تحقیق حاضر مشاهده شد که دوز ۷۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیالورونان بر موتیلیتی اسپرم تاثیر مثبتی داشته و باعث افزایش آن در حد بالایی (P= ۰/۰۰۰) می‌گردد و نیز مشخص گردید که دوز ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تاثیر فزاینده‌ای روی عامل فوق داشته اما تأثیر این دوز از تأثیر دوز ۷۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر کمتر بوده است. در هر صورت تاثیر این دوز با P= ۰/۰۰۴ بالاتر از گروه کنترل می باشد، اما تاثیر دوز ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر عامل موتیلیتی نه تنها فزاینده نبوده بلکه باعث کاهش آن در مقایسه با گروه کنترل گردیده است. در این زمینه Pena و همکارانش در سال ۲۰۰۴ تاثیر دو دوز متفاوت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیالورونان را بر موتیلیتی اسپرم خوک مطالعه کرده و گزارش نمودند که دوز ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، موتیلیتی اسپرم ها را ۹/۴٪ و دوز ۱۰۰۰ موتیلیتی اسپرم ها را ۳۰٪ افزایش می دهد [۱۳]. نتیجه حاصل از مطالعهٔ محققین فوق با دوز ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر با نتیجهٔ حاصل از مطالعهٔ حاضر با دوز مذکور مطابقت دارد. اما Pena و همکارانش در مطالعه خود تاثیر دوز ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیالورونان را مطالعه کرده و تاثیر آن را کمتر از دوز ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش نمودند، در صورتی که در تحقیق حاضر، روی دوز ۷۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیالورونان مطالعه شد و تاثیر آن بیشتر از دوز ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. علاوه بر دو دوز ذکر شده در این مطالعه، دوز ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز بررسی و مشاهده شد که دوز اخیر نه تنها تأثیر مثبتی روی موتیلیتی اسپرم‌ها ندارد؛ بلکه تاثیر معکوس روی عامل فوق دارد [۱۳]. باید توجه داشت که سازوکار اثر هیالورونان بر روی موتیلیتی اسپرم‌ها به این صورت است که در سطح سلول دو گیرندهٔ شناخته شدهٔ هیالورونان به نام‌های CD_{44} و (Receptor for RHAMM hyaluronan–Mediated Motility) وجود دارند [۷ و ۸] که هیالورونان با عمل متقابل خود با این گیرنده‌ها و افزایش فسفوریلاسیون پروتئین‌های اتصالی هیالورونان، تحرک اسپرم را میانجیگری می کند (که این افزایش فسفوریلاسیون ابتدا در دم اسپرم اتفاق می افتد) [۱۷] و در نهایت باعث افزایش Ca^{+2} داخل سلولی می گردد. هیالورونان عمل افزایش Ca^{+2} داخل سلولی را در اسپرم به واسطه تاثیر متقابل با غشای پلاسمایی PH-20 انجام می دهد، بدین طریق که هیالورونان متصل به غشای پلاسمایی PH-20 باعث تجمع

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]

رسپتورهایی که در انتقال سیگنال‌های داخل سلولی نقش دارند می‌شود در نتیجه اسپرم سطح بالایی از Ca^{+2} در داخل سلول و رسپتورهای زیادی در سطح نشان می‌دهد که باعث افزایش عمل اکروزم بعد از اتصال به زوناپلاسیدا می‌شوند [۱۸]. لذا به نظر می‌رسد که دوز معینی از هیالورونان می‌تواند بیشترین تأثیر را روی موتیلیتی اسپرم داشته باشد. در این رابطه اعمالی که برای گیرنده هیالورونان CD_{44} شناسایی شده‌اند عبارتند از ۱– CD_{44} به لیگاندهای متعددی متصل می‌شود و در مخابره کردن عوامل رشد شرکت می‌کند [۱۹] ۲– با افزایش هیالورونان ماتریکس خارج سلولی، لازم است که هیالورونان به سطوح سلول لنگر بیاندازد که این عمل در بیشتر موارد توسط CD_{44} میانجیگری می شود [۲۰] ۳– CD_{44} نقش بزرگی در برقراری ارتباط سلول با ماتریکس خارج سلولی بازی می‌کند و تحت بعضی شرایط می‌تواند آندوسیتوز هیالورونان را میانجیگری کند برای مثال در طی مورفوژنز بافت‌هایی مانند ریه، پوست، غضروف و در طی رشد استخوان‌های دراز [۲۱]. مهمترین عملی که برای گیرندهٔ جدید هیالورنان یعنی RHAMM موجود در سطح اسپرم بیان می‌شود، افزایش تحرک اسپرم توسط این گیرنده در پاسخ به هیالورونان می‌باشد [۲۲]. یک پروتئین اتصالی هیالورونان به نام $HABP_1$ نیز در سطح اسپرم انسان وجود دارد که این پروتئین در سطح اسپرم بیماران الیگواسپرمی و آسیتنوزواسپرمی در مقایسه با افراد نورمواسپرمی کاهش نشان می‌دهد و این پروتئین وقتی که با هیالورونان اتصال پیدا می‌کند، فعال می‌شود [۱۲]. سازوکارهایی که به وسیله آن‌ها هیالورونان وارد شده شکسته می‌شود، به طور کامل مطالعه نشده‌اند اما احتمالاً هیالورونیداز آندروزومال و لیزوزمال در این کار دخالت دارند [۲۳]. در بعضی شرایط هیالورونان در خارج سلول به وسیلهٔ هیالورونیداز خارج سلولی تجزیه می‌شود. برای مثال هیالورونیداز (PH20) به وسیلهٔ یک لنگر گلیکوفسفاتیدیل‌انیوستول به سطح اسپرم متصل می‌شود و در نفوذ اسپرم از میان هیالورونان فراوان ماتریکس احاطه کننده تخمک، میانجی‌گری می‌کند، بنابراین وجود آن برای لقاح موفقیت‌آمیز ضروری است [۲۴]. هیالورونیداز خارج سلولی شبیه هیالورونیداز یافت شده در غدهٔ زهر زنبور است [۲۵]. به غیر از این نتایج، Hall و همکارانش طی مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۴ روی گیرنده‌های هیالورونان انجام دادند، گزارش نمودند که گیرنده‌های هیالورونان در ورود هیالورونان به داخل سلول موثر هستند و این گیرنده‌ها محدود بوده و با اضافه نمودن سطح بالایی از هیالورونان از خارج افزایشی در آن‌ها دیده نمی‌شود [۱۴]. لذا از نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات قبلی چنین استنباط می‌شود که یک مقدار و دوز مناسب از هیالورونان برای افزایش تحرک سلول لازم است که در این مطالعه دوز ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر را روی عامل فوق نشان داد. در این تحقیق تاثیر دوزهای مختلف هیالورونان (۷۵۰ ، ۱۰۰۰و ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) روی عامل ویتالیتی اسپرم‌ها نیز بررسی و مشاهده شد که دوز ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیالورونان روی ویتالیتی اسپرم ها تاثیر مثبتی داشته و باعث افزایش آن می‌گردد (P= ۰/۰۰۰). نیز مشخص گردید که دوز ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز تاثیر فزاینده‌ای روی عامل فوق داشته اما تاثیر این دوز از تاثیر دوز ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمتر بوده است (P= ۰/۰۰۱). اما تاثیر دوز ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی عوامل مذکور نه تنها فزاینده نبوده، بلکه باعث کاهش عامل فوق در مقایسه با گروه کنترل نیز گردیده است. در این زمینه در مطالعه‌ای که Pena و همکارانش در سال ۲۰۰۴ انجام دادند، گزارش کردند که هیالورونان اسپرم‌های ذوب شده را در طی تکامل In vitro محافظت کرده و باعث پایداری واستحکام غشای آن ها حتی بعد ازانجام عمل انجماد و ذوب مجدد آن ها می شود [۱۳]. اما مطالعه ای که روی تاثیر دوزهای مختلف هیالورونان بر عامل فوق انجام گرفته باشد تا به حال گزارش نشده است.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]

در این تحقیق، از مطالعه تاثیر دوزهای مختلف هیالورونان (۷۵۰ ، ۱۰۰۰و ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر عامل باروری اسپرم‌ها مشاهده شد که دوز۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیالورونان در باروری اسپرم‌ها تاثیر مثبتی داشته و باعث افزایش آن می‌گردد (P= ۰/۰۰۰) و نیز مشخص گردید که دوز ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز تاثیری مثبت بر عامل فوق داشته اما اثر آن از دوز ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمتر بوده است (P= ۰/۰۰۰). با این حال تاثیر دوز ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در عوامل مذکور نه تنها فزاینده نبوده، بلکه باعث کاهش آن در مقایسه با گروه کنترل نیز گردیده است. در مطالعه‌ای که Artken و همکارانش در سال ۱۹۹۲ انجام دادند، گزارش نمودند که هیالورونان (HA) فراوان موجود در ماتریکس خارج سلولی (ECM) کومولوس اووفروس در تسهیل لقاح موثر است. همچنین HA عمل لقاح را در بعضی گونه‌ها افزایش می‌دهد و نیز بیان کردند که هیالورونان عمل اکروزومی اسپرم را بعد از اتصال به زوناپلاسیدا افزایش می‌دهد [۱۸]. سازوکار تاثیر هیالورونان روی میزان لقاح همانند سازوکار تاثیر آن روی عامل موتیلیتی است زیرا موتیلیتی بیشتر اسپرم‌ها با میزان لقاح آن‌ها ارتباط مستقیم دارد لذا هیالورونان طبق سازوکار ذکر شده در قسمت موتیلیتی، باعث افزایش موتیلیتی و به طبع آن باعث افزایش میزان لقاح می‌شود. در این تحقیق اثر دوزهای ذکر شده روی عوامل مورفولوژی (Stumped tail, Coild tail, Cytoplasmic Droplet, Remanent) نیز مطالعه شد اما تاثیری معنی‌دار از آن‌ها روی عوامل مذکور مشاهده نشد که علت احتمالی آن ممکن است از این واقعیت نشأت گرفته باشد که مورفولوژی اسپرم‌ها متاثر از عوامل متفاوت در طی اسپرموژنزیس می‌باشد. از جمله این عوامل بلوغ آکروزوم و سازمان‌بندی کروماتین اسپرم می‌باشد که در هر دو عامل به نظر می‌رسد که هیالورونان بتواند این عوامل را تحت تاثیر قرار دهد و یافته‌های این تحقیق این امر را ثابت می کند. همچنین اخیرا در مطالعه‌ای که Cooper و همکاران او در مورد روش پاپانیکولا و اثر آن بر روی مورفولوژی اسپرم‌ها انجام دادند [۱۵]، گزارش کردند که احتمال دارد این رنگ‌آمیزی موجب پارگی غشای ظریف سلول اسپرم شده و روش ارزیابی صحیحی برای مورفولوژی اسپرم نباشد اما در حال حاضر هنوز هم در تمام آزمایشگاه‌های اسپرموگرام، از این روش استفاده می شود.

از نتایج به دست آمده در این مطالعه چنین استنتاج می‌شود که هیالورونان روی عوامل موتیلیتی، ویتالیتی و میزان لقاح اسپرم‌ها تاثیر وابسته به دوز دارد که در این مطالعه دوز ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین تاثیر مثبت بر موارد ذکر شده است. پیشنهاد می‌شود میزان هیالورونان فوق بعد از تست بر روی نمونه‌های اسپرم انسان و در صورت تایید جهت استفاده در انسان به کار گرفته شود

.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]

References

1. Meyer K, Palmer J. The polysaccharide of The vitreous humor. *J Biol Chem* 1934; 107: 629-634.
2. Weissmann B, Meyer K. Dynamical Theory of Crystal Lattices, The international series of monographs on physics. *J Am Chem Soc* 1954; 76: 1753-1757.
3. Deangelis PL, Papaconstantinou J, Weigel PH. Molecular cloning, identification and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A Streptococcus pyogenes. *J Biol Chem* 1993; 268: 19181-19184.
4. Meyer MF, Kreil G. Cells expressing the DG42 gene from early Xenopus embryossynthesize hyaluronan .*Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 4543-4547.
5. Spicer AP, McDonald JA. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem* 1998; 273: 1923-1932.
6. Deangelis PL. Molecular Directionality of Polys-accharide Polymerization by the Pasteurella mu-ltocida Hyaluronan synthase. *J Biol Chem* 1999; 274: 26557-26562.
7. Aruffo AO, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61: 1303-1313.
8. Hardwick C, Hoare K, Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, Cripps V, Austen L, Nance DM, Turley EA. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol* 1992; 117: 1343-1350.
9. Lokeshwar VB, SelzerM G. Hyaluronan Activates Cell Motility of v- Src-transformed Cells via Ras-Mitogen-activated Protein Kinase and Phosphoinositide 3-Kinase-Akt in a Tumorspecific Manner. *J Biol Chem* 2001; 275: 27641-27649.
10. Cherr GN, Yudin A, Li MW, Vines CA, Overstreet JW. Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. *Zygote* 1999; 7: 211-22.
11. Kano K, Miyano T, Kato S. Effects of glycosaminoglycans on the development of in vitromatured and-fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage in vitro. *Biol Reprod* 1998; 58: 1226-32.
12. Ilora G, Archana B, Kasturi D. Reduction in the level of hyaluronan binding protein 1(HABP1) is associated with loss of sperm motility. *Journal of Reproductive Immunology* 2002; 53: 45-54.
13. Pena FJ A, Johannisson M, Wallgren H, Rodriguez-Martinez. Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. *Therogenology* 2004; 61: 63-70.
14. Hall CL, Wang C, Lange LA, Turley EA. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinaseactivity. *J Cell Biol* 1994; 126: 575-588.
15. Cooper TG, Yeung CH, Fetic S, Sobhani A, Nieschlag E. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. *Hum Reprod* 2004; 19: 2283-8.
16. Tulsiani DR, Yoshida-Komiya H, Araki Y. Mammalian fertilization a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod* 1997; 57: 487-94.
17. Ranganathan S, Bharadwaj A, Datta K. Hyaluronan mediates sperm motility by enhancing phosphorylathon of proteins including hyaluronan binding protein. *Cell Mol Res* 1995; 41: 467-76.
18. Artken R, Bowie H, Buckingham D, Harkiss D Richardson DW, West KM. Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. *J Androl* 1992; 13: 44-54.
19. Herrlich P, Morrison H, Sleeman J, Orian-Rousseau V, Konig H, Weg-Remers S, Ponta H. CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 910: 106-118.
20. Tammi R, Saamanen AM, Maibach HI, Tammi M. Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epiderm-al and dermal compartments of human skin in organ culture. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 126-130.
21. Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *J Intern Med* 1997; 242: 35-40.
22. Kornovski BS, McCshen J, Kredentser J Turly E: The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. *Fertil Steril* 1994; 58: 599-602.
23. Roden L, Campbell P, Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Thompson JN. Enzymic pathways of

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]

hyaluronan catabolism. *CIBA Found Symp*1989; 143: 60-76.
24. Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff PA .hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* 1994; 125: 1157-1163.
25. Gmachl M, Kreil G, Venom B. hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 3569-3573.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]

Tehran University Medical Journal; Vol. 64, No. 6, Sep 2006:27-36

The effect of different doses of hyaluronan on sperm morphology, motility, vitality and fertilization capability in mouse

S. Sayadi[1]
M. Akbari[1]
A. Sobhani[1*]
F. Abolhasani[1]
N. Takzare[1]
P. Pasbakhsh[1]

1. Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University medical Sciences

* School of Medicine, Tehran University Of Medical Sciences, Tehran, Iran, Tel: +98 (21) 77536586;
E-mail: sobhani@sina.tums.ac.ir

Abstract

***Background*:** Hyaluronan has an important role on the permeability and motility of sperm and the interaction of gametes and these can play a considerable role on the fertility rate. Therefore, in this study, we assessed the effect of different doses of hyaluronan on the morphology, motility, vitality and fertility rate of mice.
***Methods*:** We used 40 mice (6-8 week) in this study which twenty of them were male and the rest were female. The sperm of each male mouse were divided into four groups. The group 1 (control): They were maintained in RPMI media without any hyaluronan supplementation for 2 hour. Hyaluronan with the doses of 750, 1000 and 1250 µg/ml were added into RPMI media in groups 2, 3 and 4, respectively. After 2 hour. incubation, the numbers of sperms were assessed, using haemocytometer. Also, their morphology with papanicolaeu staining and their vitality with Eosin B dye were assessed. As well as sperms motility measured under inverted microscope by observation and fertility rate evaluated after routine IVF by counting two-cell stage embryos.
***Results*:** Our results demonstrated that, the dose of 750 µ g/ml has the greatest effect on the motility, vitality and fertility rate of sperms. The effect of dose of 1000 µ g/ml also was positive on them. On the other hand, none of these doses had any effect on sperm morphology.
***Conclusion*:** Hyaluronan may have an influence on motility, vitality and fertility rate of sperms and the dose of 750µ g/ml had a significant effect on these factors.

***Keywords*:** Hyaluronan, sperm motility, sperm morphology, IVF

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-05]