

## تأثیر غلظت های مختلف کلسیم بر الگوی حرکت اسپرم اپیدیدی گوسفند در محیط BO تعدیل شده

لادن عمادی<sup>۱</sup> پرویز تاجیک<sup>۲\*</sup> پژمان میرشکرایی<sup>۳</sup> وهاب باباپور<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

<sup>۲</sup> گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

<sup>۳</sup> گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران

(دریافت مقاله: ۱۲ شهریورماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۱۷ خردادماه ۱۳۸۵)

### چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت های مختلف کلسیم بر الگوی حرکتی اسپرم گوسفند و تعیین غلظت موثر کلسیم در محیط نگهدارنده اسپرم بوده است. بدین منظور بیضه های گوسفند بالغ (حداقل ۵ بیضه برای هر روز) از کشتارگاه جمع آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند، سپس اسپرم از ناحیه دم اپیدیدیم بذل گردید و به محیط BO تعدیل شده با دامای ۳۷ درجه سانتیگراد اضافه شد و به منظور جداسازی اسپرم های زنده و متحرک، عمل شناورسازی انجام شد و سپس اسپرم های جدا شده به محیط BO با غلظت های ۰/۵۶، ۱/۱۲۵ و ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم انتقال یافته و در آنکو با تور ۳۷ درجه سانتیگراد با رطوبت ۱۰۰ درصد نگهداری شد و الگوی تحرک اسپرم در غلظت های مختلف کلسیم، در ساعت های ۰، ۲، ۴ و ۶ بعد از اضافه شدن به محیط با استفاده از سیستم رایانه ای CASA مورد بررسی قرار گرفت و پارامترهای مختلف در خصوص مدل حرکتی اسپرم ثبت شد، پس از انجام تست نرمال بودن داده ها در طول زمان و بین گروه ها از آنالیز واریانس استفاده گردید. نتایج آزمون آماری هیچ گونه اختلافی را بین غلظت های مختلف کلسیم در پارامترهای تحت بررسی در ساعت صفر نشان نداد. در ساعت دوم درصد اسپرمهای Class A، VCL، VSL، VAP و STR در گروه حاوی ۰/۵۶ میلی مولار کلسیم به طور معنی داری از گروه دارای ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم بیشتر بود ( $p < 0/05$ ). در ساعت ۴ نیز بین درصد اسپرمهای Class A، درصد اسپرمهای Class C، درصد اسپرمهای Class A+B، Class A، VCL، VSL، VAP و STR در گروه حاوی ۰/۵۶ میلی مولار کلسیم به طور معنی داری از گروه دارای ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم بیشتر بود ( $p < 0/05$ ). در ساعت ۶ بین گروه حاوی ۰/۵۶ میلی مولار کلسیم و گروه دارای ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم نسبت STR اختلاف معنی داری بود ( $p < 0/05$ ). در تمامی موارد فوق بین گروه ۱/۱۲۵ و دو گروه ۰/۵۶ و ۲/۲۵ اختلاف معنی داری مشاهده نگردید.

واژه های کلیدی: کلسیم، الگوی حرکت، اسپرم اپیدیدیمی، گوسفند.

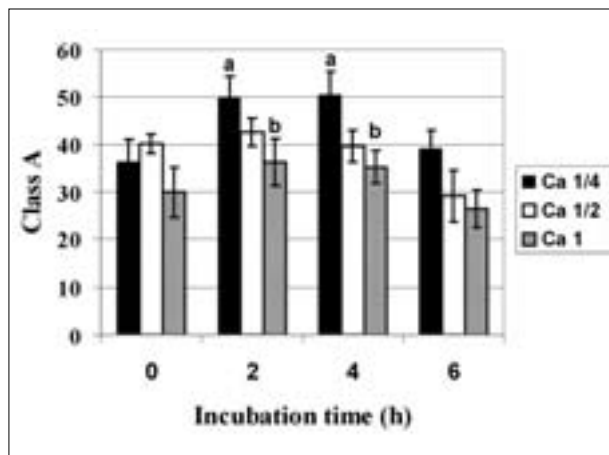
### مقدمه

اسپرما توزوای پستانداران شامل سه قسمت سر، گردن و دم (تاژک) است. تاژک نقش اصلی را در تحرک اسپرم ایفا می کند. اسپرم دارای دو نوع حرکت می باشد، حرکت فعال (Activated Motility) که حرکتی با دامنه کوچک است و در اسپرم انزالی دیده می شود و اسپرم را در طول مجرای تناسلی ماده پیش می برد و حرکت بیش فعال (Hyperactivated Motility) که مقارن با آغاز مرحله ظرفیت یابی اسپرم، در قسمت پروکسیمال دستگاه تناسلی ماده دیده می شود. که در پیشروی اسپرم در اویداکت و نفوذ آن به Zona Pellucida اطراف تخمک و لقاح نقش مهمی دارد (۵، ۱۱). بنابراین تحرک اسپرم یکی از مهمترین پارامترها جهت ارزیابی کیفیت منی و بررسی میزان توانایی باروری حیوان نر می باشد.

الگوی تحرک اسپرم بسته به خصوصیات فیزیکی و ترکیب شیمیایی محیط آن تغییر می کند. در صورتیکه اسپرم بطور زود رس در محلی نابجا بیش فعال شود، دچار خستگی و نقص برای لقاح می گردد (۱۳). اگرچه عوامل خارجی که به عنوان مکانیسمهای آغاز کننده حرکت اسپرم مطرح می باشند تا حد زیادی ناشناخته اند، اما شواهدی در دست است که اهمیت

حضور یون کلسیم را برای شروع و باقیماندن تحرک اسپرم بیان می کند (۷). در طول مرحله ظرفیت یابی، با تغییر غشا تازک یکسری گیرنده فعال می شود. بعد از فعال شدن گیرنده ها، پروتئین G در سطح داخلی غشا تحریک شده و سبب فعال شدن کانالهای کلسیمی و ورود کلسیم بدخل سلول می شود. افزایش در سطح کلسیم داخل سلولی سبب تحریک آنزیم آدنیلات سیکلاز (که توسط یونهای بیکربنات و کلسیم تنظیم می شود) و افزایش موقت سطح cAMP (آدنوزین مونوفوسفات حلقوی) داخل سلولی شده که cAMP افزایش یافته پروتئین کیناز A را تحریک می کند که سبب فسفریله شدن پروتئین اکسونم و خم شدن و لغزیدن تازک می شود. در تازک نوسانات کلسیم مطابق با ضربه های تازکی است و ارتباط نزدیکی بین سطح کلسیم و دامنه ضربان و فرکانس ضربان تازک وجود دارد (۱۴، ۱۳، ۶). از آنجایی که یون کلسیم برای ادامه مراحل آماده سازی اسپرم که منجر به باروری آن می شود ضروری است و غلظت های مختلف کلسیم اثرات متفاوتی بر تحرک اسپرم دارد که می تواند متعاقباً باروری را تحت تاثیر قرار دهد و همچنین تا کنون تحقیقی بر روی اثر کلسیم بر الگوی تحرک اسپرم و غلظت موثر کلسیم در محیط نگهدارنده اسپرم صورت نگرفته است، در این مطالعه اثر غلظت های مختلف کلسیم بر الگوی تحرک اسپرم اپیدیدیمی گوسفند در



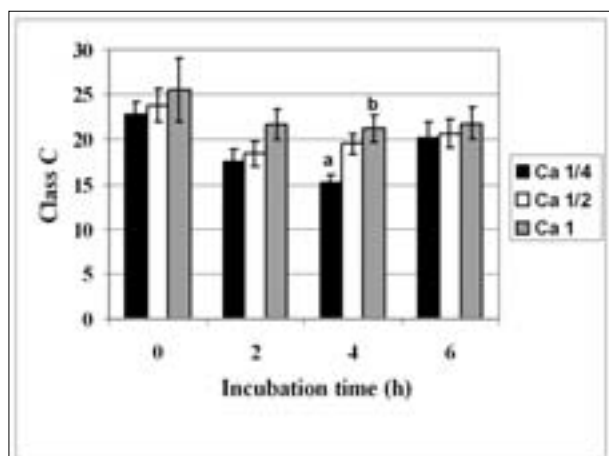


نمودار ۱- میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد اسپرم‌های Class A در غلظت‌های مختلف کلسیم، در ساعت ۰، ۲، ۴، ۶.

داده‌های بدست آمده حاصل از این مطالعه توسط برنامه نرم افزاری SPSS و توسط آنالیز آماری ANOVA یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. هرگاه آنالیز اختلاف معناداری را نشان می‌داد سپس گروهها با استفاده از آزمون چنددامنه دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گرفت.

### نتایج

نمودار ۱، میزان اسپرم‌های با حرکت سریع را در غلظت‌های مختلف کلسیم نشان می‌دهد. در ساعت شروع (صفر) بیشترین میزان حرکت سریع در محیط با ۱/۱۲۵ مولار کلسیم وجود داشت (۴۰/۲۴ درصد) و کمترین مربوط به ۲/۲۵ مولار کلسیم بود (۲۹/۸۹ درصد) ولی این اختلاف از لحاظ آماری معنادار نبود. از ساعت ۲ به بعد (تا ساعت ۶ آزمایش) این الگو تغییر پیدا نموده و بیشترین میزان تحرک مربوط به کلسیم ۰/۵۶ مولار و کمترین آن مربوط به غلظت بالاتر کلسیم (۲/۲۵ مولار بود). میزان اسپرم‌های با حرکت سریع از ساعت ۲ به بعد به ترتیب ۴۹/۷۹، ۴۲/۵۶ و ۳۶/۲۵ درصد برای کلسیم ۰/۵۶، ۱/۱۲۵ و ۲/۲۵ مولار در ساعت ۲ بود. در این ساعت و همچنین ساعت ۴ بین



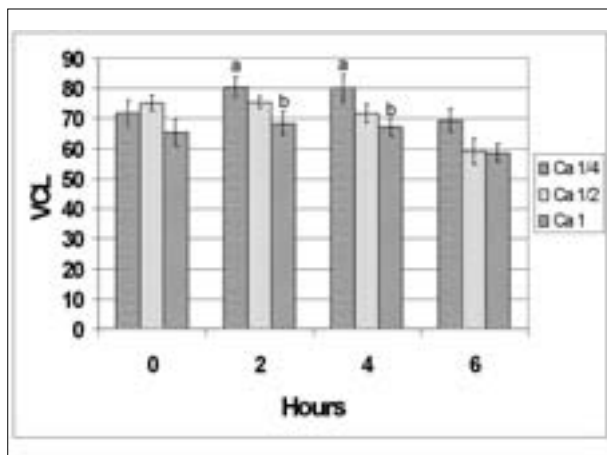
نمودار ۲- میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد اسپرم‌های Class C در غلظت‌های مختلف کلسیم، در ساعت ۰، ۲، ۴، ۶.

محیط BO تعدیل شده با استفاده از برنامه نرم افزاری CASA (Analyzer Computer Assisted Sperm) انجام شد که این نرم افزار با تصاویر دیجیتالی که از اسپرم متحرک ثبت می‌کند، پارامترهایی که توسط مدل ریاضی قابل توصیف هستند را اندازه‌گیری می‌کند.

### مواد و روش کار

جهت تهیه اسپرم اپیدیدیمی تعداد ۵ جفت بیضه گوسفند بالغ روزانه از کشتارگاه جمع آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل می‌شد. پس از خارج کردن اپیدیدیم از داخل لایه تونیکا آلبوزینه و قطع بافت‌های زائد، قسمت دم اپیدیدیم با سرم فیزیولوژی ۳۷ درجه سانتیگراد استریل شسته و با گاز استریل خشک شد. سپس با اسکالپل نمرة ۲۱ شکافی در قسمت فاقد عروق ایجاد شده و با فشار بر دم اپیدیدیم قطره‌ای از مایع سرشار از اسپرم به داخل پلیت حاوی ۲ میلی لیتر محیط BO (۱۱۲ میلیمول NaCl، ۴/۰۲ میلی مول KCl، ۲/۲۵ میلی CaCl<sub>2</sub>، ۰/۸۳ میلی مول PO<sub>4</sub>NH<sub>2</sub> میلی مول ۱/۲۵ MgCl<sub>2</sub>، ۳۷ میلی مول NaHCO<sub>3</sub>، ۱۳/۹ میلی مول گلوکز، ۳۱ میکروگرم در میلی لیتر پنی سیلین پتاسیم) با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ریخته شد. به منظور جلوگیری از به هم چسبیدن اسپرم‌ها (آگلوتیناسیون) چند بار توسط سمپلر نمونه مخلوط گشته سپس به منظور شناور سازی نمونه‌ها محیط حاوی اسپرم به دو میکرو تیوب منتقل و عمل سانتریفیوژ (۸۰۰۰ درو در دقیقه، به مدت ۵ دقیقه) انجام شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت ۱۰۰ درصد قرار داده و پس از آن از محلول رویی به محیط‌های BO با غلظت‌های ۰/۵۶، ۱/۱۲۵ و ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم منتقل شد و الگوی تحرک اسپرم در ساعت‌های صفر، ۲، ۴ و ۶ بعد از اضافه شدن نمونه اسپرم به محیط با استفاده از سیستم CASA مورد ارزیابی قرار گرفت. سیستم شامل یک دوربین متصل به یک میکروسکوپ است که تصاویر موجود در زمینه انتخاب شده را به کامپیوتر منتقل میکند و نرم افزار با استفاده از تصاویر دیجیتالی ثبت شده از تحرک اسپرم‌ها، پارامترهایی را محاسبه می‌کند که شامل: درصد اسپرم‌های متحرک با سرعت بالا (حرکت سریع) Class A، درصد اسپرم‌های متحرک با سرعت پایین (حرکت آهسته) Class B، مجموع درصد اسپرم‌های Class A و Class B، میانگین سرعت اسپرم در یک خط مستقیم (میکرومتر بر ثانیه) VSL، میانگین سرعت اسپرم در مسیر واقعی که به صورت منحنی است (میکرومتر بر ثانیه) VCL، دامنه حرکت سراسر اسپرم به طور جانبی (میکرومتر) ALH، فرکانسی که در آن سراسر اسپرم مسیر میانگین حرکت اسپرم (VAP) را قطع می‌کند. (هرتز) BCF، LIN مشخص می‌کند که چقدر مسیر حرکت اسپرم در مسیر واقعی به خط مستقیم نزدیک است (STR، VSL/VCL) مشخص می‌کند که چقدر مسیر حرکت اسپرم در میانگین مسیر واقعی به خط مستقیم نزدیک است (VSL/VAP).



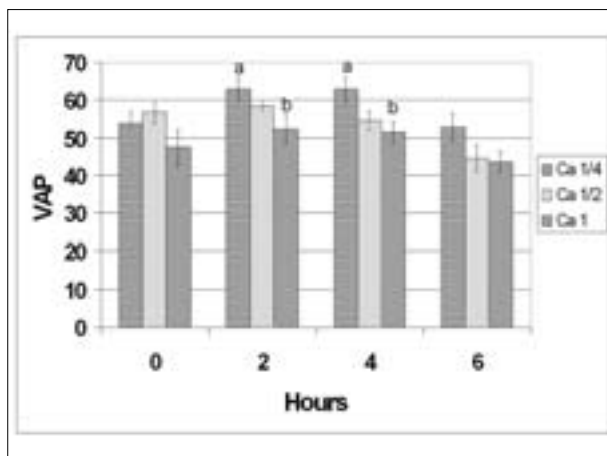


نمودار ۲- میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد اسپرم های VCL ( $\mu\text{m/s}$ ) در غلظت های مختلف کلسیم، در ساعت ۰، ۲، ۴، ۶.

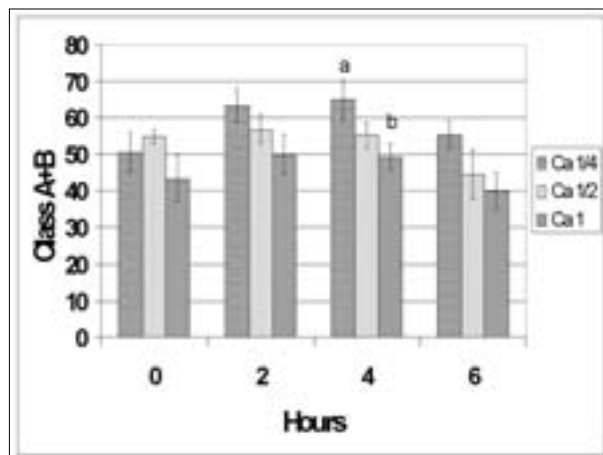
کلسیم میزان تحرک اسپرم ها کاهش می یابد، که تنها در ساعت ۴ دارای اختلاف معنی دار بین غلظت های ۰/۵۶ میلی مولار کلسیم (۶۴/۸۴ درصد) و ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم (۴۹/۱۴ درصد) مشاهده گردید ( $p < 0.05$ ).

نمودار ۴ میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر منحنی (میکرو متر بر ثانیه) در غلظت های مختلف کلسیم نشان می دهد. که در ساعت صفر بیشترین میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر منحنی در غلظت ۱/۱۲۵ میلی مولار کلسیم ( $75/1 \mu\text{m/s}$ ) و کمترین آن در غلظت ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم ( $65/28 \mu\text{m/s}$ ) می باشد که اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. در ساعت های ۲، ۴ و ۶ با افزایش غلظت کلسیم میانگین سرعت حرکت اسپرم ها کاهش می یابد. میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر منحنی در ساعت ۲ به ترتیب ( $80/34 \mu\text{m/s}$ )، ( $75/3 \mu\text{m/s}$ ) و ( $68/25 \mu\text{m/s}$ )، و در ساعت ۴ ( $80/11 \mu\text{m/s}$ )، ( $71/63 \mu\text{m/s}$ ) و ( $66/94 \mu\text{m/s}$ ) برای غلظت های ۰/۵۶، ۱/۱۲۵ و ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم می باشد که در ساعت ۲ و ۴ اختلاف معنادار بین دو گروه با غلظت ۰/۵۶ و ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم دیده شد ( $p < 0.05$ ).

نمودار ۵ میانگین سرعت حرکت اسپرم در یک خط مستقیم (میکرو متر



نمودار ۶- میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد اسپرم های VAP ( $\mu\text{m/s}$ ) در غلظت های مختلف کلسیم، در ساعت ۰، ۲، ۴، ۶.

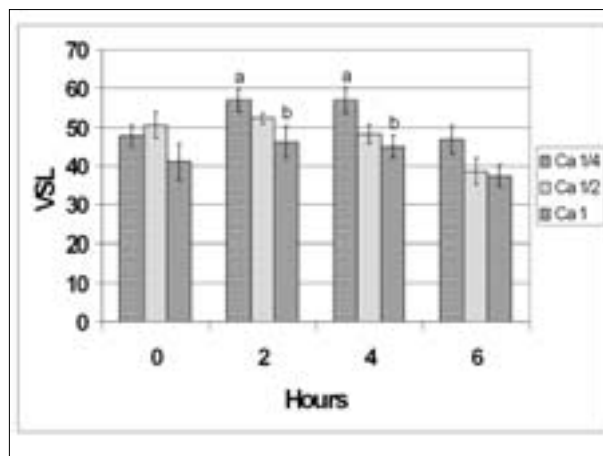


نمودار ۳- میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد اسپرم های Class A+B در غلظت های مختلف کلسیم، در ساعت ۰، ۲، ۴، ۶.

غلظت های ۰/۵۶ مولار و ۲/۲۵ مولار اختلاف معنی دار وجود داشت ( $p < 0.05$ ). با توجه به اینکه درصد اسپرم های با حرکت کند در زمان های مختلف در غلظت های مختلف کلسیم اختلاف معنی دار نداشت، اطلاعات آن در نمودار جداگانه ای نیامده است. به هر حال بین ۱۱ تا ۱۵ درصد از اسپرم ها در غلظت های مختلف کلسیم حرکت کند داشتند.

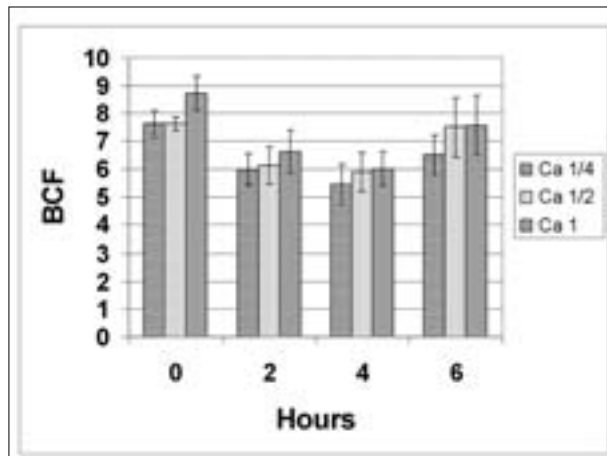
نمودار ۲ میزان اسپرم های با حرکت در جا را در غلظت های مختلف کلسیم نشان می دهد. در این گونه حرکت در تمام غلظت ها کمترین و بیشترین میزان مربوط به کمترین و بیشترین غلظت کلسیم مورد آزمایش بود. هر چند که فقط اختلاف معنی دار در ساعت ۴ آزمایش بین غلظت های ۰/۵۶ مولار و ۲/۲۵ مولار کلسیم وجود داشت ( $p < 0.05$ ).

نمودار ۳ میزان اسپرم های متحرک (حرکت سریع و کند) در غلظت های مختلف کلسیم نشان می دهد. که در ساعت صفر بیشترین میزان تحرک مربوط به غلظت ۱/۱۲۵ میلی مولار کلسیم (۵۴/۸ درصد) و کمترین میزان تحرک مربوط به غلظت ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم (۴۳/۱۶ درصد) می باشد که اختلاف معنی دار مشاهده نشد. در ساعت های ۲، ۴ و ۶ با افزایش غلظت



نمودار ۵- میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد اسپرم های VSL ( $\mu\text{m/s}$ ) در غلظت های مختلف کلسیم، در ساعت ۰، ۲، ۴، ۶.

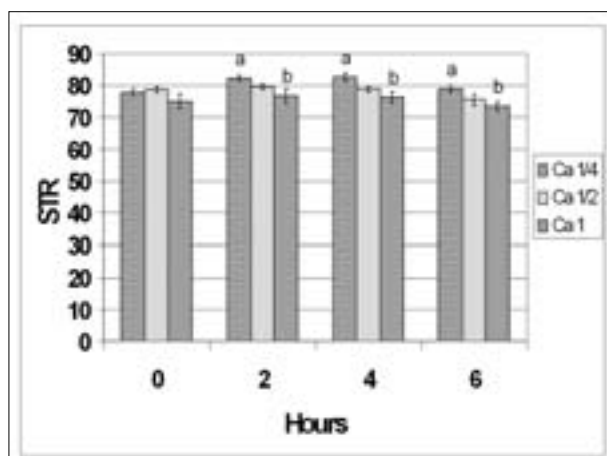




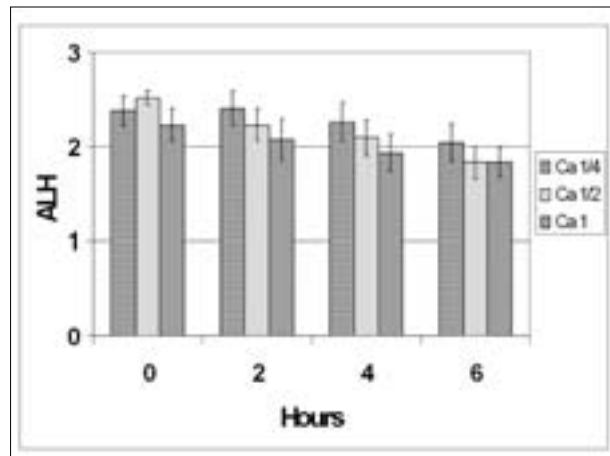
نمودار ۸- میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد اسپرم های BCF (Hertz) در غلظت های مختلف کلسیم، در ساعت ۰، ۲، ۴، ۶.

ساعت های ۴، ۲ و ۶ با افزایش غلظت کلسیم میانگین سرعت حرکت اسپرم ها در میانگین مسیر منحنی کاهش می یابد. میانگین سرعت حرکت اسپرم در میانگین مسیر منحنی در ساعت ۲ به ترتیب  $(63/07 \mu\text{m/s})$ ،  $(54/61 \mu\text{m/s})$  و  $(58/63 \mu\text{m/s})$  و در ساعت ۴  $(62/91 \mu\text{m/s})$ ،  $(52/4 \mu\text{m/s})$  و  $(51/4 \mu\text{m/s})$  و در ساعت ۶  $(52/96 \mu\text{m/s})$ ،  $(44/54 \mu\text{m/s})$  و  $(43/72 \mu\text{m/s})$  برای غلظت های  $0/56$ ،  $1/125$  و  $2/25$  میلی مولار کلسیم می باشد که در ساعت ۲ و ۴ اختلاف معنی دار بین دو گروه با غلظت  $0/56$  و  $2/25$  میلی مولار کلسیم مشاهده شد ( $p < 0/05$ ).

نمودار ۷ میزان دامنه حرکت سر اسپرم بطور جانبی ( $\mu\text{m}$ ) در غلظت های مختلف کلسیم را نشان می دهد. که در ساعت صفر بیشترین میزان مربوط به غلظت  $1/125$  میلی مولار کلسیم ( $2/52 \mu\text{m}$ ) و کمترین آن مربوط به غلظت  $2/25$  میلی مولار کلسیم ( $2/23 \mu\text{m}$ ) می باشد که اختلاف معنی داری دیده نشد. در ساعت های ۴، ۲ و ۶ با افزایش غلظت کلسیم میزان دامنه حرکت سر اسپرم بطور جانبی کاهش می یابد. میزان آن در ساعت ۲ به ترتیب  $(2/4 \mu\text{m})$ ،  $(2/23 \mu\text{m})$  و  $(2/7 \mu\text{m})$  و در ساعت ۴  $(2/26 \mu\text{m})$ ،  $(2/9 \mu\text{m})$  و



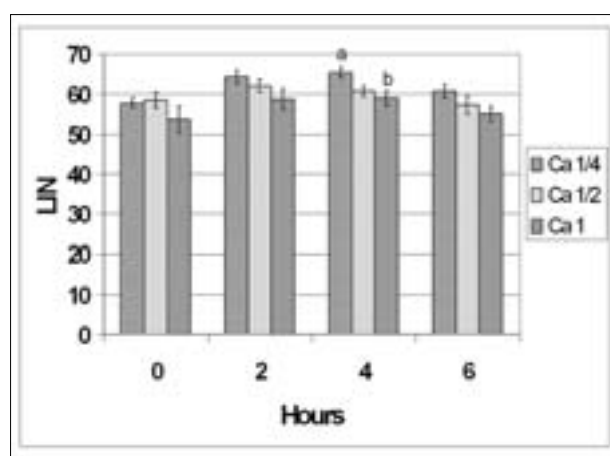
نمودار ۱۰- میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد اسپرم های STR در غلظت های مختلف کلسیم، در ساعت ۰، ۲، ۴، ۶.



نمودار ۹- میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد اسپرم های ALH ( $\mu\text{m/s}$ ) در غلظت های مختلف کلسیم، در ساعت ۰، ۲، ۴، ۶.

بر ثانیه)، در غلظت های مختلف کلسیم نشان می دهد. که در ساعت صفر بیشترین میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر مستقیم در غلظت  $1/125$  میلی مولار کلسیم ( $50/54 \mu\text{m/s}$ ) و کمترین آن در غلظت  $2/25$  میلی مولار کلسیم ( $40/99 \mu\text{m/s}$ ) می باشد که اختلاف معنی داری وجود ندارد. در ساعت های ۴، ۲ و ۶ با افزایش غلظت کلسیم میانگین سرعت حرکت اسپرم ها کاهش می یابد. میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر مستقیم در ساعت ۲ به ترتیب  $(46/93 \mu\text{m/s})$ ،  $(52/24 \mu\text{m/s})$  و  $(46/11 \mu\text{m/s})$  و در ساعت ۴  $(46/92 \mu\text{m/s})$ ،  $(48/23 \mu\text{m/s})$  و  $(56/92 \mu\text{m/s})$  برای غلظت های  $0/56$ ،  $1/125$  و  $2/25$  میلی مولار کلسیم می باشد که در ساعت ۲ و ۴ اختلاف معنی دار بین دو گروه با غلظت  $0/56$  و  $2/25$  میلی مولار کلسیم دیده شد ( $p < 0/05$ ).

نمودار ۶ میانگین سرعت حرکت اسپرم در میانگین مسیر واقعی (میکرو متر بر ثانیه) در غلظت های مختلف کلسیم را نشان می دهد. که در ساعت صفر بیشترین میانگین سرعت حرکت اسپرم در میانگین مسیر منحنی در غلظت  $1/125$  میلی مولار کلسیم ( $56/9 \mu\text{m/s}$ ) و کمترین آن در غلظت  $2/25$  میلی مولار کلسیم ( $47/45 \mu\text{m/s}$ ) می باشد که اختلاف معنی داری وجود ندارد. در



نمودار ۹- میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد اسپرم های LIN در غلظت های مختلف کلسیم، در ساعت ۰، ۲، ۴، ۶.



اویداکت خرگوش، موش صحرایی، خوک و گوسفند در زمان لقاح جمع آوری شده است (۱۳). کلسیم خارج سلولی برای شروع و باقیماندن حرکت بیش فعال ضروری است، اما در بعضی گونه های پستانداران در فقدان کلسیم خارج سلولی نیز حرکت شروع می شود، که احتمالاً در این گونه ها کلسیم منابع داخل سلولی اهمیت بیشتری دارد و منبع کلسیم داخل سلولی ارگانی به نام Redundant Nuclear Envelope (RNE) در ناحیه گردن تازک است که دارای گیرنده اینوزیتول تری فسفات است (۹،۱۰). حرکت بیش فعال در اسپرم همستر طلایی به کلسیم خارج سلولی وابسته است به طوری که در محیط با کلسیم غیرطبیعی یا فاقد کلسیم حرکت بیش فعال دیده نمی شود. ولی این اثر قابل برگشت است و با برگرداندن آن به محیطی با کلسیم طبیعی حرکت بیش فعال دیده می شود (۱۳). کانالهای کلسیمی موجود در غشا پلاسمایی که تا کنون شناخته شده اند شامل ۴ نوع است: ۱- gated Voltage ۲- Cyclic Nucleotide gated ۳- Receptor Potential ۴- CatSper Transient که بویژه نوع چهارم در حرکت بیش فعال و باروری نقش مهمی دارد و حیوان فاقد زن مربوط به آن نابارور است (۴،۱۶). غلظت بالای کلسیم خارج سلولی در pH ۷/۶ سبب واکنش کلسیم با محل های دارای بار منفی در سطح سلول میشود و اختلال در حرکت دسته جمعی (Collective) در اسپرم های انزالی در قوچ ایجاد می کند. زمانی که غلظت کلسیم داخل سلولی بالا باشد (بالای ۴۰۰nM) تحرک اسپرم مهار می شود، که تحرک وابسته به تنفس میتوکندریایی در مقایسه با تحرک وابسته به گلیکولیز نسبت به کلسیم داخل سلولی بسیار حساستر است (۱). Ca-Mg و پمپ کلسیم در غشا نقش مهمی در تنظیم حرکت اسپرم دارد که از راه تنظیم کلسیم داخل سلولی عمل می کنند (۲). در تحقیقی با استفاده از CASA تغییرات در پارامترهای حرکتی اسپرم موش صحرایی که در محیط کشت خاص IVF نگهداری شدند بررسی شد. اسپرم اپیدیدیمی در ساعت صفر و ۴ ارزیابی شد. پارامترهای VCL, ALH, BCF افزایش یافتند و پارامترهای VSL, LIN, STR کاهش یافتند، به عبارتی بعد از ۴ ساعت حرکت اسپرمها از حالت مستقیم و خطی بصورت حرکت آسیمیتریک بیش فعال تغییر یافتند (۳). اسپرم گاوی فاقد غشا در غلظت بسیار پایین کلسیم بیش فعال است و در غلظت بالای کلسیم (میلی مولار) حرکت بیش فعال کاهش می یابد (۱۰). از طرفی گزارش شده است که حرکت بیش فعال در اسپرم چندین گونه از پستانداران با استفاده از محیط دارای کلسیم در حد میلی مولار القا شده است (۱۸). مطالعه ما بر روی اسپرم اپیدیدیمی قوچ نشان می دهد که ۲ ساعت پس از اضافه کردن اسپرم به محیط، پارامترهای Class A, VCL, VSL, VAP, STR در محیط با غلظت ۰/۵۶ میلی مولار بیشتر از محیط با غلظت ۲/۲۵ میلی مولار می باشد و این اثر تا ساعت ۴ ادامه می یابد که در این ساعت پارامترهای Class C, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, Class A, و Class A+B در محیط با غلظت ۰/۵۶ میلی مولار بیشتر از محیط با غلظت ۲/۲۵ میلی مولار می باشد. در نتیجه تحقیقات صورت گرفته بر روی اسپرم انسان چنین بیان می شود که در صورتی که  $VCL \geq 70 \mu\text{m/s}$

(۱/۹۳  $\mu\text{m}$ ) و در ساعت ۶ (۲/۰۴  $\mu\text{m}$ )، (۱/۸۳  $\mu\text{m}$ ) و (۱/۸۳  $\mu\text{m}$ ) برای غلظت های ۰/۵۶، ۱/۱۲۵، و ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم می باشد که اختلاف معنی دار مشاهده نگردید.

نمودار ۸ فرکانسی که در آن سراسپرم مسیر میانگین حرکت اسپرم را قطع می کند (Hertz) در غلظتهای مختلف کلسیم نشان می دهد. که در ساعت های صفر، ۲، ۴ و ۶ با افزایش غلظت کلسیم میزان آن افزایش می یابد. میزان آن در ساعت صفر به ترتیب (۷/۶۱ Hertz)، (۷/۶۱ Hertz) و (۸/۷۱ Hertz) و در ساعت ۲ (۵/۹۷ Hertz)، (۶/۱ Hertz) و (۶/۶۲ Hertz) و در ساعت ۴ (۵/۴۳ Hertz)، (۵/۸۷ Hertz) و (۵/۹۹ Hertz) و در ساعت ۶ (۶/۴۸ Hertz)، (۷/۵ Hertz) و (۷/۵۶ Hertz) برای غلظت های ۰/۵۶، ۱/۱۲۵، و ۲/۲۵ میلی.

نمودار ۹ فاصله مسیر واقعی حرکت اسپرم به خط مستقیم را نشان می دهد. که در ساعت صفر بیشترین میزان مربوط به غلظت ۱/۱۲۵ میلی مولار کلسیم (۵۸/۴۱) و کمترین آن مربوط به غلظت ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم (۵۳/۵۳) می باشد که اختلاف معنی داری دیده نشد. در ساعت های ۲، ۴ و ۶ با افزایش غلظت کلسیم میزان آن کاهش می یابد. که تنها در ساعت ۴ اختلاف معنی دار بین غلظت ۰/۵۶ میلی مولار کلسیم (۶۵/۳۶) و غلظت ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم (۵۹) مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

نمودار ۱۰ فاصله میانگین مسیر واقعی حرکت اسپرم به خط مستقیم را نشان می دهد. که در ساعت صفر بیشترین میزان در غلظت ۱/۱۲۵ میلی مولار کلسیم (۷۸/۵۸) و کمترین آن در غلظت ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم (۷۴/۹۴) می باشد که اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. در ساعت های ۲، ۴ و ۶ با افزایش غلظت کلسیم میزان آن کاهش می یابد. که در ساعت ۲ به ترتیب (۸۲/۱۶)، (۷۹/۶۵) و (۷۶/۷۶) و در ساعت ۴ (۸۲/۷)، (۷۸/۷۷) و (۷۶/۳۵) و در ساعت ۶ (۷۸/۹۳)، (۷۵/۴۵) و (۷۳/۴۴) برای غلظت های ۰/۵۶، ۱/۱۲۵ و ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم می باشد که در ساعت ۲ و ۴ و ۱۶ اختلاف معنادار بین دو گروه با غلظت ۰/۵۶ و ۲/۲۵ میلی مولار کلسیم مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

## بحث

یکی از پارامترهای مهم برای ارزیابی کیفیت منی و بررسی میزان توانایی باروری حیوان نر تحرک اسپرم است. که از دو نوع حرکت فعال و بیش فعال، حرکت بیش فعال نقش مهمی در باروری حیوان نر دارد. که مقارن با مرحله ظرفیت یابی اسپرم است و ویژگی آن حرکت شلاقی دم و الگوی حرکتی سر بصورت عدد ۸ می باشد (۱۳). ارتباط نزدیکی بین توانایی اسپرم برای بیش فعال شدن و توانایی اسپرم برای نفوذ به Zona Pellucida و لقاح وجود دارد. از طرفی حرکت بیش فعال برای جدا شدن اسپرم از اپیتلیوم چین های داخلی و کریپتهای ناحیه ایستموس اویداکت کمک کننده است و این نیروی قوی پیشرونده حرکت اسپرم را در محیط با ویسکوزیته بالای اویداکت و Zona pellucida اطراف تخم تسهیل می کند (۱۳). حرکت بیش فعال اولین بار در همستر طلایی شناسایی شد و اسپرم با حرکت بیش فعال از ناحیه آمپولا



## References

- Breitbart, H., Nass-Arden, L. (1995) Relationship between intracellular calcium, energy metabolism and motility of ram sperm. *Arch Androl*, 35: 83-92.
- Breitbart, H., Rubinstein, S., Nass-Arden, L. (1985) The role of calcium and ca ATPase in maintaining motility in ram spermatozoa. *J. Biol. Chem*, 260: 11548-11553.
- Cancel, A.M., Lobdell, D., Mendola, P., Perreant, S.D. (2000) Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Hum Reprod*, 15: 1322-1328.
- Carlson, A.E., Westenbrock, R.E., Quill, T., Ren, D., Claphen, D.E., Hille, B., Babcock, D.F. (2003) Catsper 1 required for evoked ca entry and control of flagellar function in sperm. *PNAS*, 100: 14864-14868.
- Darszon, A., Acevedo, J.J., Blanca, E.G., Hernandez-Gonzalez, E. (2006) Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*, 131: 977-988.
- Esposito, G., Jaiswal, B.S., Xie, F., Krajnc-Franken, M.A. *et al.* (2004) Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a seven sperm motility defect. *PNAS*, 101: 2993-2998.
- Felix, R. (2005) Molecular Physiology and pathology of ca conducting channel in the plasma membrane of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*, 122: 519-526.
- Green, S., Fishel, S. (1999) Morphology comparison of individually selected hyperactivated and non hyperactivated human spermatozoa. *Hum Reprod*, 14: 123-130.
- Ho, H.C., Suarez, S.S. (2003) Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates activated motility. *Biol Reprod*. 68: 1590-1596.
- Ho, H.C., Granish, K.A., Suarez, S.S. (2002) Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by ca and not cAMP. *Developmental Biology*. 250: 208- 217.
- Ho, H.C., Suarez, S.S. (2001) Hyper activation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*, 122: 519-526.
- Ho, H.C., Suarez, S.S. (2001) An inositol 1,4,5 triphosphate receptor-gated intracellular ca store is involved in regulating sperm hyper activated motility. *Biol Reprod*, 65: 1606-1615.
- Knobil, E., Neill, D.J. (1994) *The Physiology of Reproduction*. Second Edition. New York , Raven Press. vol 1. pp. 219-222
- Litvin, T.N., Kamenetsky, M., Zarifian, A., Buck, J., Levin, L.R. (2003) Kinetic properties of soluble adenylyl cyclase synergism between calcium and bicarbonate. *J. Biol. Chem*, 278: 15922-15926.
- Mortimer, S.T., Maxwell, W.M. (1999) Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reproduction, Fertility and Development*, 11: 25-30.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A.C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L., Claphen, D.E. (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413: 603-609.
- Suarez, S.S., Ho, H.C. (2003) Hyperactivation of mammalian sperm. *Cellular and Molecular biology*, 49: 351-356.
- Yamagimachi, R. (1994) Fertilization; in *The Physiology of reproduction*. E Knobil and J. Neill. New York; Reven Press. pp. 189-317.



# EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF CALCIUM ON MOTILITY PATTERN OF OVINE EPIDIDYMAL SPERM IN MODIFIED BO

Emadi,L.<sup>1</sup>, Tajik,P.<sup>2\*</sup>, Mirshkraei,P.<sup>3</sup>, Babapor,V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran

<sup>2</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran

<sup>3</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord-Iran

(Received 3 September 2005 , Accepted 7 June 2006)

---

## Abstract:

To evaluate the effects of calcium on motility patterns of bovine epididymal sperm and to determine the effective calcium concentration, ovine testicles (5 for each experiment day) were picked up in a local slaughterhouse and transported to the laboratory in a cool container (filled with ice). In laboratory, caudal epididymis was incised and sperm cells were put into Petri dishes containing modified BO medium which were kept in 37°C incubator. To separate sperm from epididymal particles swim up method was performed into BO medium containing 0.56, 1.125 and 2025 mM calcium. Motility pattern were assessed at the start of experiment (0h) and 2, 4 and 6h post incubation using Computer Assisted Sperm Analyzing (CASA) and different motility parameters were assessed. The proportions sperm motility were analyzed using a mathematical model that included fixed effect due to treatment (calcium concentrations) and residual error. When the analysis revealed a significant effect, the values were compared by Duncan's multiple range test. The results showed that no significant difference was observed in the start of experiment (no fast effect). Two h post incubation the proportion of class A spermatozoa (fast moving ones), Curvilinear velocity (VCL), Straight line velocity (VSL), Average path velocity (VAP) and Strightness (STR) in 0.56 mM calcium were significantly higher than those in 2.25 mM calcium ( $p < 0.05$ ). Four h post incubation, the proportion of class A and class C spermatozoa (not moving ones), class A+B (alive sperm cells), VCL, VSL, VAP, Linearity and STR in 0.56 mM calcium were significantly higher than those in 2025 nM calcium ( $p < 0.05$ ). Six h post incubation only STR was significantly different between the concentrations of 0.56 and 2025 mM calcium. However, concentrations of calcium. The results of the present study indicate the lower calcium concentrations may support a higher sperm motility proportion in BO medium.

**Key words:** calcium, motility patterns, epididymal sperm, sheep.

