تاثیر غلظت‌های متفاوت فاکتور مهارکننده لوسمی بر حرکت و بقای اسپرم نرمال

قاسم ساکی[۱]
فاطمه قلمبر دزفولی[۲]
علیقلی سبحانی[۳*]

۱. گروه علوم تشریحی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی
۲. گروه زنان و مامایی و نازائی
دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
۳. گروه علوم تشریحی، مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولی‌عصر (عج)، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول: گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولی عصر (عج) تلفن: ۶۶۴۱۹۰۷۲
email: sobhania@sina.tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: این مطالعه به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های متفاوت فاکتور مهارکننده لوسمی انسانی بر حرکت اسپرم‌های نرمال انسانی و هم‌چنین بقای آن‌ها طراحی شده است. ***روش بررسی:*** در تحقیق حاضر ۳۰ نمونه نرمواسپرمی بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی انتخاب شدند. اسپرم‌های هر نمونه پس از آماده‌سازی در محیط کشت Ham's F10+FCS%10 بدون فاکتور مهارکننده لوسمی و با غلظت‌های ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر همان فاکتور در شرایط ^{o}c ۳۷ و CO_2 ۵٪ کشت داده شدند. نمونه‌ها ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشت ارزیابی شده و اطلاعات مربوط به حرکت اسپرم‌ها و هم‌چنین بقای آن‌ها با استفاده از روش تورم سلولی هیپواسموتیک (host) ارزیابی و اطلاعات حاصله پس از ثبت در فرم‌های ویژه با استفاده از آزمون ANOVA و LSD توسط نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. ***یافته‌ها:*** نتایج مطالعه نشان داد که اگر اسپرم‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت با غلظت‌های پنج و ده نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی کشت داده شوند تحرک رو به جلو اسپرم‌ها و در غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تحرک در جای اسپرم‌ها بهبود می‌یابد ($p<۰/۰۵$). در همین مدت زمان، بقای اسپرم‌ها در محیط کشت با فاکتور مهارکننده لوسمی با غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌صورت معنی‌داری بهبود می‌یابد ($p<۰/۰۵$). بعد از ۴۸ ساعت تنها بقای اسپرم‌ها در غلظت‌های ده و ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p<۰/۰۵$). تحرک در جای اسپرم‌ها بعد از ۴۸ ساعت در محیط دارای فاکتور مهارکننده لوسمی با غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر بهبود می‌یابد ($p<۰/۰۵$). ***نتیجه‌گیری:*** تاثیر فاکتور مهارکننده لوسمی بر حرکت و بقاء اسپرم‌های نرمال انسانی به غلظت آن و مدت زمان کشت مرتبط است.

کلمات کلیدی: اسپرم، تحرک، بقا، فاکتور مهارکننده لوسمی.

مقدمه

لوله فالوپ fallopian tube یک ارگان پیچیده و ظریف بوده و اعمال متعددی دارد. در بسیاری از گونه‌های حیوانات لوله فالوپ به‌عنوان منبع ذخیره‌کننده اسپرم است.[۱و۲] اسپرم‌ها در ایسموس لوله رحم ذخیره و به‌طور همزمان به‌طرف ناحیه آمپولا حرکت می‌کنند. گفته می‌شود که احتمالاً سلول‌های اپی تلیالی لوله فالوپ و مایع آن بر بلوغ و انتقال گامت‌ها و جنین موثر است.[۳] هم‌چنین عده‌ای از محققان معتقدند که ترشحات سلول‌های اپی تلیالی لوله رحم ممکن است نقش مهمی بر حرکت و بقای اسپرم داشته باشد.[۴] مطالعات نشان داده است که در انسان فاکتور مهارکننده لوسمی در غلظت بالایی از سلول‌های اپی‌تلیالی بخش آمپول لوله فالوپ ترشح می‌شود.[۵] این فاکتور یک سیتوکین از خانواده اینترلوکین- ۶ با وزن مولکولی ۶۷- ۳۸ کیلو دالتون است و بر انواع مختلف سلول‌ها فعالیت دارد.[۶] گیرنده این فاکتور بر سطح سلول‌های عصبی، مگاکاریوسیت‌ها، میوبلاست‌ها، استئوبلاست، ماکروفاژها، سلول‌های توده داخلی بلاستوسیست و سلول‌های آندومتر رحم دیده شده است.[۷-۹] فاکتور مهارکننده لوسمی دارای اعمالی مانند جلوگیری از تمایز سلول‌های ریشه‌ای جنین،[۱۰] تحریک آزادسازی کلسیم از استخوان،[۱۱] القاء سنتز پروتئین‌ها،[۱۲] القای تمایز، تکثیر و افزایش طول عمر (survival rate) سلول‌های جنینی[۱۳] می‌باشد. هم‌چنین این فاکتور نقش ویژه‌ای در عمل جایگزینی دارد[۱۴]. حال با توجه به این‌که اسپرم‌ها برای رسیدن به محل لقاح (آمپولا) می‌بایست مسافت طولانی رحم و لوله فالوپ را

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]

طی کنند به‌نظر می‌رسد که فاکتور مهارکننده لوسمی مترشحه از بخش آمپولار لوله فالوپ بتواند حرکت و بقای اسپرم‌ها را تحت تاثیر قرار دهد. در این زمینه مطالعاتی انجام شده لیکن دوز دقیقی ارائه نشده است. لذا با توجه به این امر تصمیم گرفته شد تا اثر غلظت‌های ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی انسانی که به‌صورت تجاری در بازار موجود است بر حرکت و بقای اسپرم‌های انسانی نرمال مطالعه‌ای انجام شود. تا به‌حال در مورد میزان فاکتور مهارکننده لوسمی در لوله رحم و مایع رحم انسانی گزارشی ارائه نشده است. اما مطالعات گذشته نشان داده است که میزان یک و هفت نانوگرم در میلی‌لیتر این فاکتور به‌ترتیب بقاء سلول‌های سرتولی و گونوسیت‌های در حال تقسیم را بهبود می‌بخشد.[۱۵] در مطالعه دیگر Attar غلظت‌های ۵۰-۱ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی بر حرکت و بقای اسپرم را مورد مطالعه قرار دادند که نتیجه حاصله این بود که غلظت‌های ۵۰-۳ نانوگرم در میلی‌لیتر بر حرکت و بقای اسپرم‌های انسانی موثر است.[۱۶] در مطالعه حاضر تصمیم گرفته شد که مشابه مطالعه فوق اثر غلظت‌های متفاوت ۵۰-۳ نانوگرم در لیتر بر حرکت رو به جلو و در جای اسپرم‌های نرمال انسانی و هم‌چنین بقای آنها را بعد از ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت کشت بررسی شوند. در این تحقیق به‌جای استفاده از فاکتور مهارکننده لوسمی حاصل از هم‌کشتی که نیازمند صرف وقت و هزینه بالاست از فاکتور مهارکننده لوسمی نوترکیبی انسانی به‌دلیل آسانی دسترسی به آن، سادگی کاربرد آن و عدم احتمال ایجاد عفونت ویروسی استفاده شده است.

روش بررسی

نمونه منی مربوط به ۳۰ نفر از مراجعه‌کنندگان به مرکز ناباروری بیمارستان امام خمینی اهواز بعد از کسب رضایت آنها جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها طبق استانداردهای سازمان بهداشت جهانی نرمال بودند.[۱۷] نمونه‌ها از طریق استمناء (masturbation) بعد از ۴- ۳ روز خودداری جنسی در ظرفی استریل جمع‌آوری شدند. سپس برای یکنواخت شدن به‌مدت نیم ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از یکنواخت شدن کامل نمونه را با محیط کشت Ham's F10+FCS%10 و دو بار با دور ۲۵۰۰ به‌مدت پنج دقیقه شستشو داده شد. بعد از شستشو به‌منظور ظرفیت‌پذیری اسپرم یک ساعت در انکوباتور و تحت شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ آنکوبه شدند. بعد از آن اسپرم‌های حاصله را در قطرات محیط کشت بدون فاکتور مهارکننده لوسمی (به‌عنوان محیط کشت کنترل) و با غلظت‌های ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر همان فاکتور کشت داده شدند. ارزیابی حرکت پیشرونده و در جای اسپرم‌ها و بقای آنها پس از شش، ۲۴ و ۴۸ ساعت کشت به‌ترتیب زیر انجام شد. شمارش اسپرم‌ها دارای تحرک پیشرونده (دارای حرکت انتقالی و زنش دم) و غیر پیشرونده (اسپرم‌هایی که علیرغم زنش دم حرکتی رو به جلو نداشته باشند) با استفاده از حفره شمارش اسپرم (Mackler Chamber) انجام گرفت و به‌صورت درصد گزارش داده شدند.

آزمون تورم سلولی هیپواسمولار: از آزمون Host بر اساس متد Giean و همکاران برای بررسی بقای اسپرم‌ها استفاده به‌عمل آمد. در این روش برای تهیه محلول هیپو اسمولار ابتدا سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد را با حجم مساوی آب مقطر مخلوط و اسمولاریته مایع به‌حدود ۱۵۰ میلی اسمول رسید.[۱۸] سپس نمونه آماده شده و محلول هیپواسمولار تهیه شده را به نسبت یک به دو مخلوط و پس از نیم ساعت اسپرم‌ها در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند. در این روش اسپرم زنده دچار تورم و افزایش مایع در سیتوپلاسم می‌شود که در این ناحیه دم اسپرم با به‌وجود آمدن اشکال مختلف قابل مشاهده است. در اسپرم مرده هیچ‌گونه تغییر شکلی در ناحیه دمی اسپرم مشاهده نمی‌شود. تغییرات ایجاد شده با الگوهای مختلف به‌عنوان host مثبت[۱۹] و به‌صورت درصد در فرم مخصوص جمع‌آوری اطلاعات نوشته شدند. یافته‌های پژوهش یعنی درصد تحرک پیشرونده و غیر پیشرونده و درصد بقای اسپرم‌ها در محیط کشت با و بدون فاکتور مهارکننده لوسمی و طی مدت زمان‌های کشت متفاوت پس از جمع‌آوری با استفاده از برنامه آماری SPSS ویراست یازدهم مورد ارزیابی قرار گرفتند. میانگین درصد تحرک و هم‌چنین بقاء اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف مورد مطالعه با استفاده از روش ANOVA محاسبه گردید. برای مقایسه درصد تحرک و بقاء اسپرم‌ها با یکدیگر از روش Least Square Difference (LSD) استفاده گردید. ارزش p کمتر از ۵٪ به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین سن افراد مورد مطالعه ۵/۲+۲۷ سال بود. در جدول ۱ کلیه اطلاعات لازم مربوط به تحرک رو به جلو و در جای اسپرم‌ها و

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]

همچنین بقاء آن‌ها پس از کشت در غلظت‌های متفاوت فاکتور مهارکننده لوسمی آمده است. الف) بررسی حرکت رو به جلو، حرکت در جا و بقاء اسپرم‌ها پس از شش ساعت کشت در محیط کشت حاوی صفر تا ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی: درصد تحرک رو به جلو اسپرم در محیط کشت کنترل ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب برابر با ۷۵±۹/۲، ۱۱/۱±۷۶، ۱۳/۹±۷۲، ۱۰/۲±۷۹/۲، ۹/۸±۸۲/۹ می‌باشد. آنالیز آماری انجام شده نشان می‌دهد که در غلظت‌های فوق تحرک رو به جلو اسپرم هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری نخواهد کرد (p>۰/۰۵). درصد تحرک در جای اسپرم در محیط کشت کنترل ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب برابر با ۷/۱±۱۳، ۸/۹±۱۵، ۹/۲±۱۹، ۶/۴±۱۵/۱، ۱۰/۳±۱۶/۱ می‌باشد. آنالیز آماری انجام شده نشان می‌دهد که در غلظت‌های فوق تحرک در جای اسپرم هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری نخواهد کرد (p>۰/۰۵). درصد بقای اسپرم‌ها در محیط کشت کنترل ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ به‌ترتیب برابر با ۱/۲±۹۰/۸، ۱/۷±۹۲/۷، ۲/۶±۸۹/۳، ۱/۳±۹۶/۱، ۱/۶±۸۶/۴ می‌باشد. آنالیز آماری انجام شده نشان می‌دهد که در غلظت‌های فوق میزان بقای اسپرم هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری نخواهد کرد (p>۰/۰۵). ب) بررسی حرکت رو به جلو حرکت در جا و بقای اسپرم‌ها پس از ۲۴ ساعت کشت در محیط‌های کشت حاوی صفر تا ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی: درصد تحرک رو به جلو اسپرم در محیط کشت کنترل ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ به‌ترتیب برابر با ۱۳/۲±۲۰/۹، ۱۱/۳±۲۲/۲، ۷/۶±۳۱/۸، ۸/۹±۳۹ و ۱۵/۶±۱۹ می‌باشد. آنالیز آماری انجام شده نشان می‌دهد که در محیط کشت حاوی ۵ و ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تحرک رو به جلو بهبود می‌یابد (p<۰/۰۵). مقایسه آماری انجام شده نشان‌دهنده موثر بودن محیط کشت با غلظت ده نانوگرم در میلی‌لیتر نسبت به محیط کشت دارای پنج نانوگرم در میلی‌لیتر می‌باشد (p=۰/۰۰۲). درصد تحرک در جای اسپرم در محیط کشت، کشت کنترل ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب برابر با ۳۲±۹/۹، ۳۲±۹/۱، ۲۸/۹±۸/۷، ۳۰/۸±۵/۳، ۵۱/۲±۷/۷ می‌باشد. آنالیز آماری انجام شده نشان می‌دهد که در محیط کشت حاوی ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی تحرک در جای اسپرم‌ها به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها بهبود می‌یابد (p<۰/۰۵). درصد بقای اسپرم‌ها در محیط کشت، کشت کنترل ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب برابر با ۱/۳±۵۳/۸، ۱/۱±۴۹/۱، ۱/۸±۵۰/۲، ۵/۹±۵۵/۳ و ۷/۸±۷۳/۲ می‌باشد. آنالیز آماری انجام شده نشان می‌دهد که در محیط کشت حاوی ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی بقای اسپرم‌ها به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها بهبود می‌یابد (p<۰/۰۵). ج) بررسی حرکت رو به جلو، حرکت در جا و بقای اسپرم‌ها پس از ۴۸ ساعت کشت در محیط کشت حاوی صفر تا ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی: درصد تحرک رو به جلو اسپرم در محیط کشت کنترل ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ به‌ترتیب برابر با ۳/۲±۵/۶، ۴/۶±۹/۱، ۳/۷±۱۳، ۲/۱±۸/۸ و ۳/۸±۸ آنالیز آماری نشان می‌دهد که در محیط کشت‌های فوق حرکت رو به جلو تغییر نمی‌یابد (p>۰/۰۵). درصد تحرک در جای اسپرم در محیط کشت کنترل ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب برابر با ۳/۶±۱۵، ۳/۹±۱۷، ۲/۱±۱۰/۲، ۲/۶±۲۰/۱، ۳/۲±۳۵/۲ می‌باشد. همچنین در محیط کشت حاوی ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی تحرک در جای اسپرم‌ها به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها بهبود می‌یابد (p<۰/۰۵). درصد بقای اسپرم‌ها در محیط کشت کنترل، ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب برابر با ۲۱/۳±۲۸/۴، ۱۲/۶±۳۰/۲، ۱۹/۵±۳۳/۶، ۱۳/۲±۴۶/۷، ۱۰/۲±۵۰/۵ می‌باشد. آنالیز آماری نشان می‌دهد که در

جدول-۱: درصد حرکت رو به جلو و در جای اسپرم‌ها و درصد بقای اسپرم‌های انسانی در محیط‌های کشت با غلظت‌های متفاوت فاکتور مهارکننده لوسمی

محیط کشت	حرکت پیشرونده	حرکت درجا	بقاء	حرکت پیشرونده	حرکت درجا	بقاء	حرکت پیشرونده	حرکت درجا	بقاء
کنترل (بدون LIF)	۷۵±۹/۲	۱۳±۷/۱	۹۰/۸±۱/۲	۲۰/۹±۱۳/۲	۳۲±۹/۹	۵۳/۸±۱/۳	۵/۶±۳/۲	۱۵±۳/۶	۲۸/۴±۲۱/۳
۳ Ng/ml LIF	۷۶±۱۱/۱	۱۵±۸/۹	۹۲/۷±۱/۷	۲۲/۲±۱۱/۳	۳۲±۹/۱	۴۹/۱±۱/۱	۹/۱±۴/۶	۱۷±۳/۹	۳۰/۲±۱۲/۶
۵ Ng/ml LIF	۷۲±۱۳/۹	۱۹±۹/۲	۸۹/۳±۲/۶	●۳۱/۸±۷/۶	۲۸/۹±۸/۷	۵۰/۳±۱/۸	۱۳±۳/۷	۱۰/۲±۲/۱	۳۳/۶±۱۹/۵
۱۰ Ng/ml LIF	۷۹/۲±۱۰/۲	۱۵/۱±۶/۴	۹۶/۱±۱/۳	σ●۳۹±۸/۹	۳۰/۸±۵/۳	۵۵/۳±۵/۹	۸/۸±۲/۱	۲۰/۱±۲/۶	●۴۶/۷±۱۳/۲
۵۰ Ng/ml LIF	۸۲/۹±۹/۸	۱۶/۱±۱۰/۳	۸۶/۴±۱/۶	۱۹±۱۵/۶	σ●۵۱/۲±۷/۷	σ●۷۳/۲±۷/۸	۸±۳/۸	σ●۳۵/۲±۳/۲	σ●۵۰/۵±۱۰/۲

●: معنی‌دار بودن نسبت به محیط کشت کنترل σ: معنی‌دار بودن نسبت به سایر غلظت‌ها

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]

محیط کشت حاوی ۵۰ و ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی بقای اسپرم‌ها به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها بهبود می‌یابد ($p<۰/۰۵$). محیط کشت با غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری نسبت به محیط کشت با ده نانوگرم در میلی‌لیتر تحرک در جای اسپرم را بهبود می‌بخشد ($p=۰/۰۰۱$).

بحث

نظر به حضور قابل ملاحظه فاکتور مهارکنندهٔ لوسمی انسانی در لولهٔ فالوپ و نقش غیر قابل انکار این فاکتور در تحرک و بقای اسپرم پژوهش حاضر به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های متفاوت این فاکتور بر حرکت اسپرم‌های نرمال انسانی و هم‌چنین بقای آن‌ها طراحی شده است. در این مطالعه مشخص شد که با کشت اسپرمهای نرمال انسانی در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف ۳ تا ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌مدت شش ساعت تغییری معنی‌دار در حرکت و بقای اسپرم‌ها مشاهده نمی‌شود که با نتایج حاصل از مطالعه اخیر Attar هم‌خوانی داشت.[۱۶] مطالعات نشان داده است که با هم‌کشتی سلول‌های اپی تلیالی لوله فالوپ و اسپرم‌ها میزان تحرک و بقای اسپرم‌ها افزایش می‌یابد. اما این اثر در مدت زمان کمتر از پنج ساعت مشاهده نمی‌شود[۲۱و۲۰] و این نتیجه تقریباً مشابه همان نتیجه‌ای است که از این مطالعه گرفته شده است. حقیقت این است که اطلاعات در مورد اثر ترشحات لوله رحم انسان بر عمل اسپرم خیلی محدود و در بعضی موارد متناقض است.[۲۲] اما بعضی مطالعات انجام شده نشان داده است که با هم‌کشتی اسپرم‌ها با لوله اپی تلیالی لوله رحم و یا با کشت اسپرم‌ها در محیط کشت مخصوص (conditional medium) حرکت و بقاء اسپرم‌ها بهبود می‌یابد. در مورد اثر مکانیسم اثر مایع لوله رحمی دو تئوری مطرح است که اولین آن بیان می‌دارد که مایع لوله رحمی اثر تغذیه‌ای دارد و هم‌چنین تمام ضروریات اولیه برای بقاء گامت‌ها و تکامل جنین‌ها می‌کند و عده دیگری معتقدند که ترشحات لوله فالوپ باعث تنظیم عمل گامت‌ها از طریق عمل متقابل (interaction) دارد و می‌توانند رشد و تمایز جنین‌ها را تحت تاثیر قرار دهد.[۲۲] Siow و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که سلول‌های اپی تلیالی لوله رحم کشت داده شده فاکتور مهارکننده لوسمی ترشح می‌کنند که این فاکتور باعث حفظ حرکت اسپرم‌ها می‌شود که این نشان‌دهنده این است که سلول‌های اسپرم دارای گیرنده این فاکتور است.[۲۳] اصولا سیتوکین‌ها که فاکتور مهارکننده لوسمی یکی از آنهاست عمل سلول‌ها را از طریق گیرنده اختصاصی سطح سلولی تنظیم می‌کنند. عمل بیولوژیکی فاکتور مهارکننده لوسمی بر اسپرم هم از این طریق است یعنی این فاکتور باید با گیرنده اختصاصی سطح اسپرم عمل متقابل داشته باشد. Jenab و همکاران[۲۴] معتقد هستند که mRNA مربوط به گیرنده فاکتور مهارکننده لوسمی در اسپرماتید در حال دراز شدن (elongating spermatid) خرگوش بیان می‌شود و این موضوع نشان‌دهنده این است که فاکتور مهارکننده لوسمی با سلول‌های جنسی و اسپرماتیدها عمل متقابل دارد و به‌صورت غیر مستقیم و به‌وسیله آزاد شدن ماده ثانویه نمی‌باشد. Kenis و همکاران[۲۵] مشاهده کردند که گیرنده فاکتور مهارکننده لوسمی به‌صورت محلول در مایع منی وجود دارد و این امر نشان‌دهنده اثر فعال این سیتوکین بر عمل اسپرماتوژنز است. Attar در مطالعه خود ثابت کرد که اگر اسپرم‌های نرمال انسانی به‌مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت حاوی غلظت‌های متفاوت فاکتور مهارکننده لوسمی کشت داده شوند در غلظت‌های سه تا ده نانوگرم در میلی‌لیتر حرکت اسپرم‌ها زیاد می‌شود و بیشترین درصد حرکت اسپرم‌ها در محیط کشت دارای پنج نانوگرم در میلی‌لیتر بوده و حرکت اسپرم‌ها در غلظت ۵۰ نانوگرم مشابه گروه کنترل است. در این مطالعه حرکت رو به جلوی اسپرم در محیط کشت حاوی پنج و ده نانوگرم بهبود نشان داد که بیشترین حرکت در محیط کشت دارای ده نانوگرم فاکتور مهارکننده لوسمی است. هم‌چنین بیشترین درصد اسپرم‌های متحرک در جا در محیط کشت حاوی ۵۰ نانوگرم مشاهده شد. تفاوت موجود بین دو مطالعه انجام شده احتمالاً به‌دلیل تفاوت در روش ارزیابی تحرک اسپرم‌ها باشد چرا که در مطالعه Attar[۱۶] از دستگاه sperm quality analyzer استفاده شد حال آن‌که در مطالعه ما از روش مطالعه چشمی استفاده شد و اما با کشت اسپرم‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف فاکتور مهارکننده لوسمی مشاهده شد که در محیط‌های کشت دارای غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ نانوگرم بقاء اسپرم‌ها زیاد می‌شود. بیشترین میزان اسپرم‌های زنده به‌دست آمده در محیط کشت حاوی ۵۰ نانوگرم به‌دست آمد. البته در همین غلظت اسپرم‌های با تحرک در جا نیز به‌طور معنی‌داری زیاد شده است. حال آن‌که Attar در مطالعه خود ثابت کرد که در غلظت ده نانوگرم بیشترین میزان اسپرم‌های زنده حاصل می‌شود. فاکتور

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]

مهارکننده لوسمی با غلظت مشخص و مدت زمان معین و طی مکانیسم ناشناخته می‌تواند حرکت اسپرم‌های نرمال انسانی و هم‌چنین طول عمر این اسپرم‌ها را افزایش دهد و به‌نظر می‌رسد که با انجام تحقیقات و مطالعات گسترده‌تر شاید بتوان محیط کشتی را طراحی کرد که با کشت اسپرم‌ها در آن به‌مدت زیاد تحرک این اسپرم‌ها را حفظ کرد.

سپاسگزاری: این تحقیق بخشی از طرح تحقیقاتی شماره ۸/۲۰/۹۰۱۸ مصوب ۸۳/۱۲/۲۳ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور می‌باشند. کلیه هزینه‌های این طرح توسط آن معاونت تامین شده است که بدین‌وسیله کلیه نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه جندی شاپور کمال تشکر را دارند.

References

1. Dobrinski I, Smith TT, Suarez SS, Ball BA. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56: 861-9.
2. Ellington JE, Samper JC, Jones AE, Oliver SA, Burnett KM, Wright RW. In vitro interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products. *Anim Reprod Sci* 1999; 56: 51-65.
3. Zhu J, Barratt CL, Lippes J, Pacey AA, Lenton EA, Cooke ID. Human oviductal fluid prolongs sperm survival. *Fertil Steril* 1994; 61: 360-6.
4. Abe H, Sendai Y, Satoh T, Hoshi H. Secretory products of bovine oviductal epithelial cells support the viability and motility of bovine spermatozoa in culture in vitro. *J Exp Zool* 1995; 272: 54-61.
5. Keltz MD, Attar E, Buradagunta S, Olive DL, Kliman HJ, Arici A. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in the human fallopian tube. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 1611-9.
6. Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D. Purification of a murine leukemia inhibitory factor from Krebs ascites cells. *Anal Biochem* 1988; 173: 359-67.
7. Hilton DJ. LIF: lots of interesting functions. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 72-6.
8. Nichols J, Davidson D, Taga T, Yoshida K, Chambers I, Smith A. Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. *Mech Dev* 1996; 57: 123-31.
9. Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 3115-20.
10. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988; 336: 684-7.
11. Abe E, Tanaka H, Ishimi Y, Miyaura C, Hayashi T, Nagasawa H, et al. Differentiation-inducing factor purified from conditioned medium of mitogen-treated spleen cell cultures stimulates bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 5958-62.
12. Baumann H, Wang GG. Hepatocyte-stimulating factor III shares structural and functional identity with leukemia-inhibitory factor. *J Immunol* 1989; 143: 1163-7.
13. Metcalf D. Leukemia inhibitory factor: a puzzling polyfunctional regulator. *Growth Factors* 1992; 7: 169-73.
14. Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 11408-12.
15. De Miguel MP, De Boer-Brouwer M, Paniagua R, van den Hurk R, De Rooij DG, Van Dissel-Emiliani FM. Leukemia inhibitory factor and ciliary neurotropic factor promote the survival of Sertoli cells and gonocytes in coculture system. *Endocrinology* 1996; 137: 1885-93.
16. Attar E, Ozsait B, Bulgurcuoglu S, Serdaroglu H, Arici A. Effect of leukaemia inhibitory factor on long-term sperm motility and survival. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 71-4.
17. World Health organization. WHO laboratory manual for the examination of semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge University press: 1992.
18. Jiaen L, Yieh-Loong T, Eugene K, Campton G, Garcia JE, Baramik TA. High fertilization rate obtained after intracytoplasmic sperm injection with 100% nonmotile spermatozoa selected by using a simple modified hypo-osmotic swelling test. *Fertility Sterility* 1997; 68: 373-6.
19. Hossain AM, Rizk B, Barik S, Huff C, Thorneycroft IH. Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Hum Reprod* 1998; 13: 1578-83.
20. Zhu J, Pacey AA, Barratt CLR, Cooks ID, Lippes J. The sequential effect of human cervical mucus, oviductal fluid and follicular fluid on sperm function. Fertil Steril 1994; 61: 1129-35.
21. Yeung WS, Ng VK, Lau EY, Ho PC. Human oviductal cells and their conditioned medium maintain the motility and hyperactivation of human spermatozoa in vitro. *Hum Reprod* 1994; 9: 656-60.
22. Quintero I, Ghersevich S, Caille A, Munuce MJ, Daniele SM, Morisoli L. Effects of human oviductal in vitro secretion on spermatozoa and search of sperm-oviductal proteins interactions. *Int J Androl* 2005; 28: 137-43.
23. Siow Y, Fallat ME, Amin FA, Belker AM. Müllerian inhibiting substance improves longevity of motility and viability of fresh and cryopreserved sperm. *J Androl* 1998; 19: 568-72.
24. Jenab S, Morris PL. Testicular leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor mediate phosphorylation of signal transducers and activators of transcription (STAT)-3 and STAT-1 and induce c-fos transcription and activator protein-1 activation in rat Sertoli but not germ cells. *Endocrinology* 1998; 139: 1883-90.
25. Kenis G, Bosmans E, Pitard V. High levels of soluble LIF receptor in seminal fluid. 15th Annual Meeting of the Europian Society of Human Reproduction and Embryology and Annual Meeting of the Federation Francaise: 1999.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]

Tehran University Medical Journal; Vol. 65, No. 9, Dec 2007: 1-6

The effect of human recombinant leukemia inhibitory factor on sperm motility and survival

Saki Gh. [1]
Ghalambor Dezfully F.[2]
Sobhani A.[*2]

1- Department of Anatomy, Physiology Research Center
2-Department of obstetric and Gynecology

Jondi Shapour University of Medical Sciences

3- Department of Anatomy, Vali-e-Asr Reproductive Health Research Center, Tehran University of Medical Sciences

* Corresponding author: Dept. of Anatomy, Vali-e-Asr Reproductive Health Research Center, Tehran University of Medical Sciences
Tel: +98-21-66419072
email: sobhania@sina.tums.ac.ir

Abstract

***Background*:** Leukemia inhibitory factor (LIF) is a group of secreted glycoproteins with molecular weights ranging from 38-67 kD, resulting from differential protein glycosylation. LIF is constitutively expressed at high levels in the human fallopian tube epithelium and has an important role in the motility and vitality of sperm. In the present study, the effect of human recombinant LIF on human sperm motility and survival *in vitro* was investigated.

***Methods*:** Normal spermatozoa of 30 fertile men were collected and after preparation were incubated in Ham's F10+FCS 10% medium, containing various concentrations (0, 3, 5, 10, and 50 ng/ml) of LIF at 37 ºC under 5% CO_2 for 6, 24 and 48 hours. Sperm motion characteristics were measured using a Makler chamber. Sperm survival was determined using the hypoosmotic swelling test. Collected data were analyzed by one-way ANOVA and LSD test using SPSS version 11. The difference in values were considered significant when $p<0.05$.

***Results*:** Sperm motility was significantly higher after 24 h exposure to 5-10 ng/ml LIF ($p<0.05$). The survival rate of sperm was significantly prolonged when exposed to 50 ng/ml LIF ($p<0.05$). Nonprogressive motility and survival rate of sperm were significantly higher after 48 h exposure to 50 ng/ml and 10-50 ng/ml LIF, respectively. ($p<0.05$). There was no significant difference in progressive sperm motility during the 48 h exposure of sperm to the various concentrations of LIF.

***Conclusion*:** According to our results, the effect of LIF on sperm motility and survival were dependent on the dose of LIF supplementation and the length of incubation.

Keywords: Normal spermatozoa, motility, survival, LIF, fallopian tube.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-23]