مقاله تحقیقی

مقایسه تأثیر افزودن پروژسترون و کلسیم یونوفور بر پارامترهای اسپرم موش و میزان باروری

عبدالحسین شاهوردی .M.Sc*، منصوره موحدین .Ph.D* مجتبی رضازاده ولوجردی .Ph.D**،*** سعید کاظمی .Ph.D**

*گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

**گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: فروردین ماه ۸۴، تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۸۴

چکیده

هدف: مطالعه تأثیر افزودن پرژوسترون و کلسیم یونوفور بر پارامترهای اسپرم موش و میزان باروری در محیط آزمایشگاه

مواد و روشها: دم اپیدیدیم موش نر بالغ NMRI (سن ۱۲-۱۰ هفته) خارج و در سه گروه کنترل، کلسیم یونوفور (۱۰ میکرومولار) و پروژسترون (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با محیط کشت T6 به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه و سپس مشخصات اسپرم طبق استاندارد WHO بررسی و اندازه‌گیری شد. نمونه‌های اسپرم ۳ گروه با تخمک گرفته شده از موش ماده NMRI با سن ۱۰-۷ هفته‌ای مجاور و نتایج لقاح و تکوین جنین تا ۱۲۰ ساعت بعد ثبت شد. نتایج کسب شده با آزمونهای آماری ANOVA، χ^2 و تست دقیق فیشر تجزیه و تحلیل گردیدند.

یافته‌ها: میانگین درجه حرکتی ۳ در گروه پروژسترون نسبت به گروه کنترل افزایش داشته و از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0.05$) ولی علیرغم افزایش درجه حرکتی ۳ در گروه کلسیم نسبت به گروه کنترل، از نظر آماری معنی‌دار نبود. تعداد جنینهای حاصل از اسپرم تیمار شده با کلسیم نسبت به دو گروه دیگر وضعیت مطلوبتر و تفاوت آنها از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که پروژسترون و کلسیم ضمن افزایش تحرک اسپرم میزان لقاح را بهبود می‌بخشد.

کلید واژه‌ها: پروژسترون، کلسیم یونوفور، لقاح آزمایشگاهی، موش

مقدمه

موفقیت در لقاح بستگی به تعامل مناسب اسپرم با تخمک و اتصال آنها دارد. برای رسیدن به این هدف اسپرم بایستی تحت شرایطی با ترشح اکروزوم، ظرفیت یابد که در اصطلاح به آن واکنش اکروزومی گفته می‌شود. واکنش اکروزومی شامل آزاد شدن تعدادی آنزیم هیدرولیتیک برای اتصال راحت‌تر اسپرم به غشای تخمک است[۱]. واکنش اکروزومی به هنگام اتصال لیگاند تخمک به گیرنده اسپرم آغاز می‌شود. این سیگنال باعث ایجاد پیام دوم در فضای داخل سلولی می‌شود، چندین مسیر پیام ثانویه در اسپرم انسان شناخته شده است که نتیجه آنها فعال شدن cAMP یا cGMP و پروتئین کیناز وابسته به فسفولیپد است [۲]. در این پدیده، یون کلسیم داخل سلولی فعال و افزایش می‌یابد. در مطالعات انجام شده کلسیم یونوفور A23187 به عنوان آغازگرواکنش اکروزومی در ظرفیت یابی اسپرم انسان مشاهده و گزارش شده است[۲و۳]. موارد دیگری نیز به‌عنوان القاء کننده واکنش اکروزومی و همچنین افزایش دهنده یون کلسیم داخل سلولی مثل زوناپلوسیدا و پروژسترون شناسایی شده است [۴و۵].

ظرفیت یابی اسپرم در سیستم تناسلی مؤنث با تغییراتی در ساختار غشای اسپرم صورت می‌گیرد تا اسپرم توانایی باروری تخمک را به دست آورد. این تغییرات شامل مجموعه اطلاعات عملکردی و بیوشیمیایی است که در اسپرم رخ می‌دهد که در نهایت اسپرم قادر به انجام واکنش اکروزومی و بیش فعالی می‌شود. در بررسیها به لزوم حضور یون کلسیم برای اکتساب قدرت باروری اسپرم انسان در محیط آزمایشگاه اشاره شده است [۶،۷و۸]. غلظتهای پایین یون کلسیم نیز برای ظرفیت‌یابی اسپرم موش ضروری است [۹].

آدرس مکاتبه : تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵ Email: Movahedm@hatmail.com

بیش فعال شدن اسپرم برای عبور از لوله رحمی و نفوذ در قشر شفاف (زوناپلوسیدا) ضروری است [۱۰و۱۱]. واکنش اکروزومی اسپرم که با خارج شدن وزیکلهای اکروزوم از اسپرم مشخص می‌شود برای اتصال اسپرم به غشای تخمک ضروری است و قشر شفاف در پستانداران به صورت یک آغازگر فیزیولوژیکی برای واکنش اکروزومی هنگام لقاح محسوب شده و در محیط کشت نیز عمده‌ترین گلیکوپروتئین قشر شفاف (ZP3)، واکنش اکروزومی وابسته به گونه را تحریک می‌نماید [۱و۱۲]. یک دلیل احتمالی فعالیت القایی واکنش اکروزومی، ترشحات پروژسترون حاصل از سلولهای کومولوس است، هورمونی که طی تخمک‌گذاری بین ۵ تا ۱۰ میکرومول تولید می‌شود [۱۳]. آثار پروژسترون روی اسپرم شامل تسریع فعالیت جریان کلسیمی غیروابسته به ژنوم است [۱۴]. پروژسترون باعث افزایش فوری در Ca^{2+} در اسپرم ظرفیت‌گیری شده و نشده انسانی می‌شود [۵]. تزریق اسپرم خرگوش مجاور شده با پروژسترون میزان لقاح را افزایش معنی‌داری می‌دهد[۱۵].

به‌نظر می‌رسد محیط کشت اسپرم دارای کلسیم یونوفور و یا پروژسترون باعث تسریع در واکنش اکروزومی و بیش فعالی اسپرم می‌شود. افزایش غلظت یون کلسیم در داخل سلول می‌تواند در حضور یون کلسیم افزوده شده به محیط کشت و یا محیط کشت حاوی پروژسترون صورت پذیرد [۱۶ و ۱۷].

این پژوهش با هدف بررسی و مقایسه دو فاکتور کلسیم یونوفور و پروژسترون افزوده شده به محیط کشت حاوی اسپرم و بررسی نتایج لقاح حاصل از اسپرم فعال شده صورت می‌گیرد.

مواد و روشها

موش نر بالغ NMRI با سن ۱۲ـ۱۰ هفته که از مؤسسه رازی تهیه شده بود و پس از کشته شدن به روش در رفتگی مهره گردنی، دم اپیدیدیم آنها خارج و به محیط کشت منتقل شد. تخمکها نیز از موش ماده NMRI با سن ۱۰ـ۷ هفته که از مؤسسه رازی تهیه شده بود، به‌دست آمد.

گروههای آزمایشی

گروههای مورد مطالعه در این تحقیق گروه کنترل (محیط کشت T6 حاوی BSA5mg)، گروه آزمایشی کلسیم یونوفور (محیط کشت T6، حاوی BSA5mg/ml و ۱۰ میکرومولار کلسیم یونوفور (Sigma A2318-7)) و گروه آزمایشی پروژسترون (محیط کشت T6 حاوی ۱۰μg/ml پروژسترون (Sigma و P ۷۵۵۶) بود.

گروههای کنترل و آزمایشی کلسیم یونوفور به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مرطوب و ۵Co_2 درصد انکوبه شده و در گروه آزمایشی پروژسترون، پروژسترون به محیط کشت پس از انکوبه شدن نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه اضافه و سپس ۱۵ دقیقه دیگر نیز با شرایط ذکر شده انکوبه شدند.

ارزیابی اسپرم

نمونه‌ها پس از انکوبه شدن از انکوباتور خارج و قسمت بالای لوله که حاوی اسپرم خارج شده از اپیدیدیم است را برداشته و به مدت ده دقیقه در دور ۱۸۰۰ سانتریفوژ شدند و پلیت ته‌نشین شده به قطره T6 اضافه و پس از ۱۵ دقیقه انکوبه شدن از اسپرمهای فعال حاشیه قطره برای لقاح استفاده شد. قبل از سانتریفوژ روی تمام گروههای کنترل و آزمون پارامترهای اسپرم طبق استاندارد WHO (تحرک اسپرم، اشکال غیرطبیعی، تعداد) اندازه‌گیری و ثبت شدند.

تهیه تخمک

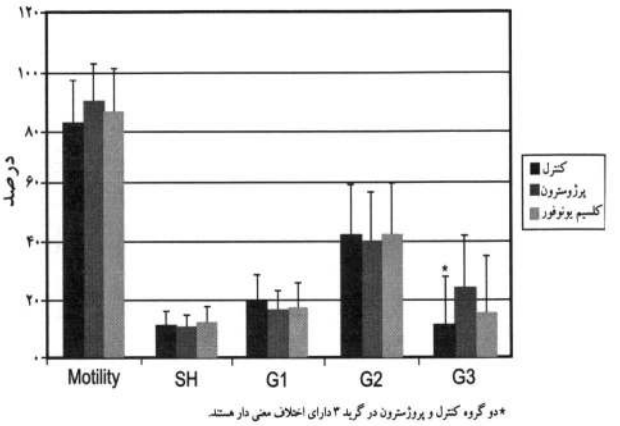
تخمک از موش ماده NMRI تحریک شده به‌دست آمده تحریک تخمک‌گذاری با تزریق ۷/۵IU PMSG و پس از ۴۸ ساعت تزریق ۷/۵IU hCG صورت گرفت. تخمک‌ها ۱۶ـ۱۴ ساعت بعد از تزریق HCG با کشتن موش به روش قطع نخاع و خارج کردن لوله رحمی و انتقال به قطره T6 حاوی ۱۵mg/ml سرم BSA به دست آمد. تخمکها بعد از خارج شدن از محل برآمده لوله رحمی در قطرات T6 شستشو شد.

بررسی آماری

نتایج کسب شده توسط آزمون ANOVA، χ^2 و تست دقیق فیشر و توکی (TUKEY) تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

سه گروه آزمایشی اسپرم پس از انکوبه شدن از نظر میزان حرکت و درجه حرکتی و همچنین میزان ناهنجاری و درصد ناهنجاری آنها در قسمتهای سر، بدن و دم مورد ارزیابی و نتایج ثبت شد. میانگین درجه حرکتی ۳ در گروه پرژوسترون ۱۸/۶ ± ۲۳/۹ و در گروه کنترل ۱۶/۴ ± ۱۰/۷ بود که از نظر آماری بین این دو گروه معنی‌دار بود (P<0.05) ولی بین گروههای دیگر ارتباط معنی‌دار مشاهده نشد (نمودار ۱).

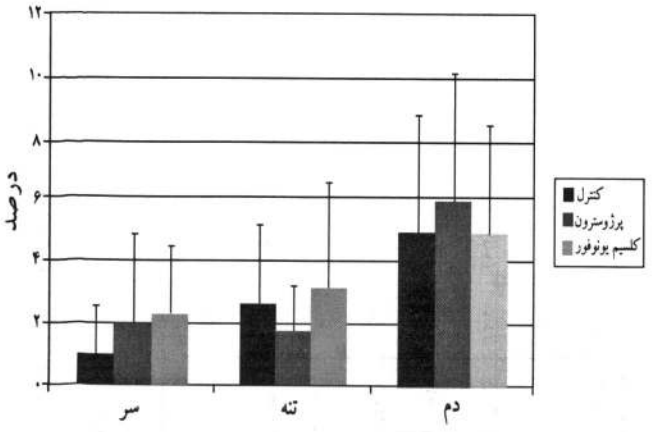


*دو گروه کنترل و پروژسترون در گرید ۳ دارای اختلاف معنی دار هستند.

نمودار ۱. مقایسه میزان درصد تحرک و درجه حرکتی اسپرمها بین ۳ گروه مورد مطالعه

نتایج کسب شده در بررسی ناهنجاریها نیز بین سه گروه معنی‌دار نبود (نمودار ۲). کمترین میزان شکل غیرطبیعی در ناحیه سر اسپرم در گروه کنترل (۱/۶ ± ۰/۹) و در ناحیه تنه در گروه پروژسترون (۱/۵ ± ۱/۷) و در ناحیه دم در گروه کنترل (۴/۳ ± ۵) مشاهده شد.

اسپرم گروههای آزمایش پس از انکوبه شدن به تخمکهای به‌دست آمده اضافه شدند و نتایج در سه گروه کنترل، پروژسترون و کلسیم یونوفور در ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت ثبت شد (جدول ۱). در ۲۴ ساعت اول تعداد بیشتری جنین ۴ سلولی در گروه کلسیم به‌دست آمد و از این نظر با دو گروه دیگر معنی دار بود (P<0.05). پس از گذشت ۴۸ ساعت همچنان درصد بالاتری جنین چهار سلولی در گروه کلسیم حاصل شد (۵۷/۱ درصد) که این میزان نسبت به گروه کنترل (۴۲/۶ درصد) معنی‌دار بود (P<0.01) و در این روز بیشترین میزان جنین دوسلولی مربوط به گروه کنترل بود (۳۵/۳ درصد) و کمتر از یک درصد جنین هشت سلولی در گروه پروژسترون ظاهر شد. در عین حال تنها در گروه کلسیم در این روز جنین مورولا به‌دست آمد (۲/۵ درصد) که نسبت به هر دو گروه دیگر این میزان معنی‌دار بود (P<0.05).



نمودار ۲. مقایسه میزان درصد اشکال غیرطبیعی اسپرمها در نواحی سر، تنه، دم بین ۳ گروه مورد مطالعه

در ۷۲ ساعت نیز وضعیت جنینهای هشت سلولی در گروه کلسیم یونوفور (۳۹/۹ درصد) نسبت به دو گروه دیگر وضعیت بهتر داشته و در مقایسه با آنها معنی دار بود(P<001). در صورتی‌که تعداد مورولا در گروه پروژسترون نسبت به گروههای دیگر بالاتر (۶/۵ درصد) و با گروه کلسیم معنی‌دار بود (P<0.05). درصد بلاستوسیست بین گروهها معنی‌دار مشاهده نشد ولی بیشترین درصد در گروه کلسیم (۸/۹ درصد) گزارش شد. در ۹۶ ساعت نیز درصد بالاتری مورولا درگروه کلسیم نسبت به دو گروه دیگر حاصل شد که در مقایسه با دو گروه دیگر معنی‌دار بود (P<0.001). درصد مورولا در گروه پروژسترون (۱۳/۹ درصد) نسبت به گروه کنترل (۷/۷ درصد) نیز بالاتر و در مقایسه با آن معنی‌دار بود(P<0.05). در این روز درصد بلاستوسیست در گروه کنترل نسبت به دو گروه دیگر بالاتر بود و از نظر آماری معنی‌دار نبود. در ۱۲۰ ساعت نیز تعداد بلاستوسیست در گروه کلسیم (۲۰/۲ درصد) نسبت به دو گروه دیگر بالاتر و در مقایسه با آنان معنی‌دار بود (P<0.05). میزان سلولهای تخم هچ شده در گروه پروژسترون در این روز نسبت به گروه کنترل و همچنین تعداد آن در گروه کلسیم نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (P<0.05).

جدول بررسی میزان لقاح و تکوین جنین‌های حاصل از تلقیح اسپرم فعال شده با پروژسترون و کلسیم یونوفور با تخمک موش در محیط کشت

گروهها	2PN Total	۲۴ساعت				۴۸ساعت					۷۲ساعت					۹۶ساعت			۱۲۰ساعت		
		2PN	۲سلولی	۴سلولی	D	۲سلولی	۴سلولی	۸سلولی	M	D	۸سلولی	B	M	D	B	M	B+H	D	B	H	D
				b,c		b,c	b		b,c		b,c		c			a,b,c			b,c	b,a	
کنترل	۲۳۵ (۸۷/۷)	۳۷ (۱۵/۷)	۱۸۴ (۷۸/۳)	۰ (۰)	۱۴ (۶)	۸۳ (۳۵/۳)	۱۰۰ (۴۲/۶)	۰ (۰)	۰ (۰)	۲۰ (۸/۵)	۵۸ (۲۴/۷)	۱۲ (۳/۹)	۴ (۱/۷)	۳۰ (۱۲/۸)	۲۴ (۱۰/۲)	۱۸ (۷/۷)	۳۰ (۶/۴)	۴۷ (۲۰)	۲۴ (۱۰/۲)	۰ (۰)	۵۰ (۲۱/۳)
پروژسترون	۲۱۶ (۸۴/۴)	۲۷ (۱۲/۵)	۱۷۹ (۸۲/۹)	۰ (۰)	۱۰ (۴/۶)	۷۲ (۳۳/۳)	۱۱۰ (۵۰/۹)	۲ (۰/۹)	۰ (۰)	۱۲ (۵/۶)	۵۲ (۲۴/۱)	۱۴ (۶/۵)	۱۰ (۴/۶)	۲۰ (۹/۳)	۲۰ (۹/۳)	۳۰ (۱۳/۹)	۲۲ (۵/۱)	۳۷ (۱۷/۱)	۲۰ (۹/۳)	۱۱ (۵/۱)	۳۸ (۱۷/۶)
کلسیم یونوفور	۲۰۳ (۹۰/۲)	۳۵ (۱۷/۲)	۱۵۸ (۷۷/۸)	۵ (۲/۵)	۵ (۲/۵)	۴۶ (۲۲/۷)	۱۱۶ (۵۷/۱)	۰ (۰)	۵ (۲/۵)	۸ (۳/۹)	۸۱ (۳۹/۹)	۴ (۲)	۵ (۸/۹)	۱۸ (۹/۸)	۴۱ (۲۰/۲)	۴۸ (۲۳/۶)	۲۴ (۵/۹)	۲۸ (۱۳/۸)	۴۱ (۲۰/۲)	۸ (۳/۹)	۵۱ (۲۵/۱)

a) معنی‌دار بودن بین دو گروه کنترل و پروژسترون

b) معنی‌دار بودن بین دو گروه کنترل و کلسیم

c) معنی‌دار بودن بین دو گروه کلسیم و پروژسترون

بحث

یافته‌های این تحقیق نشان داد که با افزودن پروژسترون (۱۰μg/ml) به محیط حاوی اسپرم افزایش تحرک اسپرماتوزوآ را به دنبال دارد، که این افزایش در درجه‌بندی تحرک اسپرم‌ها مشاهده می‌شود، به این معنی که درجه حرکتی SH کمتر از این میزان درگروه کنترل بوده و درجه حرکتی ۳ که شامل حرکت پیشرونده به جلو است؛ بیشتر از گروه کنترل بوده است. نتایج این تحقیق در گروه پروژسترون با نتایج مطالعات توماس (thomos) و میزل (Meizel) (۱۹۸۸) و بالدی (Baldi) و همکاران (۱۹۹۱) و همچنین با نتایج بلک‌مور (Blackmore) و همکاران (۱۹۹۰) همسو بود. Blackmore و همکاران نیز غلظت ۱۰μg/ml پروژسترون را یک آستانه مناسب جهت پاسخگویی در افزایش کلسیم داخل سلولی دانسته که شروع اولیه واکنش آکروزومی را سبب می‌شود[۱۸، ۱۹ و ۲۰].

پروژسترون بر عملکرد اسپرم (تحرک، ظرفیت یابی و واکنش آکروزومی) تأثیر گذاشته و می‌تواند آغازگر واکنش آکروزومی در محیط آزمایشگاه باشد. مطالعاتی در زمینه تأثیر پروژسترون و استروئیدها در افزایش کلسیم داخل سلولی به‌دنبال اتصال پروژسترون به غشای اسپرم صورت گرفته است [۳،۴،۱۸و۱۹].

پروژسترون به عنوان یکی از محرکهای فیزیولوژیکی روی واکنش آکروزومی اسپرم انسان تأثیر گذاشته که این در محل وقوع (کومولوس افوروس) وجود دارد. افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی در اسپرماتوزوآ به‌وسیله تعدادی از محققین و آزمایشگاهها گزارش شده و همچنین تأثیر استروئید در خروج یون کلراید، تحریک فعالیت فسفولیپاز و همچنین فسفوریلاسیون پروتئینی مورد بررسی قرار گرفته است [۲،۳و۲۱]. اتصال پروژسترون به گیرنده خود باعث فعال شدن چندین مولکول که شامل پروتئین، فسفولیپاز A (PLA) و فسفولیپاز C (PLC) می‌شود[۲۳].

براساس یافته‌های Blakmore و همکاران واکنش آکروزومی در تمام موارد باعث القای انتقال کلسیم به داخل سلول می‌شود که آنها گزارش نمودند که پروژسترون به علت القای شکل‌گیری میکرودومین‌های افقی در سطح خارجی غشای اسپرم می‌شود که نشان می‌دهد پیشرونده و غیروابسته به تغییرات دینامیک مولکولی است[۲۰].

همچنین پیتروبن (Pietrobon) (۲۰۰۳) گزارش نمود که پروژسترون فقط روی اسپرمهایی که از ناحیه اپیدیدیم گرفته شده مؤثر است زیرا اسپرم حین عبور از این ناحیه است که گیرنده پروژسترون روی آن شکل می‌گیرد[۲۴].

از آنجا که پروژسترون باعث افزایش جریان کلسیم در داخل سلول می‌شود برخی از محققین افزودن مستقیم کلسیم را به محیط کشت توصیه می‌کنند[۲۵و۲۶].

به‌کارگیری کلسیم یونوفور (۱۰μg/ml) در این مطالعه سبب افزایش تحرک اسپرم موش با کیفیت Grid 3 شد، اما این افزایش در مقایسه با گروههای دیگر معنی‌دار نبود. به‌کارگیری کلسیم یونوفور در محیط حاوی اسپرم انسانی نیز سبب افزایش تحرک اسپرمها شده است و به عنوان آغازگر واکنش آکروزومی نیز گزارش شده است و نتایج این مطالعه با مطالعه راسل (Russell) و همکاران (۱۹۷۹) همسو بود[۲۶].

پارامتر دیگر مورد ارزیابی در این تحقیق بررسی اشکال غیرطبیعی اسپرم‌ها بود که میانگین درصد اسپرمهای غیرطبیعی در ۳ گروه آزمایشی تفاوت معنی‌دار نشان نداد ولی میزان موارد غیرطبیعی در ناحیه سر در دو گروه کلسیم و پروژسترون بیشتر از گروه کنترل و در ناحیه دم در گروه کلسیم کمتر از گروه پروژسترون و کنترل مشاهده شد. تغییر شکل ظاهری اسپرم احتمالاً به‌دلیل آسیب اسکلت سلولی است که آن در شکل دادن به سلول نقش اصلی را دارا است و بررسی دقیق‌تر و مطالعه بیشتر در این زمینه برای پاسخ به سئوالات موردنیاز است [۲۷].

انکوبه کردن اسپرم با پروژسترون و کلسیم یونوفور سبب افزایش فعالیت اسپرم می‌شود که این افزایش فعالیت نقش مهمی را در حصول به لقاح دارا است. همچنین انکوبه شدن باعث تغییراتی در غشای اسپرم شده که در نتیجه سبب ظرفیت پذیری آن می‌شود [۲۷].

پارامترهای دیگر مورد ارزیابی در این تحقیق میزان لقاح و تکوین جنین‌ها در گروههای مورد آزمایش بود که مقایسه این نتایج نشان داد که میزان لقاح و تکوین در گروه کلسیم یونوفور نسبت به دو گروه دیگر وضعیت مطلوب داشت، به‌طوری که

میزان تکوین جنین‌ها و سرعت آن در گروه کلسیم یونوفور بیش از دو گروه دیگر بود که نتایج این تحقیق با نتایج راسل (Russell) و همکاران (۱۹۷۹) که از کلسیم یونوفور جهت فعال سازی اسپرم انسان استفاده نموده بودند همسو بود[۲۶].

همچنین دیده شده است که پروژسترون افزوده شده به محیط، ضمن افزایش تحرک اسپرم، میزان لقاح را بهبود می‌بخشد که نتایج این تحقیق، یافته‌های محققین قبل را تأیید می‌نمود[۱۵، ۲۶، ۲۷ و ۲۸].

در مجموع وضعیت اسپرم از نظر تحرک و شکل در تیمار پروژسترونی بهتر از تیمار کلسیم یونوفوری و کنترل بود ولی لقاح و تکوین جنین‌های حاصل از اسپرمهای تیمار شده با کلسیم یونوفور بهتر از نتایج گروههای پروژسترون و کنترل بود که احتمالاً با توجه به یکسان بودن روند کار، کلسیم یونوفور ظرفیت‌یابی اسپرم را سریع‌تر و در نتیجه شکل‌گیری پیش هسته نر را تسریع می‌نماید و برای پاسخ گویی دقیق‌تر نیاز به بررسی بیشتر است.

References

1. **Yanagimachi R.** Mammalian fertilization in: The rhysiology of reproduction. Knobil E, Neill; New York. Raven, 1994, pp 189-317.
2. **Kumar S, Ying RK, Hong P.** Potassium increases intracellular calcium simulating progesterone Action in human sperm. Arch Andro 2000; 44; 93-101.
3. **Zaneveld LJD, Dejong CJ, Anderson RA, Mack SR.** Human Sperm capacitation and the acrosome reaction. Hum. Reprod 1991; 6: 1262-74.
4. **Arnoult C, Zeng Y, Florman HM.** ZP3 - dependent activation of sperm action channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. J Cell Biol 1996; 134: 637-45.
5. **Blackmore P, Beebe S, Danforth D, Alexander N.** Progesterone and 17a-hydroxy progesterone, novel stimulators of calcium influx in human sperm. J Biol Chem 1990; 265: 1376-80.
6. **Stock CE, Fraser LR.** Divalentcations, capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa. J Reprod Fertil 1989; 463-70.
7. **Dasgupta S, Mills CL, Fraser LR.** Ca^{2+} - related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. J Reprod Fertil 1993; 99: 135-45.
8. **Mortimer D, Chorney MJ, Curtis EF, Trounson AO.** Calcium dependence of human sperm fertilizing ability. J Exp Zool 1988; 246: 194-201.
9. **Fraser LR.** Minimum and maximum extracellular Ca^{2+} requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. J Reprod Fertil 1987; 81: 77-89.
10. **Suarez SS, Katz DF, Owen DH.** Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. Biol Reprod 1991; 44: 375-81.
11. **Pacey AA, Davies N, Warren MA.** Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. Hum Reprod 1995; 10: 2603-9.
12. **Wassarman PM.** Profile of mammalian sperm receptor. Development 1990; 108: 1-17.
13. **Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S.** Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. Biochem Biophsy Res Coummun 1989; 160: 828-33.
14. **Kirkman-Brown JC, Punt EL, Barratt CLR, Publicover SJ.** Zona pellucida and progesterone - induced Ca^{2+} signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. J Androl 2002; 23(3): 306-15.
15. **Ripps BA, Zhu YP, Kim HN, Buster JE, Carson SA, Minhas BS.** Progesterone treatment stimulates human spermatozoal platelet activating factor. American fertility society conjoninty with the canadian fertility and androlgoy society, montreal, Canada, October 11-14, 1993; Abstract 0159.
16. **Baldi E, Krausz C, Forti G.** Nongenomic actions of progesterone on human spermatozoa. Trends Endocrinol Metab 1995; 6: 198-205.
17. **Aitken RJ.** The extragenomc action of progesterone on human spermaozoa. Hum Reprod 1997; 12: 38-42.
18. **Thomas P, Meizel S.** An influx of extracellular calcium is required fo rinitiation of the human sperm acrosome reaction induced by human follicular fluid. gamet Res 1998; 20(4): 397-411.
19. **Baldi E, Casaho R, Costanza F, Krausz C, Maggi M, Forti G.** Interacellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. J Androl 1991; 12: 323-30.

20. **Blackmore PE, Beebe SJ, Dan Forth DR, Alexander N.** Progesterone and 17a-hydroxyprogesterone: novel stimulators of calcium influx in human sperm. J Biol Chem 1990; 263: 1376-80

21. **Aanesen A, Fried G, Andersson E, Gottlieb C.** Progesterone stimulates GABA uptake in human spermatozoa. Biochem Biophys Res Commun. 1996; 226(1): 88-93.

22. **Shoeb M, Laloraya M, G.Kumar P.** Formation and dynamic alternations of horizontal microdomains in sperm membranes during progesterone- induced acrosome reaction. Biochem Biophys Reas Commun 2004; 315: 763-70.

23. **Pietrobon EO, Soria M, Dominguez LA, Monclus Mde L, Fornes MW.** Stimultaneous activation of PLA2 and PLC re required to promote acrosomal reaction stimulated by progestrone via G-proteins. Mol Rerpod Dev 2005; 70(1): 58-63.

24. **Pietrobon EO, Monclus Mde L, Alberdi AJ, Fornes MW.** Progestrone receptore availability in mouse spermatozoa during epididymal transit and capacitation: ligand blot detection of progestrone-blinding protein. J Androl 2003; 24(4): 612-20.

25. **Barg PE, Wahrman MZ, Talansky BE, Gordon JW.** Capacitated, acrosome reactedbut immotile sperm, when microinjection under the mouse zona pellucida, will not fertilize the oocytes. J Exp Zool 1986; 237(3): 365-74.

26. **Russell L, Peterson RN, Freund M.** Morphologic characteristics of the chemically induced scrosome reaction in human spermatozoa. Fertil Steril J 1979; 32(1): 87-92.

۲۷. **رشیدی الف.** ارزیابی توانایی پنتوکسی فیلین و پروژسترون برای افزایش میزان تحرک و قدرت باروری اسپرم موش پس از نگهداری در دمای ۴ درجه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، علوم تشریح، تابستان ۱۳۸۳.

28. **Khollute SK, Rodriquez J, Dukelow WR.** In vitro fertilizatin and the effect of progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone on aorosome reaction of mouse epdidymal spermatozoa. Int J Androl 1995; 18(3): 146-50.