

تأثیر دوزهای مختلف پروژسترون بر پارامترهای حرکتی اسپرم موش پس از بیش فعال شدن

مجید کاتبی Ph.D.*، منصوره موحدین Ph.D.**، میرعباس عبدالوهابی M.D.***، محمد اکبری Ph.D.****

فرید ابوالحسنی Ph.D.***، علیقلی سبحانی Ph.D.*****

* دکترای علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی تهران

** استادیار گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

*** استادیار گروه علوم تشریح دانشگاه تهران

**** استاد گروه علوم تشریح دانشگاه تهران

***** دانشیار گروه علوم تشریح دانشگاه تهران

تاریخ وصول: فروردین ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۸۳

چکیده

هدف: هدف این پژوهش عبارت است از بررسی الگوی حرکتی و تغییراتی که در پارامترهای حرکتی اسپرم موش پس از بیش فعال شدن با پروژسترون پیش می آید.

مواد و روشها: اسپرم از ناحیهٔ دمی اپیدیدیم موش بالغ نژاد ICR به دست آمد و دوزهای مختلف پروژسترون (۱، ۱۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$) به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ و ۹۰ دقیقه انکوباسیون صورت گرفت. سپس از حرکات اسپرمها فیلمبرداری شد. به این منظور برای هر گروه، یک ثانیه از الگوی حرکتی محل تلاقی سر با گردن هر اسپرم آنالیز شده و ۷ پارامتر حرکتی شامل درصد تحرک، VCL (Curvilinear Velocity)، VSL (Straight-line Velocity)، VAP (Average Path Velocity)، LIN (Linearity)، PRC (Curvilinear Progressive ratio)، STR (Straightness) مورد مطالعه قرار گرفته و توسط برنامه Computer assisted image analysis تجزیه و تحلیل شد. اطلاعات به دست آمده از همهٔ گروهها با آزمون آنوا (ANOVA) و توکی (TUKEY) مورد مقایسه آماری قرار گرفت.

یافته ها: میزان درصد تحرک همهٔ گروههای آزمون پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون به صورت معنی داری بیش از گروه کنترل بود. پارامترهای حرکتی در گروههایی که پروژسترون با دوز بالا به آنها افزوده شد (۱۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$) حاکی از فعال شدن در طی همان ۱۰ دقیقه اول انکوباسیون بود اما با دوز پایین (۱ $\mu\text{g/ml}$) فعال شدن اسپرم پس از گذشت ۹۰ دقیقه روی داد و از این نظر شبیه گروه کنترل بود. نتایج نشان دهنده آن بود که دوز پایین پروژسترون قادر به بیش فعال کردن اسپرم نیست.

نتیجه گیری: در مجموع نتایج نشان داد که پروژسترون توانایی بیش فعال کردن اسپرم موش را دارد و افزودن پروژسترون با دوز بالا طی زمان کوتاهی باعث بیش فعالی اسپرم شده و با گذشت زمان کاهش میزان درصد تحرک مشاهده می شود.

کلید واژه ها: پروژسترون، بیش فعال شدن، اسپرم، موش

مقدمه

متابولیسمی و ساختاری چندی در آن روی می دهد تا اسپرم توانایی باروری تخمک را پیدا کند. به مجموعهٔ این حوادث

با رها شدن اسپرماتوزرآ در سیستم تناسلی مونث تغییرات
آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح،
صندوق پستی ۳۳۱-۱۴۱۱۵ Email: movahedm@hotmail.com

فیزیولوژیکی محسوب می‌شود [۱۱ و ۱۰] تأثیرات پروژسترون از طریق سه مسیر سیگنال دهنده اعمال می‌شود: الف) افزایش سریع یون کلسیم داخل سلولی، ب) جریان یون کلسیم، ج) تحریک نفوذ لیپازها و فسفریلاسیون پروتئین‌های اسپرم [۱۱]. این پژوهش با هدف تجزیه و تحلیل الگوی حرکتی اسپرم موش پس از فعال شدن با پروژسترون انجام شد که به این منظور از نرم‌افزار Computer - assisted image analysis استفاده شد. تغییرات قابل اندازه‌گیری در پارامترهای حرکتی به‌عنوان شاخص‌های تأثیرات پروژسترون مطالعه شد تا مشخص شود که کدام دوز پروژسترون قادر به افزایش شدت و کاهش حرکت پیش‌رونده در اسپرم موش است.

مواد و روشها

آماده‌سازی اسپرم

موش نر بالغ ICR با سن (۱۲-۱۰ هفته) تهیه و پس از کشته شدن به روش در رفتگی گردن، دم اپیدیدیم آنها خارج شد و در ظرف محتوی سرم فیزیولوژیک قرار گرفت. پس از چند بار شستشو در سرم، لوله‌های انتهایی توسط یک سوزن ۲۷G در سه تا پنج نقطه سوراخ و با یک پنس فشار داده شد تا اسپرم لوله‌ها وارد پتری‌دیش محتوی ۵ml محیط کشت mWM شود به محیط کشت ۳mg/ml از BSA^۱ (fatty acid free fraction V, USigma)، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین و ۱mg/ml / ۰ استرپتوماسین اضافه شده و قبل از استفاده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم شده بود. به منظور خارج شدن اسپرم‌ها از اپیدیدیم، پتری‌دیش در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ قرار داده شد.

افزودن پروژسترون به اسپرم

پروژسترون (Sigma) با غلظت ۱mg/ml در الکل مطلق حل شده و سپس توسط محیط کشت، رقت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ μg/ml از آن به دست آمده و به اسپرم اضافه و به مدت ۱۰ و ۹۰ دقیقه در انکوباتور CO₂ دار کشت داده شد.

ظرفیت‌پذیری اسپرم گفته می‌شود و شامل مجموعه اطلاعات عملکردی و بیوشیمیایی است که در سلول‌های اسپرم رخ می‌دهد که در نهایت اسپرم قادر به انجام واکنش آکروزومی و بیش‌فعالیت (Hyperactivation) می‌شود. غلظت‌های پایین یون کلسیم برای ظرفیت‌پذیری اسپرم موش ضروری است [۱].

به‌نظر می‌رسد که در مورد اسپرم انسان نیز یون کلسیم برای ظرفیت‌پذیری ضروری است [۳ و ۲] و گزارشهایی نیز مبنی بر لزوم حضور یون کلسیم برای اکتساب قدرت باروری اسپرم انسان در دست است [۴]. حرکت بیش‌فعال نوعی از حرکت شدید غیر خطی است که اسپرم پستانداران هم‌زمان با پیشروی در سیستم تناسلی جنس مؤنث از خودشان نشان می‌دهند (شکل ۱) [۵]. طی فرآیند بیش‌فعال شدن، الگو و شدت مسیر حرکتی اسپرم به میزان زیادی تغییر می‌کند که کاملاً دارای مسیر تصادفی است و منجر به حرکت دورانی پیش‌رونده می‌شود. این تغییرات در شکل حرکت، شبیه حرکت شلاق (whiplash) یا شکل ۸ لاتین (۸) است (شکل ۱). بیش‌فعال شدن برای عبور از لوله رحمی و نفوذ در قشر شفاف (زونا پلوسیدا) ضروری است [۷ و ۸]. واکنش آکروزومی اسپرم که با خارج شدن وزیکل‌های آکروزومی از اسپرم مشخص می‌شود، برای اتصال ما بین اسپرم با غشای تخمک هنگام باروری، ضروری است. قشر شفاف در پستانداران به صورت یک آغازگر فیزیولوژیکی برای واکنش آکروزومی هنگام لقاح محسوب شده و ZP3 که یکی از عمده‌ترین گلیکوپروتئین‌های قشر شفاف است می‌تواند در محیط کشت، واکنش آکروزومی را با ماهیت وابسته به گونه تحریک نماید [۵ و ۹] به‌نظر می‌رسد که محیط کشت اسپرم دارای نقش مهمی در بسیاری از فعالیت‌های آن است. انجام واکنش آکروزومی نیاز به افزایش غلظت یون کلسیم داخل سلولی دارد [۵] و با تماس اسپرماتوزوآ با زونا پلاسیدای تخمک شروع شده و در ادامه چسبندگی غشای خارجی آکروزم با غشای تخمک پیش آمده و در نهایت آنزیم‌های آکروزومی آزاد می‌شود تا به اسپرم برای نفوذ به داخل تخمک کمک کند. از میان مواد مختلفی که به واکنش آکروزومی کمک می‌کنند، می‌توان از پروژسترون نام برد که یک تحریک‌کننده

1. Bovine Serum Albumin

آماده ساختن نمونه‌ها

۱۴ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم برای آنالیز الگوی حرکتی آن پس از ۱۰ و ۹۰ دقیقه انکوباسیون استفاده شد. به این منظور توسط محیط کشت غلظت نهایی حدود 2×10^6 /ml به دست آمد و سوسپانسیون حاصل روی یک لام شیشه‌ای که قبلاً در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم شده بود، قرار گرفت و روی آن با لامل پوشیده شد.

روی هر لام با ۵PVP/۰ درصد پوشیده شده بود تا چسبیدن اسپرم به سطح شیشه به حداقل ممکن برسد. به محض اینکه نمونه آماده شد، عکسبرداری برای آنالیز انجام شد.

طراحی آزمایش

گروههای مورد آزمایش به شرح زیر بودند:

- ۱- کنترل (بدون پروژسترون)
 - ۲- آزمون یک با غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ از پروژسترون
 - ۳- آزمون دو با غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ از پروژسترون
 - ۴- آزمون سه با غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ از پروژسترون
- کلیه گروهها پس از گذشت ۱۰ و ۹۰ انکوباسیون مورد مطالعه قرار می‌گیرند.

تجزیه و تحلیل الگوی حرکتی اسپرم

به منظور تجزیه و تحلیل الگوی حرکتی اسپرم، تصاویر با سرعت ۳۰ فریم در ثانیه توسط دوربین (PHOTRON, Tokyo) (FASTCAM-Net high-Speed) گرفته شد و توسط موی رولر (PHOTRON, Tokyo) (Movie Ruler) ضبط شد. به منظور آنالیز از ۳۰ فریم مناسب استفاده شد. زمان نوردهی $1/200$ ثانیه بوده و دوربین روی میکروسکوپ فاز کنتراست (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) سوار شده بود. اسپرمهای غیر متحرک یا آنهایی که دارای حرکت پیشرونده نبودند از مطالعه حذف شدند. پارامترهای حرکت اسپرم که در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفتند به شرح زیر بودند:

- ۱- میان نقطه ابتدایی و انتهایی حرکت است. (Straight-line Velocity) VSI
- ۲- (Curvilinear Velocity) VCI که عبارت از فاصله مابین دو

نقطه مجاور حرکت است.

۳- VAP (Average Path Velocity) - که شامل یک خط مستقیم از میانگین فاصله پنج نقطه طی شده است (شکل ۲).

۴- LIN (Linearity) - که عبارت از شاخصی برای مستقیم کردن مسیر حرکتی است. برای به دست آوردن LIN نسبت VSL/VCL بر ۱۰۰ تقسیم می‌شود.

۵- STR (Straightness) - که شاخص خروج اسپرم از خط مستقیم است و برای به دست آوردن آن نسبت VSL/VAP در ۱۰۰ ضرب می‌شود [۱۲].

۶- PRC (Curvilinear Progressive ratio) - که شاخص عکس جابه‌جایی طرفی سر اسپرم است و از حاصل ضرب نسبت VAP/VCL در عدد ۱۰۰ به دست می‌آید [۱۳].

به‌منظور به دست آوردن درصد تحرک از فیلم به دست آمده از حرکت اسپرمها استفاده شد. به این ترتیب که تعداد کل اسپرم در یک میدان ثابت از فیلم شمارش و سپس با شروع فیلم، اسپرمهایی که در جایگاه خود باقی ماندند به‌عنوان غیر متحرک یا غیر پیش‌رونده شمارش شدند.

اطلاعات به دست آمده توسط آنالیز واریانس و آزمون پست هاک (Post hoc) (TUKEY) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

تغییرات حاصل در درصد تحرک و الگوی حرکتی اسپرم پس از افزودن پروژسترون با دوزهای مختلف و انکوباسیون به مدت ۱۰ و ۹۰ دقیقه مورد مطالعه قرار گرفت. از نظر میزان درصد تحرک، تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروههای آزمون پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون مشاهده نشد اما پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($p < 0.05$). میزان درصد تحرک در گروههای آزمون پس از ۹۰ دقیقه نگهداری در انکوباتور کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$) (شکل ۳- a)، در گروههای آزمون ۲ و ۳ بعد از گذشت ۱۰ دقیقه انکوباسیون الگوی حرکتی تغییر کرده و میزان جابه‌جایی طرفی زیاد شده و اسپرمها بیشتر مسیر دورانی را دنبال می‌کردند. همین وضعیت در گروههای کنترل و آزمون یک پس از گذشت ۹۰

دقیقه انکوباسیون مشاهده شد.

پارامترهای مورد اندازه گیری VSL, VAP, LIN, PRC, STR و VCL در طول زمان در کلیه گروهها تغییراتی از خود نشان داد که این افزایش در گروههای کنترل و آزمون یک پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون اتفاق افتاد که نتایج نشان دهنده آن بود که بیش فعال شدن در گروههای آزمون دو و سه در همان ۱۰ دقیقه انکوباسیون روی داده و پس از آن کاهش پیدا کرد، اما در گروههای کنترل و آزمون ۱، بیش فعال شدن با تأخیر پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون مشاهده شد (شکل ۳-ب). همان طور که انتظار می رفت، شاخص VSL که عبارت از فاصله بین اولین و آخرین نقطه حرکتی است، در همه گروهها پس از ۹۰ دقیقه کاهش نشان داد، اما این پارامتر در گروه آزمون یک افزایش داشت ولی معنی دار نبود (شکل ۳-ج). VAP که عبارت از میانگین مسیر مستقیم مابین پنج نقطه در الگوی حرکتی بود هم در گروه آزمون یک پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون افزایش نشان داد و این میزان با گروههای آزمون دو و سه در همین زمان دارای تفاوت معنی دار بود (شکل ۳-د).

LIN به عنوان شاخص مستقیم بودن مسیر در گروه کنترل و آزمون یک با افزایش زمان انکوباسیون کاهش یافت که نمایانگر وابسته به زمان بودن افزایش جابه جایی طرفی سر یا کاهش شعاع حرکت دورانی است.

در گروههای آزمون دو و سه بیش فعالی در طی همان ده دقیقه اول انکوباسیون رخ داد بنابراین این شاخص با افزایش زمان انکوباسیون (۹۰ دقیقه) افزایش پیدا کرد (شکل ۳-ج). PRC که شاخص عکس جابه جایی طرفی سر اسپرم است در گروههای آزمون دو و سه با افزایش زمان انکوباسیون، افزایش یافت (شکل ۳-ف). STR که شاخص خروج اسپرم از خط مستقیم است در گروه آزمون ۳ پس از گذشت ۱۰ دقیقه انکوباسیون، افزایش یافت و از این نظر با گروه شاهد تفاوت معنی داری داشت.

بحث

یافته های این پژوهش نشان داد که افزودن پروژسترون به محیط کشت اسپرم موش باعث بیش فعال شدن آن می شود.

بیش فعال شدن نیز ارتباط تنگاتنگ با ظرفیت پذیری دارد [۱۴]. اسپرم پستانداران دارای ویژگیهای خاصی در الگوی حرکتی است که با تکمیل ظرفیت پذیری همراه است. حرکت شلاقی یا بیش فعال شده اسپرم با ضربات شدید دم آن مشخص می شود [۱۵].

بیش فعال شدن هم برای عبور از لوله رحمی و هم نفوذ در قشر شفاف ضروری است [۱۶].

اگر چه مکانیسمهای مولکولی که در ظرفیت پذیری اسپرم دخیل هستند، هنوز به طور کامل شناخته نشده است، اما ثابت شده که افزایش فسفوریلاسیون پروتئین تیناز لازمه این پروسه است. ظرفیت پذیری در موش وابسته به یون کلسیم است [۱۷] و فسفوریلاسیون پروتئین تیناز هم یک واقعه داخل سلولی است که تنظیم عملکرد اسپرم را بر عهده داشته و شاخص مهمی برای ظرفیت پذیری محسوب می شود [۱۸ و ۱۹]. طی پروسه ظرفیت پذیری اسپرم موش به دست آمده از دم اپیدیدیم در محیط کشت، افزایش فسفوریلاسیون پروتئین تیناز در طول زمان حاصل می شد [۱۸]. مطالعات زیادی در زمینه بیش فعالی اسپرم صورت گرفته است [۱۲، ۲۰ و ۲۱] آثار پروژسترون بر یون کلسیم اسپرم ابتدا به صورت افزایش فوری یون پس از افزودن استروئید فوق به اسپرم (طی تنها چند ثانیه) روی داده و سپس به مرحله ثبات (فاز پلاتو) می رسد که ممکن است چند دقیقه طول بکشد [۲۲ و ۲۳]. علاوه بر افزایش یون کلسیم، پروژسترون جریان کلر و سدیم را هم تحریک می کند [۲۴، ۲۵ و ۲۶].

اسپرم موش در پاسخ به پروژسترون یک افزایش موقتی یون کلسیم (۱ تا ۱/۵ دقیقه) یا افزایش طولانی مدت به مدت چندین دقیقه را از خود نشان می دهد [۲۷]. البته باید در نظر داشت که غلظت پروژسترون در مایع فولیکولی حداقل پنج برابر بیشتر از پروژسترون آزاد است زیرا گلوبولین باند شده به کورتیکواستروئید که در مایع فولیکولی موجود است می تواند باعث افزایش فعالیت تحریک کنندگی واکنش آکروزومی پروژسترون شود [۲۸].

سه دوز مورد استفاده در پژوهش حاضر به اشکال مختلفی باعث بیش فعالی اسپرم شدند.

تفاوت مشاهده شده ما بین نتایج حاصل از پژوهش حاضر و تحقیق کوباری (Kobori) و همکارانش [۲۷] می‌تواند به دلیل برگشت وضعیت بیش فعالی اسپرم موش باشد [۳۲] و ممکن است الگوی بیش فعالی مجدداً پس از گذشت زمان طولانی‌تری ظاهر شود. با روشهای استاندارد نظیر آنچه در این تحقیق ارایه شد، می‌توان به توصیف دقیق از روند بیش فعالی در اسپرم پرداخت. خوکت (Kholkute) و همکارانش [۲۹] نشان دادند که پروژسترون دارای اثر مستقیم بر باروری و واکنش آکروزومی اسپرم موش داشته است. کاتایاما (Katayama) و همکارانش [۴۱] نیز در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که افزودن پروژسترون به محیط کشت اسپرم گراز باعث افزایش واکنش آکروزومی می‌شود. بدون آنکه به قابلیت‌های دیگر آن از جمله فعال کردن تخمک و یا قابلیت باروری آن پس از ICSI آسیبی برساند.

در مجموع نتایج حاصل نشان‌دهنده آن بود که افزودن پروژسترون با دوز بالا به محیط کشت اسپرم باعث بیش فعالی در زمان کوتاهی پس از تجویز می‌شود و مطالعه پارامترهای الگوی حرکتی می‌تواند به صورت دقیق بیش فعالی را نشان دهد. اما در عین حال ضروری است که ارتباط ما بین الگوی بیش فعالی اسپرم پس از افزودن پروژسترون به آن و خاصیت باروری اسپرم با انجام ICSI, IVF مورد ارزیابی قرار گیرد تا بتوان قضاوت درستی در مورد الگوی بیش فعالی به‌عنوان یک مدل مناسب برای انجام اسپرم با کیفیت بالا داشت.

همانند محققین دیگر [۲۹] استفاده از دوز بالا باعث شد که بیش فعالی بلافاصله پس از افزودن پروژسترون به اسپرم حاصل شود. اگر چه کوباری (Kobori) و همکارانش [۲۷] به این نتیجه رسیدند که برای حصول بیش فعالی در طول زمان نیاز به دوز بالای پروژسترون است و اگر زمان انکوباسیون بین ۲ تا ۴ ساعت باشد، پاسخ بیش فعالی در زمان طولانی‌تری اتفاق می‌افتد. نتایج پژوهش حاضر دلالت بر آن دارد که با افزایش زمان انکوباسیون، اسپرم الگوی بیش فعال شدن خود را از دست می‌دهد که با اندازه‌گیری پارامترهای حرکتی شد [۳۰]. علت می‌تواند تفاوت نوع مطالعه حاضر با مطالعه کوباری (Kobori) و همکارانش [۲۷] باشد زیرا ایشان به مطالعه ویژگیهای یون کلسیم داخل سلول پرداختند در حالی که در مطالعه حاضر به بررسی پارامترهای حرکتی پرداخته شد. آگاروال (Agarwal) و همکارانش [۳۱] به این نتیجه رسیدند که پارامترهایی مانند VSL, VCL, LIN, ALH شاخص‌های کیفی اسپرم و مایع منی هستند و بررسی آنها می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد کیفیت مایع منی در کلینیک ارائه کند.

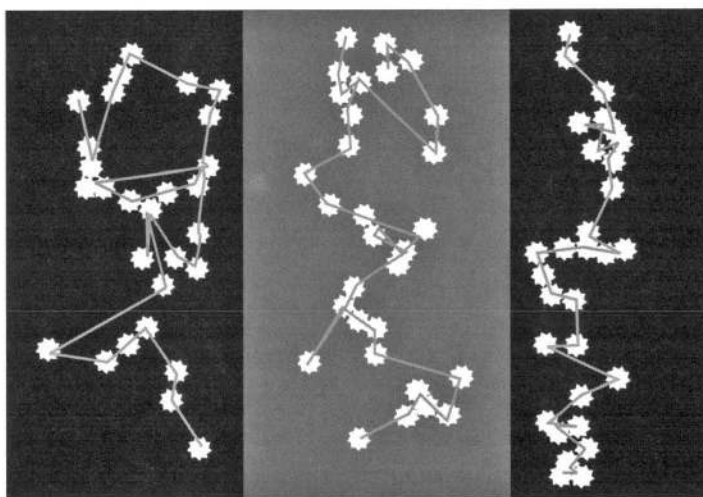
سوارز (Suarez) [۳۲] الگوی بیش فعال شدن را به صورت زیر توصیف کرد: انتقال حرکت از مدل پیش رونده به مدل شلاقی به این صورت که مسیر حرکتی اسپرم حالت دورانی پیدا می‌کند و این دایره‌ها مرتباً کوچک‌تر می‌شود. در همین زمان شدت حرکت هم افزایش پیدا می‌کند. احتمال انتقال الگوی حرکتی ما بین وضعیت موقتی و حرکت شلاقی هم وجود دارد.

References

- Fraser LR. Minimum and maximum extracellular Ca^{2+} requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 77-89.
- Stock CE, Fraser LR. Divalent cations, capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1989; 87: 463-47.
- 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: 135-43.
- Mortimer D, Chorney MJ, Curtis EF, Trounson AO. Calcium dependence of human sperm fertilizing ability. *J Exp Zool* 1988; 246: 194-201.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD(eds.), *Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press, 1994, pp. 189-317.
- Katz DF, Yanagimachi R. Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida. *Biol Reprod* 1981; 25: 789-91.
- Suarez SS, Katz DF, Owen DH. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* 1991; 44: 375-81.
- 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.

9. Wassarman PM. Profile of mammalian sperm receptor. *Development* 1990; 108: 1-17.
10. Baldi E, Krausz C, Forti G. Nongenomic actions of progesterone on human spermatozoa. *Trends Endocrinol Metab* 1995; 6: 198-205.
11. Aitken RJ. The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997; 12: 38-42.
12. Cancel MA, Lobdell D, Mendola P, Perreault DS. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer assisted sperm analysis. *Hum Reprod* 2000; 15: 1322-8.
13. Neill JM, Olds-Clarke P. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamet Res* 1987; 18(2): 121-40.
14. Mahony MC, Gwathmey T. Protein Tyrosine Phosphorylation during Hyperactivated Motility of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Spermatozoa. *Biol Reprod* 1999; 60: 1239-43.
15. Yanagimachi R. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J Repord Fertil* 1969; 18: 275-86.
16. Katz DF, Yanagimachi R. Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida. *Biol Reprod* 1981; 25: 789-91.
17. Senuma M, Yamano S, Nakagawa K, Irahara M, Kamada M, Aono T. Progesterone accelerates the onset of capacitation in mouse sperm via T-type calcium channels. *Arch Androl* 2001; 47(2): 127-34.
18. Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa: 1. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995; 121: 1129-37.
19. Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, Van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 1995; 108: 2017-25.
20. Huo LJ, Yang ZM. Effects of platelet activating factor on capacitation and acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2000; 56(3): 436-410.
21. Kinukawa M, Nagata M, Aoki A. Changes in flagellar bending during the course of hyperactivation in hamster spermatozoa. *Reproduction* 2003; 125: 43-51.
22. Thomas P, Meizel S. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca^{2+} influx. *Biochem J* 1989; 264: 539-46.
23. Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl* 1991; 12: 323-30.
24. Turner KO, Meizel S. Progesterone-mediated efflux of cytosolic chloride during the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213: 774-80.
25. Meizel S, Turner KO. Chloride efflux during the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction is inhibited by lavendustin A, a tyrosine kinase inhibitor. *J Androl* 1996; 27: 327-30.
26. Foresta C, Rossato M, Di Virgilio F. Ion fluxes through the progesterone-activated channel of the sperm plasma membrane. *Biochem J* 1993; 294: 279-83.
27. Kobori H, Miyazaki S, Kuwabarab Y. Characterization of Intracellular Ca^{2+} Increase in Response to Progesterone and Cyclic Nucleotides in Mouse Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 2000; 63: 113-20.
28. Miska W, Fehl P, Henkel R. Biochemical and immunological characterization of the acrosome reaction-inducing substance of HFF. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 125-29.
29. Kholkute SD, Rodriquez J, Dukelow WR. In vitro fertilization and the effect of progesterone and 17-hydroxyprogesterone on acrosome reaction of mouse epididymal spermatozoa. *Int And* 1995; 18: 146-50.
30. Naser A, Mahony M. Blackmore Progesterone Increase of intracellular calcium is not a cause of pentoxifylline-induced hyperactivated motility or acrosome reaction in human sperm. *Fertil Steril* 1998; 69(4): 748-54.
31. Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. *J Androl* 2003; 24(3): 343-52.
32. Suarez SS. Hyperactivated motility in sperm. *J Androl* 1996; 17: 331-5.
33. Wang C, Lee GS, Leung A, et al. Human sperm hyperactivation and acrosome reaction and their

- relationships to human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1993; 59: 1221-7.
34. Johnston RC, Mbizvo MT, Summerbell D. Relationships between stimulated hyperactivated motility of human spermatozoa and pregnancy rate in donor insemination: a preliminary report. *Hum Reprod* 1994; 9: 1684-7.
35. Tesarik J, Mendoza C. Defective function of a nongenomic progesterone receptor as a sole sperm anomaly in infertile patients. *Fertil Steril* 1992; 58: 793-7.
36. Oehninger S, Blackmore PF, Morshedi M, Sueldo C, Acosta A, Alexander NJ. Defective calcium influx and acrosome reaction (spontaneous and progesterone-induced) in spermatozoa of infertile men with severe teratozoospermias. *Fertil Steril* 1994; 61: 349-54.
37. Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Updata* 1997; 3: 403-39.
38. Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160: 828-33.
39. Thomas P, Meizel S. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca^{2+} influx. *Biochem J* 1989; 264: 539-46.
40. Morales P, Llanos L, Gutierrez G, Kohen P, Vigil P, Vantman D. The acrosome reaction-inducing activity of individual hFF samples is highly variable and is related to steroid content. *Hum Reprod* 1992; 7:646-51.
41. Katayama M, Miyano T, Miyake M, Kato S. Progesterone treatment of boar spermatozoa improves male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection into porcine oocytes. *Zygote* 2002; 10: 95-104.



شکل ۱. الگوی حرکتی اسپرم موش طی ظرفیت‌پذیری. در طرف چپ اسپرم ظرفیت‌پذیری نشده و در وسط، اسپرم حد میانی و در طرف راست اسپرم بیش فعال شده دیده می‌شود.

شکل ۲. وضعیت مسیر حرکتی اسپرم و پارامترهای وابسته VCL: عبارت است از فاصله‌ها بین دو نقطه مجاور VSL: فاصله طی شده ما بین نقطه ابتدایی و انتهایی حرکت. VAP: خط مستقیم از میانگین فاصله پنج نقطه

