مقاله مروری

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۱۲، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰

بررسی نحوه زنده ماندن اسپرم در اویداکت جهت حصول روشی برای ذخیره اسپرم بدون نیاز به انجماد

مهدی نظری .Ph.D*، حسین دقیق‌کیا .Ph.D

- دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی، تبریز، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Mahdi.na1994@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۱

چکیده

هدف: در زمینه‌ی انجماد و نگه‌داری طولانی مدت اسپرم در گونه‌های مختلف پیشرفت‌های شایان توجهی صورت گرفته است. اما این فرایند آسیب‌های قابل توجهی به سلول اسپرم وارد می‌کند.

در مقاله حاضر سعی شده است مروری بر مطالعات مربوط به مخازن نگه‌داری اسپرم‌ها در طیور و نقش آن‌ها در عمل‌کرد اسپرم داشته باشد.

مطالعات انجام شده بر چگونگی دخیره‌ی طولانی مدت اسپرم در برخی از گونه‌ها بدون نیاز به مواد افزودنی خاصی توجه محققین را به‌خود جلب کرده است. محققین به‌این نتیجه رسیدند که با درک درست از چگونگی ذخیره‌ی اسپرم‌ها در اویداکت می‌توان اسپرم‌ها را برای مدت زمان بیش‌تری بدون منجمد کردن نگه‌داری کرد. این به‌نفع گونه‌هایی است که اسپرم آن‌ها پس از انجماد زنده‌مانی کم‌تری داشته و فقط برای مدت چند روز در شرایط مایع می‌توان نگه‌داری کرد. در این میان بیش‌تر به ترکیباتی تحت عنوان گلیکان‌ها در اپی‌تلیوم اویدوکت و پروتئین‌های اتصالی اسپرم به این گلیکان‌ها اشاره شده است.

با بررسی‌های انجام شده و با توجه به‌این‌که در برخی از گونه‌ها اسپرم‌ها برای مدت طولانی در دستگاه تناسلی ماده ذخیره شده و حتی بدون حضور جنس نر نیز امکان تولید نتاج دارند، می‌توان امیدوار بود با مطالعه مکانیسم‌های دخیل و بدون منجمد کردن، در حفظ ذخایر ژنتیکی برتر و نگه‌داری اسپرم گونه‌های در حال انقراض، افق‌های روشن‌تری گشوده شود.

واژگان کلیدی: اسپرم، اویدوکت، مخازن اسپرم، نگه‌داری بلندمدت

مقدمه

ذخیره اسپرم به‌صورت مایع، یک استراتژی برای کاهش متابولیسم اسپرم است که به حفظ عملکرد اسپرم در حین انجماد کمک می‌کند (۱). در طیور، نتایج حاصل از عمل‌کرد باروری پس از تلقیح مرغ با اسپرم منجمد، مطلوب نیستند (۲). این عمل‌کرد باروری ضعیف، بیش‌تر به خصوصیات غشای پلاسمایی اسپرم خروس نسبت داده می‌شود که باعث می‌شود در هنگام ذخیره‌سازی به‌صورت منجمد، به آسیب‌های انجمادی حساس‌تر شوند (۳). انجماد اسپرم، یک روش کلیدی است که کاربردهای تکنیک تولیدمثل را برای انسان و حیوان، تسهیل می‌کند. انجماد اسپرم، باعث ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود که به اسپرم‌ها آسیب می‌رساند و باعث کاهش زنده‌مانی آن‌ها پس از یخ‌گشایی می‌شود. در فرآیند انجماد اسپرم، بسیاری از عوامل مانند تنش اکسیداتیو و عدم دفاع آنتی‌اکسیدانتی، ممکن است بر کیفیت اسپرم‌ها تاثیر منفی بگذارند (۴-۶). گزارش شده است که اسپرم منجمد باعث کاهش میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها به‌مقدار ۴۰ تا ۵۰ درصد می‌شود (۷). در طول انجماد و ذوب شدن، تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) افزایش می‌یابدکه منجر به تغییر وضعیت دفاع آنتی اکسیدانتی اسپرم و پلاسما منی می‌شود و بر کیفیت منی و توانایی لقاح اسپرم تاثیر می‌گذارد (۸، ۹). تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و متعاقب آن تنش اکسیداتیو تاثیر عمده‌ای بر کیفیت مایع منی هنگام انجماد و ذوب دارد و در نتیجه باعث کاهش ظرفیت لقاح می‌شود (۱۰). هم‌چنین، تغییر ساختاری شدید در بخش‌های مختلف سلول‌های اسپرم پس از انجماد و ذوب مشاهده شده است (۱۱) اسپرم‌ها را می‌توان برای مدت چند ساعت تا چند روز در لوله‌های ذخیره اسپرم دستگاه تولیدمثل پستانداران نگه‌داری کرد ولی در نگه‌داری اسپرم به‌صورت برون تنی و به‌حالت مایع بعد از ۴۲ ساعت کیفیت و میزان باروری اسپرم کاهش چشم‌گیری پیدا می‌کند و این‌درحالی است که در گونه‌های خزندگان اسپرم می‌تواند بیش از ۱ سال در اویدوکت ذخیره شد (۱۲). با مطالعه سازوکارهای درگیر در ذخیره طولانی مدت اسپرم‌ها ، نه‌تنها برای بهبود درک انتقال سلولی بلکه برای روشن کردن عواملی که در انتخاب جنسی نقش دارند نیز می‌تواند مفید باشد (۱۳). در حال حاضر درباره مکانیسم‌های پشتیبانی کننده چنین تکنیک و سازوکارهایی که برای ذخیره طولانی مدت اسپرم است اطلاعات کمی وجود دارد (۱۴). اگر بتوان مکانیسم‌های دخیل در این فرایندها را کشف کرد، امکان ذخیره طولانی مدت اسپرم‌ها در دمای محیط تسهیل می‌شود که مزایای عملی بسیار زیادی به‌ویژه برای حفظ اسپرم در شرایط آزمایشگاهی و درحالت مایع خواهد داشت (۱۴). اویدوکت به‌وسیله تنظیم اتصال اسپرم به اویدوکت می‌تواند روی فرایند لقاح تاثیر گذار باشد (۱۵). مطالعات نشان داده‌اند که تماس مستقیم بین اسپرم‌های انزال شده با سلول‌های اپی‌تلیال اویدوکت برای طولانی شدن بقای اسپرم مورد نیاز است و برای تحریک بیان ژن de novo در سلول‌های اویدوکتی اهمیت دارد (۱۶). تعامل بین اسپرم و اویدوکت می‌تواند طول عمر اسپرم را طولانی‌تر کند، بلوغ اسپرم را تنظیم کند و بر توانایی باروری اسپرم در بدن پستانداران تاثیر بگذارد (۱۷). نشان داده شده است که در شرایط آزمایشگاهی اتصال به اپی‌تلیوم اویدوکت، طول عمر حرکتی اسپرم را در چندین گونه طولانی‌تر می‌کند (۱۸). راه‌کارهای اساسی اتصال اسپرم به‌ویژه از نظر ذخیره اسپرم پیش از تخمک‌گذاری و کاهش بلوغ کامل غشایی در نظر گرفته شده است (۱۹)، از طرف دیگر مطالعاتی انجام شده اثرات حفاظتی تعامل اسپرم با اپی‌تلیال اویدوکت در برابر استرس اکسیداتیو در اسپرم‌های انسانی را خاطرنشان نموده است (۲۰). مطالعات نشان داده‌اند که سر اسپرم در بین مژک‌ها تعبیه شده و همین‌طور هیچ لیزوزومی در اطراف آپیکال وجود ندارد، نشان می‌دهد سلول‌های مژکدار می‌تواند به‌جای

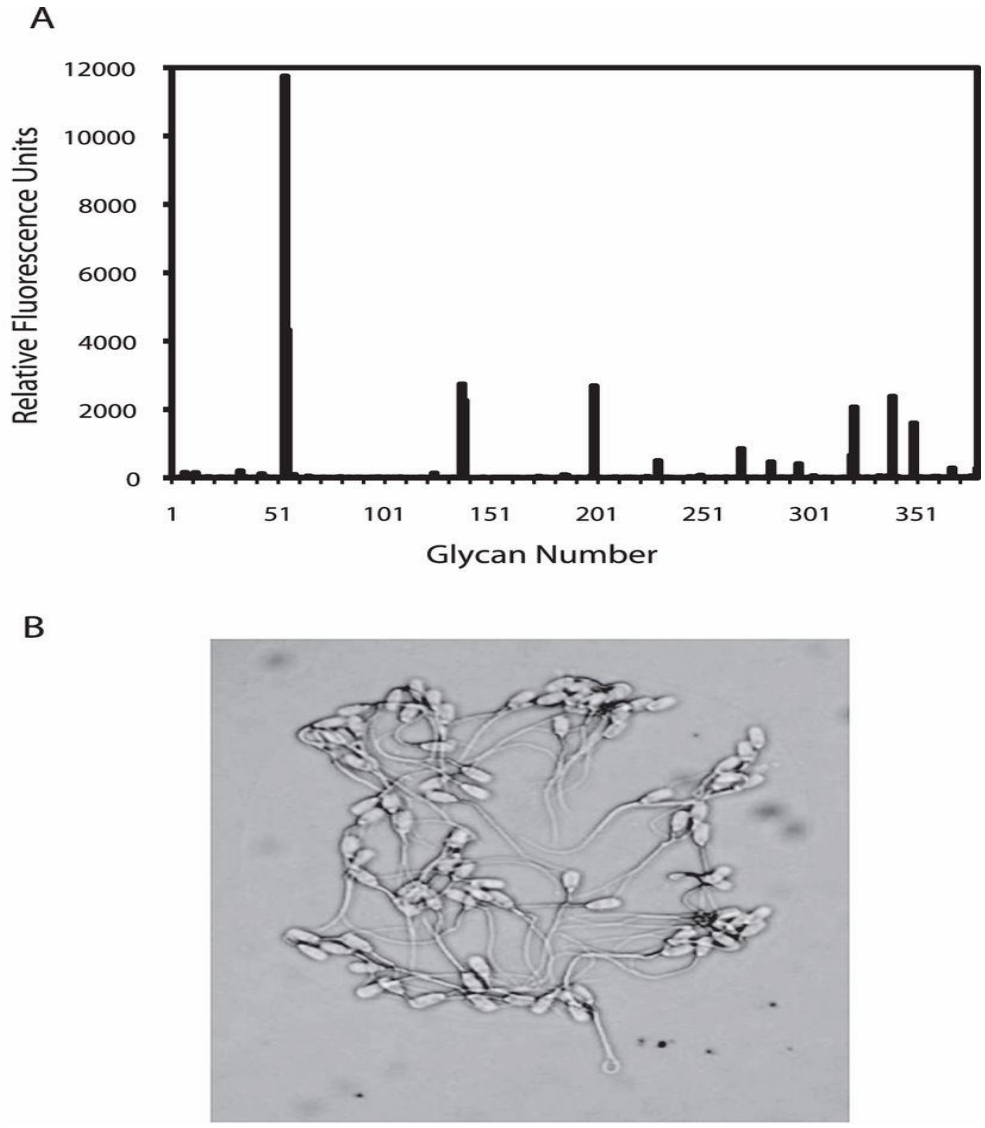
فاگوسیتوز در اویدوکت، اسپرم را پشتیبانی کند. پس از جفت‌گیری در بسیاری از پستانداران، جمعیتی از اسپرم‌ها در بخشی از اویدوکت نگه داشته شده و یک مخزن به‌وجود می‌آورند (۲۰-۲۲).در بسیاری از پستانداران، محل اصلی مخزن اسپرم بخش تحتانی تخمدان، محل اتصال ایستموس و لوله رحم است (۲۲). بعد از جفت‌گیری تعداد کمی از اسپرم‌ها وارد اویدوکت می‌شود که تنظیم این انتقال به پروتئین‌های خاص اسپرم بستگی دارد (۲۳) تشکیل مخازن اسپرم با ارتباط بین پروتئین و کربوهیدرات واسطه گری می‌شود که شامل شناسایی گلیکان‌های اویدوکت توسط پروتئین‌های متصل شده به اسپرم انجام می‌گیرد (۲۴). نوع لیگاندهای کربوهیدرات اویدوکتی که توسط اسپرم‌ها شناخته می‌شوند، ممکن است براساس گونه متفاوت باشد. گلیکان‌های حاوی بقایای گالاکتوزیل، مانوزیل و فوکوزیل به‌ترتیب و به‌طور رقابتی باعث اتصال اسپرم‌های همستر، اسب، خوک و گاو به اپی‌تلیوم اویدوکت می‌شوند (۲۵). درحالی‌که توافق کلی وجود دارد که تشکیل مخزن با شناسایی اسپرم و اتصال کربوهیدرات‌های اویدوکت واسطه‌گری می‌شود اما هویت مولکول‌های درگیر نامشخص است. مخازن سبب افزایش طول عمر اسپرم، تنظیم ظرفیت‌پذیری اسپرم، کنترل پلی‌اسپرمی و انتخاب اسپرم طبیعی می‌شود (۲۰، ۲۲، ۲۳). مخزن اسپرم هم‌چنین تعداد اسپرم‌های موجود در محل لقاح را کنترل می‌کند تا فرصت برای پلی‌اسپرمی محدود شود. درنهایت، به‌نظر می‌رسد که اویدوکت قادر به انتخاب اسپرم با مورفولوژی نرمال آکروزوم است: اسپرم‌هایی که قادر به بارور کردن تخمک هستند. اتصال به اویدوکت زنده ماندنی و تحرک اسپرم را حفظ می‌کند (۲۶). توانایی حفظ میزان زنده‌مانی اسپرم همانند خصوصیات کلیه سلول‌ها نیست (۲۷) و نیاز به‌تماس مستقیم بین غشای سلول‌های اپی‌تلیال اویدوکت و اسپرم دارد (۲۸) هویت مولکول‌هایی که واسطه اتصال اسپرم به اویدوکت می‌باشند، بحث برانگیز است. به‌نظر می‌رسد در گونه‌های مختلف این مولکول‌ها متفاوت باشند. مطالعات بافتی روی گاو دو نوع پروتئین اتصالی به اسپرم GRP78 و HSP60 را شناسایی کردند (۲۹). درحالی‌که برخی مطالعات دیگر با استفاده از اسپرم گاوی پیشنهاد کردند که آنکسین‌های غشایی پلاسمایی اویدوکت که حاوی فوکوز می‌باشند به پروتئین‌های غدد ضمیمه که در هنگام انزال روی اسپرم قرار می‌گیرند متصل می‌شوند (۳۰) مطالعات مربوط به اسپرم خوک حاکی از ترشحات غدد ضمیمه است که به اسپرم اضافه می‌شوند (۲۴). بااین‌حال، اسپرم‌های اپی‌دیدیم که در معرض ترشحات غدد ضمیمه قرار نگرفتند بارور می‌باشند (۲۵). در چندین گونه شواهدی وجود دارد که اسپرم‌ها توسط گلیکان موجود در سلول‌های اپی‌تلیال اویدوکت به ایستموس متصل می‌شوند (۳۱).

در بین همه‌ی گلیکان‌ها دو موتیف، قابلیت اتصال به اسپرم را دارا می‌باشند که عبارتند از: تری‌ساکارید Lewis X و ساختارهای شاخک مانند حاوی یک هسته‌ی مانوز با sialylated lactosamine-6. در شکل ۱ گلیکان‌های متصل به اسپرم خوک به‌عنوان نمونه نشان داده شده است. نتایج فلوروسنت نشان داده است که اسپرم خوک حاوی ۳۷۷ گلیکان می‌باشد که در شکل ۲ اتصال اسپرم خوک به گلیکان خاص نشان داده شده است. هدف از مطالعه حاضر درک تنظیم عمل‌کرد و ظرفیت‌پذیری اسپرم توسط اویدوکت و ارایه راه‌کاری مناسب برای نگه‌داری طولانی مدت اسپرم است.

Glycans that Bound Sperm	RFU
Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-3 Man 1-4GlcNAc 1-4GlcNAc -Sp13 Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-6 **6-Sialylated biantennary lactosamine, Glycan #55**	11,750
Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-3 Man 1-4GlcNAc 1-4GlcNAc -Sp8 Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-6 **6-Sialylated biantennary lactosamine, Glycan #56**	4,322
Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-3 Man 1-4GlcNAc 1-4GlcNAc -Sp12 Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-6 **6-Sialylated biantennary lactosamine, Glycan #200**	2,689
Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-3 Man 1-4GlcNAc 1-4GlcNAc -N(LT)AVL Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-6 **6-Sialylated biantennary lactosamine, Glycan #322**	2,068
Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-3 Man 1-4GlcNAc 1-4GlcNAc -Sp12 GlcNAc 1-2Man 1-6 **Monosialylated branched glycan, Glycan #321**	656
Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-3 Man 1-4GlcNAc 1-4GlcNAc -Sp12 Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-6 **Monosialylated biantennary lactosamine, Glycan #296**	408
Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-3 Man 1-4GlcNAc 1-4GlcNAc -Sp22 Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-6 **Non-sialylated biantennary lactosamine, Glycan #350**	1601
Fuc 1-3 Fuc 1-3 Gal 1-4GlcNAc 1-4Gal 1-4GlcNAc -Sp0 **Lewis X dimer, Glycan #138**	2,741
Fuc 1-3 Fuc 1-3 GlcNAc 1-4Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-4Gal 1-4GlcNAc -Sp0 **Incompletely fucosylated Lewis X-containg structure, Glycan #340**	2,381
Fuc 1-3 Fuc 1-3 Fuc 1-3 Gal 1-4GlcNAc 1-4Gal 1-4GlcNAc 1-4Gal 1-4GlcNAc -Sp0 **Lewis X trimer, Glycan #139**	2,260
Fuc 1-3 Fuc 1-3 Fuc 1-3 Neu5Ac 2-3GalGlcNAc 1-4Gal 1-4GlcNAc 1-3 Gal 1-4GlcNAc 1-4Gal 1-4GlcNAc -Sp0 **Sialylated Lewis X trimer, Glycan #230**	498
Fuc 1-3 (3OSO3)Gal 1-4GlcNAc -Sp0 **Sulfated Lewis X, Glycan #269**	850
Fuc 1-3 Fuc 1-4 Gal 1-4GlcNAc 1-4Gal 1-3GlcNAc -Sp0 **Lewis X-Lewis A dimer, Glycan #283**	463
All Remaining Glycans	<300

شکل ۱: گلیکان‌های متصل به اسپرم‌های ظرفیت‌دار نشده‌ی خوک (۱۵) Kadirvel, Machado

مولکول گلیکانی sialylated lactosamine-6 عاملی است که در اتصال به‌سر اسپرم بوده و با اپی‌تلیوم اویداکت ارتباط برقرار می‌کند. حیوانات مختلف از ذخیره اسپرم در دستگاه تولید مثل حیوان ماده، جهت حفظ باروری استفاده می‌کنند و این کار بیش‌تر در حیواناتی انجام می‌شود که هماهنگی ضعیفی بین جفت‌گیری و تخمک‌گذاری وجود دارد (۱۵). ذخیره اسپرم در سمندرها (۳۲)، مارها، لاک پشت‌ها (۱۴)، بسیاری از پرندگان و پستانداران (۳۳، ۳۴) ثبت شده است، هم‌چنین گونه‌ای از خفاش‌ها که در آن تخمک‌گذاری و باروری ماه‌ها پس از جفت‌گیری اتفاق می افتد.

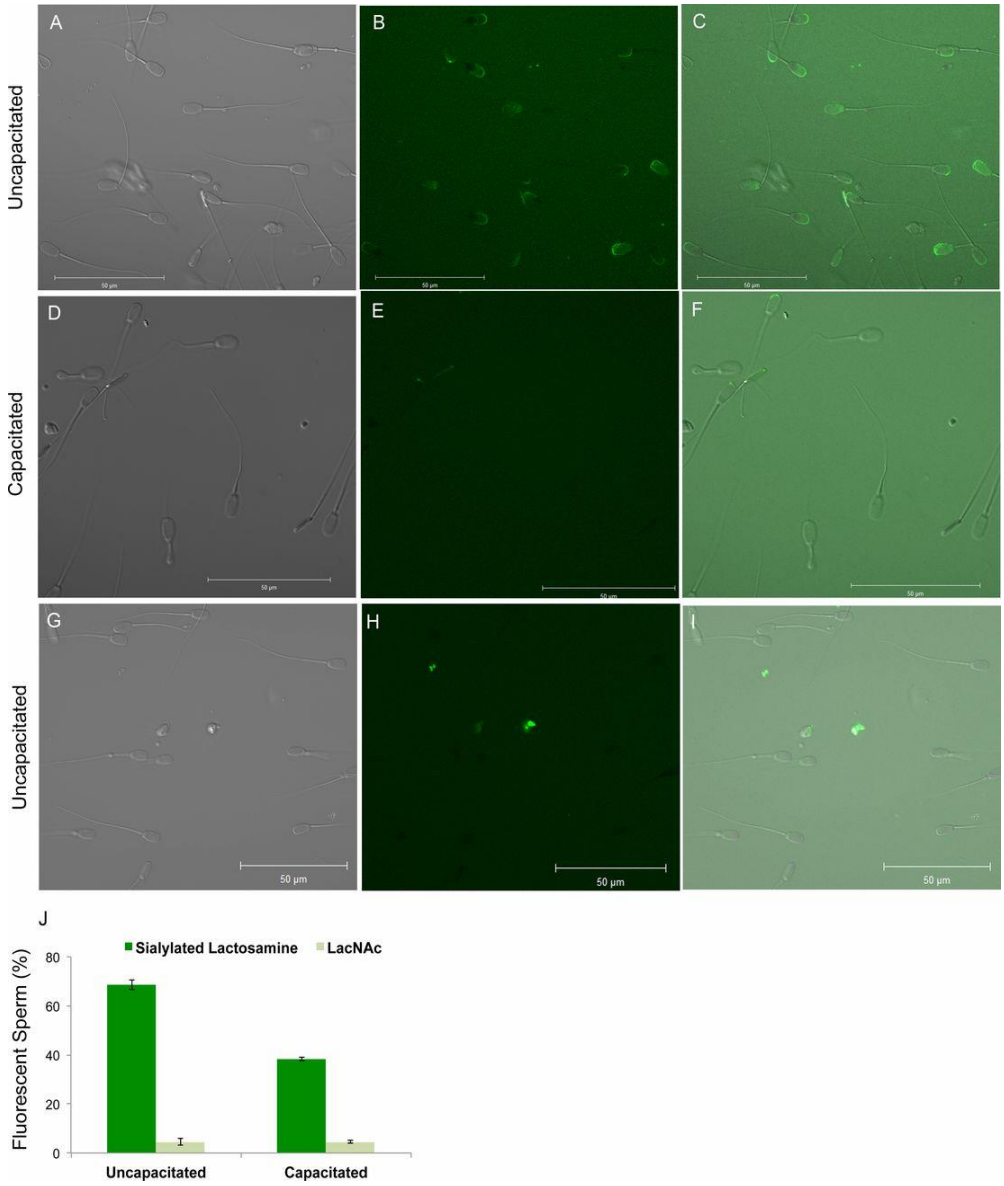


شکل ۲:

اسپرم خوک نشاندار شد و با یک اسلاید حاوی ۳۷۷ گلیکان انکوبه شد. فلورسانس مربوط به اسپرم محدود شده برای هر نقطه گلیکان تشخیص داده شد. تعداد کمی از گلیکان ها به اسپرم متصل می شوند (A). اسپرم خوک متصل به گلیکان‌های خاص که به‌صورت کووالانسی در یک اسلاید میکروسکوپ آرایه شده‌اند(B)
Kadirvel, Machado (۱۵)

با متصل شدن گلیکان‌ها به اسپرم، اتصال اسپرم به سلول‌های اویدوکت بیش از ۶۰ درصد کاهش پیدا می‌کند و به‌دنبال آن، اسپرم ظرفیت‌دار نشده و تا زمان تخمک‌گذاری در مخزن اسپرم بدون تحرک باقی می‌ماند. بخشی از اسپرم که به اپی‌تلیوم اویدوکت متصل می‌شود سر اسپرم می‌باشد (۳۵). از آن‌جایی‌که موتیف‌های لاکتوزآمین در اتصال اسپرم به اپی‌تلیوم اویدوکت ضروری می‌باشد، بنابراین گیرنده‌های این موتیف‌ها در سر اسپرم یافت می‌شود.

شکل ۳ موقعیت 6-sialylated biantennary glycan متصل به‌سر اسپرم را نشان می‌دهد.



شکل ۳: گلیکان های منشعب شده ۶-سیالیته با اتصال به سر اسپرم باعث کاهش ظرفیت پذیری آنها می شوند. اسپرم های ظرفیت پذیر شده یا نشده با فلورسئین نشاندار شده با لاکتوزامین ۶-سیالیته منشعب با هسته مرکزی مانوز یا تنها با لاکتوزآمین نشاندار شده با فلورسئین، انکوبه شدند. فتومیکروگراف ها بیانگر کنتراست تداخل افتراقی(DIC)، فلورسانس، و تصاویر ادغام شده می باشد. تصاویر DIC، فلورسانس و ادغام شده از اسپرم ظرفیت پذیر نشده انکوبه شده با لاکتوزآمین فلورسینه منشعب سیالیته شده، به ترتیب در اشکال A-C نشان داده شده است. تصاویر DIC، فلورسانس و ادغام شده از اسپرم ظرفیت پذیر شده انکوبه شده با لاکتوزآمین فلورسینه منشعب سیالیته شده، به ترتیب در اشکال D-F نشان داده شده است. تصاویر DIC، فلورسانس و ادغام شده از اسپرم ظرفیت پذیر نشده انکوبه شده با لاکتوزآمین فلورسینه دی ساکارید، به ترتیب در اشکال G-I نشان داده شده است. مقیاس میله ها = ۵۰ میکرومتر. درصد اسپرم ظرفیت دار نشده یا اسپرم انکوبه شده تحت شرایط ظرفیت پذیری که به ۶-سیالیت لاکتوزآمین یا دی ساکارید لاکتوزآمین متصل شده در شکل J نشان داده شده است. Kadirvel Machado (۱۵)

با توجه به مطالب بیان شده در بالا به ارایه‌ی مطالبی در خصوص دخیره اسپرم، عملکرد اپی‌تلیوم اویدوکت در اتصال و ذخیره‌سازی اسپرم، تجزیه‌وتحلیل گلیکان‌های اسپرم خوک، گیرنده‌های گلیکان‌های اویدوکت در سطح اسپرم و پاسخ سلول‌های اپی‌تلیال اویدوکت به اتصال اسپرم برای درک بیش‌تر مکانیسم‌های دخیل، پرداخته می‌شود تا با درک بیش‌تر

طبیعت اویدوکت در نگه‌داری طولانی مدت اسپرم‌ها به‌توان راه کار مناسبی را برای حفظ طولانی مدت اسپرم پستانداران در شرایط مایع و بدون منجمد کردن جستجو نمود.

ذخیره اسپرم

در بعضی از گونه‌ها ازجمله برخی از خزندگان مار، خفاش، زنبور و برخی از ماهی‌ها اسپرم‌ها به‌طور معمول تا یک دهه ذخیره می‌شوند. اما سازه‌های مورد استفاده برای ذخیره اسپرم به‌طور قابل توجهی در سطح گونه‌ها متفاوت است که نشان می‌دهد مکانیسم‌های اساسی ممکن است تاحدودی متغیر باشند. پس از جفت‌گیری در بسیاری از پستانداران جمعیتی از اسپرم‌ها در بخشی از اویدوکت نگه داشته شده و یک مخزن به‌وجود می‌آورند. این مخزن عمل‌کرد اسپرم را تنظیم می‌کند، از جمله قابلیت زنده ماندن و ظرفیت‌پذیری و در نهایت بر طول عمر اسپرم تاثیر می‌گذارد. علاوه بر این، اتصال اسپرم به سلول‌های اویدوکت رونویسی ژن سلول‌های اویدوکتی را تحت تاثیر قرار می‌دهد که ممکن است به ذخیره اسپرم و باروری مربوط باشد. گونه‌های مختلف حیوانات مانند خزندگان، دوزیستان، ماهی و پرندگان توانایی ذخیره اسپرم را دارند (۶۳) به‌طور مثال یک کوسه پس از ۵۴ ماه دور بودن از جنس نر توانایی بارور کردن و تولد نتاج دارد (۷۳)، محل ذخیره اسپرم بین گونه‌ها متفاوت است که ممکن است مربوط به تفاوت‌های مورفولوژیکی دستگاه‌های تولیدمثل ماده باشد. بعضی از گونه‌ها اسپرم‌ها را در اندام‌های تخصصی که غالبا لوله‌های کور هستند ذخیره می‌کنند (۳۱) به‌دلیل تنوع اندام‌های ذخیره‌کننده اسپرم مکانیسم‌های مورد استفاده و ذخیره‌سازی، توانایی ذخیره اسپرم به‌احتمال زیاد به‌طور مستقل انجام می‌گیرد. تکامل مکرر مکانیسم‌های مختلف ذخیره سازی نشان می‌دهد که توانایی ذخیره اسپرم می‌تواند به‌راحتی تکامل یابد (۸۳). اما فعل‌وانفعالات مولکولی و سلولی که از ذخیره‌سازی پشتیبانی می‌کنند ممکن است در بین گروه‌های مختلف متفاوت باشد.

اویدوکت به‌عنوان محل ذخیره اسپرم در بدن پستانداران عمل می‌کند. به‌سادگی پیدا کردن اسپرم زنده در مکانی در دستگاه تناسلی، نشان می‌دهد که اسپرم در آن‌جا حفظ می‌شود. طول عمر ممکن است یک ویژگی ذاتی اسپرم باشد و ممکن است جنس ماده در افزایش طول عمر اسپرم نقشی نداشته باشد. ذخیره اسپرم واقعی با تاثیر مخزن بر طول عمر و عمل‌کرد اسپرم نشان داده شده است (۳۹).

"مخزن عمل‌کردی اسپرم" در پستانداران، همان‌طور که توسط هانتر کشف شده است، در ایستموس اویدوکت یافت می‌شود. برای ورود به ایستموس، اسپرم باید از محل اتصال لوله رحمی (UTJ) عبور کند، که به‌نظر می‌رسد کنترل خاصی برروی ورود اسپرم دارد زیرا اسپرم موش در چندین پروتئین ازجمله ADAM2، calmegin و TACE خارج از UTJ کمبود نشان می‌دهد (۴۰، ۴۱) وقتی اسپرم‌ها به اپی‌تلیوم اویدوکت متصل می‌شوند برای حفظ زنده‌مانی اسپرم‌ها، تحرک آن‌ها کم شده و از ظرفیت‌پذیری اسپرم‌ها ممانعت می‌شود (۴۲). علاوه‌بر زنده‌مانی طولانی مدت اسپرم در محل‌های ذخیره اسپرم، پیشنهاد می‌شود لوله‌های مذکور توانایی تشخیص اسپرم‌های بارور را در گونه‌های پستانداران و غیرپستاندار برعهده داشته و انتخاب می‌کنند (۴۱). در نهایت، ذخیره اسپرم جمعیت اسپرم مناسب برای لقاح را افزایش می‌دهد.

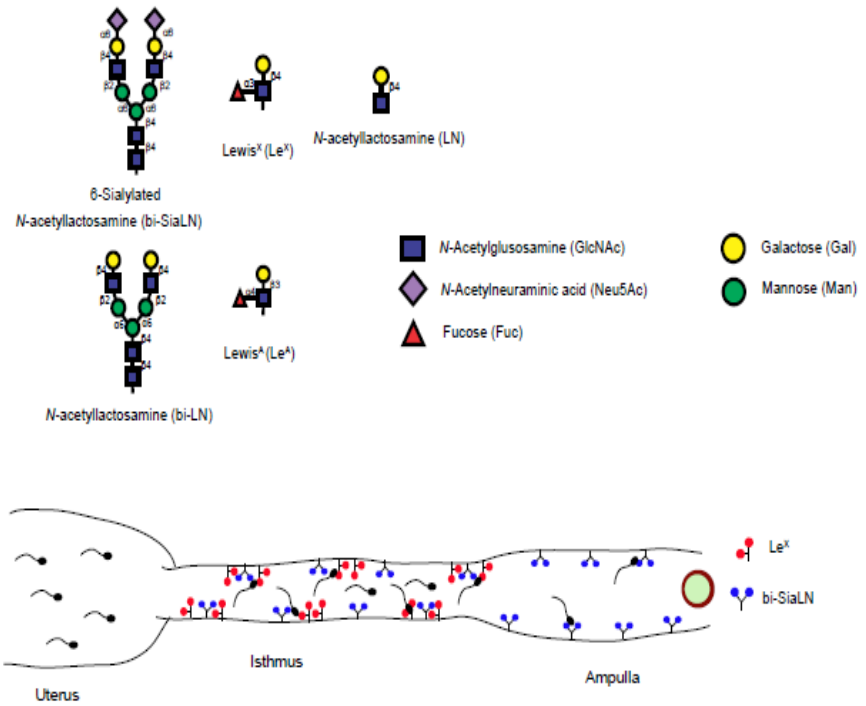
عملکرد اپی‌تلیوم اویدوکت در اتصال و ذخیره‌سازی اسپرم

در پستانداران، اتصال به اپی‌تلیوم اویدوکت حداقل تاحدودی مسئول حفظ اسپرم در اویدوکت است. اتصال به اپی‌تلیوم تاثیرات متنوعی روی اسپرم دارد که در زیر مورد بحث قرار گرفته است. گزارشی اخیر از ذخیره اسپرم در پشه آنوفل نشان داد که جفت‌گیری رونویسی از پراکسیداز را فعال می‌کند (۴۳). شاید اتصال به اپی‌تلیوم اویدوکت باعث افزایش تولید آنزیم‌هایی که گونه‌های فعال اکسیژن در اسپرم را تنظیم می‌کنند شود تا طول عمر آن‌ها طولانی شود. سر اسپرم به سلول‌های اپی‌تیلوم

متصل می‌شود (۴۴). اتصال به اپی‌تلیوم اویدوکت طول عمر باروری اسپرم را طولانی می‌کند (۴۵)، توانایی حفظ میزان زنده ماندن اسپرم یک ویژگی مشترک کلیه سلول‌ها نیست (۴۶). و نیاز به تماس مستقیم بین غشای سلول‌های اپی‌تلیال اویدوکت و اسپرم دارد (۲۹)، اتصال به اویدوکت با مهار آزادسازی کلسیم داخل سلولی که به‌هنگام ظرفیت‌پذیری اسپرم به‌طور طبیعی انجام می‌گیرد روی عمل‌کرد اسپرم تاثیر می‌گذارد (۴۷) شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهند اتصال اسپرم به اویدوکت توسط گلیکان‌های اویدوکت میانجی‌گری می‌شود (۲۶).

تجزیه و تحلیل گلیکان‌های اسپرم

طیف بسیار بسیار زیادی از گلیکان‌ها (تقریبا ۴۰۰ عدد) در ارتباط با توانایی در اتصال اسپرم خوک با استفاده از یک آرایه گلیکان که برای اولین بار برای ارزیابی لکتین‌های خالص شده‌ی گلیکان ساخته می‌شوند، مورد آزمایش قرار گرفتند (۴۸). تمام گلیکان‌هایی که اسپرم‌ها به‌آن متصل شده‌اند، حاوی یکی از دو موتیف گلیکان شامل یک تری‌ساکارید لوئیز X (LeX) یا یک ساختار شاخه‌دار با هسته مانوز و شاخک‌های انتهایی در تری‌ساکارید لاکتوزامین می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴: ساختارهای گلیکان که اسپرم خوک را به‌هم متصل می‌کند (bi-SiaLN، bi-LN و LeX) و گلیکان‌های مرتبط با آن (LN و LeA). bi-SiaLN به‌وفور در اپی‌تلیوم آمپولا و ایستموس شامل سلول‌های مژک‌دار و غیر مژک‌دار. تشخیص داده شده است. LeX در ایستموس اما نه در آمپولا تشخیص داده شده است (۴۹).

در کلیه ساختارهای حاوی اسید سیالیک که به اسپرم متصل می‌شود، اسید سیالیک به‌جای موقعیت کربن شماره ۳ گالاکتوز در موقعیت کربن شماره ۶ قرار می‌گیرد که نشان می‌دهد اتصال خاصی برای اسپرم لازم است. علاوه‌براین، ساختار شاخه‌ای برروی هسته مانوز نیز لازم است (۱۵). برای تایید این‌که ایستموس، گلیکان‌هایی با موتیف مرتبط با اسپرم تولید می‌کند و برای شناسایی کل ساختار گلیکان‌های اپی‌تلیال اویدوکت اتصال یابنده به اسپرم توسط طیف‌سنجی توضیح داده می‌شوند (۱۵) بسیاری از الیگو ساکاریدها از طریق انتهای آسپاراژین به پروتئین متصل می‌شوند (۴۹). bi-SiaLN و LeX به‌سر

اسپرم متصل می‌شوند. بخشی از اسپرم که به اپی‌تلیوم اویدوکت متصل می‌شود سر اسپرم است. بنابراین گیرنده‌های معتبر برای گلیکان‌های bi-SiaLN و یا موتیف LeX باید روی سر اسپرم قرار داشته باشند (۵۰). در ۷۰-۸۰ درصد موارد قبل از ظرفیت‌پذیری bi-SiaLN در ناحیه‌ی آپیکال آکروزم اسپرم مشاهده شده است (۱۵). ساختارهای مشابه، LeA و دی‌ساکارید لاکتوز آمین کم‌تر از ۱۰ درصد به اسپرم متصل می‌شود.

رسپتورهای گلیکان‌های اویدوکت در سطح اسپرم

یک قدم اساسی برای درک نقش موتیف‌های LeX و bi-SiaLN در شکل‌گیری مخزن اویدوکت، توصیف و شناسایی پروتئین‌های موجود در غشای پلاسمایی اسپرم است که این موتیف‌ها را دارا بوده و پیوند می‌دهند. اطلاعات مربوط به اسپرم گراز نشان داد که AQN1 که از ترشحات غده ضمیمه‌ی جنسی ناشی می‌شود یک پروتئین اتصال شونده به گلیکان است (۲۵). گزارش شده است که AQN1 اسپرم به بقایای مانوز و گالاکتوز برروی سلول‌های اویدوکت متصل می‌شود، اما نه به ساختارهای LeX یا bi-SiaLN (۲۴). به‌طور مشابه پروتئین‌های BSP در اتصال باقیمانده‌های فوکوز به آنکسین در اویدوکت گاو نقش دارند (۵۱). آن‌ها مانند **پروتئین‌های چسبنده اسپرمی** spermadhesins فراوان‌ترین محصولات غدد جنسی ضمیمه هستند اما واقعیت این است که مایعات غده ضمیمه برای باروری لازم نیست (۳۱). این نشان می‌دهد پروتئین‌های دیگر موجود در اسپرم اپی‌دیدیم ممکن است عمل‌کرد مشابهی داشته باشند. برای تشخیص و توصیف پروتئین‌های موتیف‌های LeX و bi-SiaLN روی غشای پلاسمایی اسپرم خوک، پروتئین‌های غشای اسپرم توسط تکنیک PAGE-SDS از هم جدا شده و پس از انتقال به نیتروسلولوز ، با گلیکان‌های بوتیله شده، انکوبه شدند. نتایج نشان داد که اسپرم‌ها دارای گروه بسیار متمایزی از پروتئین‌های متصل شونده به LeX با وزن مولکولی بین ۱۲ و ۲۵۰ کیلو دالتون می‌باشند (۵۲). هم‌چنین مطالعات نشان دادند که اتصال Lex با افزودن کلسیم کاهش یافت که نشان می‌دهد، برخی از گیرنده‌های گلیکان وابسته به کلسیم است.

پاسخ سلول‌های اپی‌تلیال اویدوکت به اتصال اسپرم

علاوه‌بر تاثیر اتصال روی اسپرم، به‌نظر می‌رسد این اتصال باعث تغییر در عمل‌کرد سلول‌های اویدوکت می‌شود. مهم‌تر از همه این‌که وجود اسپرم باعث تغییر رونویسی سلول‌های اویدوکت و به‌ویژه پروتئین‌های تولید شده توسط سلول‌های اپی‌تلیال اویدوکت می‌شود (۵۳). افزایش تولید پروتئین‌های خاص توسط سلول‌های اویدوکت مشخص نیست. این ممکن است به توضیح براین موضوع باشد که سلول‌های بیگانه مانند اسپرم چگونه در این محیط دوام می‌آورند اما عوامل بیماری‌زا توسط سیستم ایمنی بدن رد می‌شوند، کمک کند، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد پروتئین‌های غده‌ی وزیکول سمینال ممکن است به‌رحم اجازه‌ی تحمل اسپرم را می‌دهد. ازجمله پروتئین‌هایی که میزان رونویسی آن‌ها در سلول‌های اویدوکت افزایش می‌یابند پروتئین‌های شوک حرارتی هستند. علاوه‌براین یکی از پروتئین‌های شوک حرارتی HSPA8 طول عمر اسپرم را افزایش می‌دهد. نتیجه بسیار جالب این است که سلول‌های اویدوکت نیز می‌توانند تفاوت‌های بسیار ظریفی بین جنسیت اسپرم و در نتیجه جنسیت فرزندان را تشخیص دهند (۵۴).

نتیجه‌گیری

ترکیباتی گلیکانی موجود در اویدوکت، تاثیر بسزایی در اتصال اسپرم به اوویدوکت و ظرفیت‌پذیری اسپرم دارند. با درک درست از چگونگی ذخیره‌ی اسپرم‌ها در اویدوکت می‌توان اسپرم‌ها را برای مدت زمان بیش‌تری بدون منجمد کردن نگه‌داری کرد. این به نفع گونه‌هایی است که اسپرم آن‌ها پس از انجماد زنده‌مانی کم‌تری داشته و فقط برای مدت چند روز در شرایط مایع می‌توان نگه‌داری کرد. این موضوع می‌تواند در مناطقی از جهان باشد با زیرساخت ضعیف برای ذخیره‌سازی مایع منی اهمیت بیش‌تری داشته باشد. در حالت کلی، نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از گلیکان‌ها در رقیق‌کننده اسپرم، می‌تواند ازجمله روش‌هایی باشد که سبب افزایش طول عمر اسپرم در اویدوکت شود و یکی از مشکلات اصلی در تلقیح مصنوعی که عدم هماهنگی تخمک‌گذاری با حضور اسپرم است را بهبود بخشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با همکاری بخش فیزیولوژی تولید مثل دام دانشگاه تبریز انجام گرفته است. لذا از کلیه اساتید و محققین مرکز فوق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Daghigh Kia H, nazari m. Effect of combination of MitoQ as a targeted antioxidant and Pentoxifylline as a non-targeted in Lake based extender on functional quality of rooster sperm during chilled storage on 4◦C. Journal of Animal Science Research. 2020; 30(3):71-83.
2. Sexton T. A new poultry semen extender: 1. Effect of extension on the fertility of chicken semen. Poultry science. 1977;56(5):1443-6.
3. Sharideh H, Esmaeile Neia L, Zaghari M, Zhandi M, et al. Effect of feeding guanidinoacetic acid and L-arginine on the fertility rate and sperm penetration in the perivitelline layer of aged broiler breeder hens. Journal of animal physiology animal nutrition. 2016;100(2):316-22.
4. Nazari M, Daghighkia H, Najafi A. Study of different levels of Vitamin A supplementation in extender on sperm quality in cooling storing and cryopreservation condition in Ghezel ram. Journal of Cell & Tissue. 2021;12(2):134-45.
5. Nazari M. A review study on the effect of various antioxidant supplements on maintaining and improving the performance of sperm parameters. Iranian Journal of Biology. 2021; 5(9): 69-77.
6. Nazari M, Daghigh Kia H. The effect of adding pentoxifylline to the Ross rooster semen on quality parameters of spermatozoa during 6 hours of storage at cooling temperature. Journal of Animal Environment. 2021;13(2):143-8.
7. Kumaresan A, Kadirvel G, Bujarbaruah K, Bardoloi R, et al. Preservation of boar semen at 18 C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. Animal reproduction science. 2009;110(1-2):162-71.
8. Daghigh Kia H, Nazari M, Emami J. Effect of cysteamine amino acid supplementation on reduced lipid peroxidation rate of rooster sperm during freezing-thawing. Journal of Animal Science Research. 2021;31(3):113-24.

9. Nazari M, Daghigh Kia H, Ebrahimi M, Najafi A, et al. Effect of targeted antioxidant 2, 4 dinitrophenol on improving qualitative and quantitative parameters of Ghezel ram sperm after freeze-thawing process during non-breeding season. Animal Sciences Journal. 2021;34(130):181-90.
10. Lucio CdF, Regazzi FM, Silva L, Angrimani DdSR, et al. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. Theriogenology. 2016;85(9):1568-75.
11. Nazari M, Daghigh Kia H, Najafi A. Effect of combination of 2, 4-dinitrophenol as a targeted antioxidant and luteolin as a non-targeted antioxidant on functional parameter of rooster sperm during chilling storage at 4°C. Animal Sciences Journal. 2021;34(132):3-14.
12. Phillips KP, Jorgensen TH, Jolliffe KG, Richardson DS. Potential inter-season sperm storage by a female hawksbill turtle. Marine Turtle Newsletter. 2014(140):13.
13. Neubaum DM, Wolfner MF. 3 Wise, winsome, or weird? Mechanisms of sperm storage in female animals. Current topics in developmental biology. 1998;41:67-97.
14. Holt WV. Mechanisms of sperm storage in the female reproductive tract: an interspecies comparison. Reproduction in domestic animals. 2011;46:68-74.
15. Kadirvel G, Machado SA, Korneli C, Collins E, et al. Porcine sperm bind to specific 6-sialylated biantennary glycans to form the oviduct reservoir. Biology of reproduction. 2012;87(6):147, 1-11.
16. Yeste M, Lloyd R, Badia E, Briz M, et al. Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival in vitro. Animal reproduction science. 2009;113(1-4):263-78.
17. Miller DJ. Physiology and endocrinology symposium: sperm-oviduct interactions in livestock and poultry. Journal of animal science. 2011;89(5):1312-4.
18. Apichela S, Jiménez-Díaz M, Roldan-Olarte M, Valz-Gianinet J, et al. In vivo and in vitro sperm interaction with oviductal epithelial cells of llama. Reproduction in domestic animals. 2009;44(6):943-51.
19. Hunter R. Sperm head binding to epithelium of the oviduct isthmus is not an essential preliminary to mammalian fertilization-review. Zygote. 2011;19(3):265-9.
20. Huang VW, Zhao W, Lee C-L, Lee CY, et al. Cell membrane proteins from oviductal epithelial cell line protect human spermatozoa from oxidative damage. Fertility and sterility. 2013;99(5):1444-52.
21. Suarez SS. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. International Journal of Developmental Biology. 2004;52(5-6):455-62.
22. Tienthai P, Kjellén L, Pertoft H, Suzuki K, et al. Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. Reproduction, Fertility and Development. 2000;12(4):173-82.
23. Nakanishi T, Isotani A, Yamaguchi R, Ikawa M, et al. Selective passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice. Biology of reproduction. 2004;71(3):959-65.
24. Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Tsolova M. Glycobiology of fertilization in the pig. International Journal of Developmental Biology. 2004;52(5-6):717-36.
25. Sabeur K, Ball BA. Characterization of galactose-binding proteins in equine testis and spermatozoa. Animal reproduction science. 2007;101(1-2):74-84.

26. Hung P, Suarez S. Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct. 2010;67:257-66
27. Bayarri S, Chuliá I, Costell E. Comparing λ-carrageenan and an inulin blend as fat replacers in carboxymethyl cellulose dairy desserts. Rheological and sensory aspects. Food Hydrocolloids. 2010;24(6-7):578-87.
28. Timothy Smith T, Nothnick WB. Role of direct contact between spermatozoa and oviductal epithelial cells in maintaining rabbit sperm viability. Biology of reproduction. 1997;56(1):83-9.
29. Boilard M, Reyes-Moreno C, Lachance C, Massicotte L, et al. Localization of the chaperone proteins GRP78 and HSP60 on the luminal surface of bovine oviduct epithelial cells and their association with spermatozoa. Biology of Reproduction. 2004;71(6):1879-89.
30. Ignotz GG, Cho MY, Suarez SS. Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. Biology of reproduction. 2007;77(6):906-13.
31. Wagner A, Ekhlasi-Hundrieser M, Hettel C, Petrunkina A, et al. Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation—studies in the pig. Molecular Reproduction and Development. 2002;61(2):249-57.
32. Sever DM, Brizzi R. Comparative biology of sperm storage in female salamanders. Journal of Experimental Zoology. 1998;282(4-5):460-76.
33. Suarez S, Redfern K, Raynor P, Martin F, et al. Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. Biology of reproduction. 1991;44(6):998-1004.
34. Holt W, Elliott R, Fazeli A, Sostaric E, et al. Harnessing the biology of the oviduct for the benefit of artificial insemination. Society of Reproduction and Fertility supplement. 2006;62:247-59.
35. Holt W, Lloyd R. Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: how does it work so well? Theriogenology. 2010;73(6):713-22.
36. Bernal M, Sinai N, Rocha C, Gaither M, et al. Long-term sperm storage in the brownbanded bamboo shark Chiloscyllium punctatum. Journal of fish biology. 2015;86(3):1171-6.
37. Orr TJ, Zuk M. Reproductive delays in mammals: an unexplored avenue for post-copulatory sexual selection. Biological Reviews. 2014;89(4):889-912.
38. Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization. Development. 2013;140(22):4471-9.
39. Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, et al. Boar spermatozoa in the oviduct. Theriogenology. 2005;63(2):514-35.
40. Coy P, Cánovas S, Mondéjar I, Saavedra MD, et al. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. Proceedings of the national Academy of Sciences. 2008;105(41):15809-14.
41. Smith DF, Song X, Cummings RD. Use of glycan microarrays to explore specificity of glycan-binding proteins. Methods in enzymology. 2010;480:417-44.

42. Boilard M, Bailey J, Collin S, Dufour M, et al. Effect of bovine oviduct epithelial cell apical plasma membranes on sperm function assessed by a novel flow cytometric approach. Biology of reproduction. 2002;67(4):1125-32.
43. Miller D. Regulation of sperm function by oviduct fluid and the epithelium: insight into the role of glycans. Reproduction in domestic animals. 2015;50(52):31-9.
44. Suarez SS, Pacey A. Sperm transport in the female reproductive tract. Human reproduction update. 2006;12(1):23-37.
45. Rodriguez-Martinez H. Role of the oviduct in sperm capacitation. Theriogenology. 2007;68:S138-S46.
46. Dobrinski I, Timothy Smith T, Suarez SS, Ball BA. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. Biology of reproduction. 1997;56(4):861-9.
47. Fazeli A, Elliott R, Duncan A, Moore A, et al. In vitro maintenance of boar sperm viability by a soluble fraction obtained from oviductal apical plasma membrane preparations. Reproduction. 2003;125(4):509-17.
48. Chang H, Suarez SS. Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. Biology of reproduction. 2010;83(4):507-13.
49. Amann R, Griel Jr L. Fertility of bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymidis, and ejaculated semen. Journal of dairy science. 1974;57(2):212-9.
50. Silva E, Kadirvel G, Jiang R, Bovin N, et al. Multiple proteins from ejaculated and epididymal porcine spermatozoa bind glycan motifs found in the oviduct. Andrology. 2014;2(5):763-71.
51. Georgiou AS, Snijders AP, Sostaric E, Aflatoonian R, et al. Modulation of the oviductal environment by gametes. Journal of proteome research. 2007;6(12):4656-66.
52. Kawano N, Araki N, Yoshida K, Hibino T, et al. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014;111(11):4145-50.
53. Lloyd R, Elliott R, Fazeli A, Watson P, et al. Effects of oviductal proteins, including heat shock 70 kDa protein 8, on survival of ram spermatozoa over 48 h in vitro. Reproduction, Fertility and Development. 2009;21(3):408-18.
54. Lloyd R, Fazeli A, Watson P, Holt W. The oviducal protein, heat-shock 70-kDa protein 8, improves the long-term survival of ram spermatozoa during storage at 17° C in a commercial extender. Reproduction, Fertility and Development. 2012;24(4):543-9.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2022; 12(4)

Review article

Investigating the process of surviving sperm in oviduct to get a method for sperm storage without cryopreservation

Nazari M* Ph.D., Daghighkia H Ph.D.

- Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

* Email corresponding author: Mahdi.na1994@gmail.com

Received: 25 Oct. 2021 Accepted: 1 Jan. 2022

Abstract

Aim: Considering that significant progress has been made in the field of cryopreservation and long-term storage of sperm in different species, but this process causes significant damage to the sperm cell. In this article, we have tried to review the studies related to sperm storage tanks in poultry and their role in sperm function.

The researchers concluded that with a proper understanding of how sperm is stored in the oviduct, sperm can be stored for longer without freezing. This is in favor of species whose sperm have a shorter viability after freezing and can only be stored in liquid conditions for a few days. Compounds called glycans in the epithelium of the oviduct and sperm binding proteins to these glycans are more commonly referred to. In this review, information about sperm storage tanks, the role of these tanks in sperm function, glycans were studied in mammals from google scholar, pub med, andrology, reproduction of domestic animals and biology of reproduction.

By studies of these contents, we conclude that in some species, sperm are stored for a long time in the female reproductive system and are able to produce offspring without the presence of males, by carefully studying the mechanisms involved and being inspired by these events, we can succeed in preserving superior genetic resources and preserving the sperm of endangered species without freezing.

Keywords: Glycans, Sperm reservoirs, Oviduct, Cell binding