مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۴، ۳۹۲ - ۳۸۷

اثرات لپتین و انسولین بر ظرفیت یابی اسپرماتوزوای قوچ در تولید جنین آزمایشگاهی

مسلم ریاحی[۱] پژمان میرشکرایی[۲،۳*] حسن حسن پور[۲] مصطفی معماریان[۱] ابراهیم احمدی[۲]

۱) گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان ـ ایران.
۲) پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد ـ ایران.
۳) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ـ ایران.

(دریافت مقاله: ۲۰ اسفند ماه ۱۳۹۰ ، پذیرش نهایی: ۳ خرداد ماه ۱۳۹۱)

چکیده

زمینه مطالعه: بهبود کیفیت اسپرم و ارتقاء میزان باروری اسپرم با مواد و هورمون‌های گوناگون به ویژه جهت انجام باروری آزمایشگاهی از زمینه‌های تحقیقات علوم بیوتکنولوژی تولید مثل دام می‌باشد. **هدف:** در این مطالعه هدف بررسی نقش احتمالی لپتین و انسولین بر پارامترهای ظرفیت یابی، واکنش اکروزومی، بقا و باروری اسپرماتوزوای قوچ می‌باشد. **روش کار:** نمونه‌های منی از ۱۰ راس قوچ نژاد لری بختیاری به وسیله واژن مصنوعی گرفته شد. پس از انجام دوزسنجی موثرترین دوزهای انسولین (nM 1) و لپتین (nM 100) انتخاب شدند و به چهار گروه آزمایشی حاوی انسولین، لپتین، مخلوط لپتین ـ انسولین و فاقد هورمون (شاهد) تقسیم و پارامترهای ظرفیت یابی، واکنش اکروزومی، بقا و باروری در موردشان مورد بررسی قرار گرفت. ظرفیت یابی و واکنش اکروزومی به وسیله رنگ آمیزی کلروتتراسایکلین مورد بررسی قرار گرفت و برای بررسی بقای اسپرماتوزوا از روش رنگ آمیزی ائوزین ـ نیگروزین استفاده شد. باروری اسپرم قوچ نیز به وسیله انجام باروری آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** میزان ظرفیت یابی و بدنبال آن واکنش آکروزومی در زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه توسط انسولین و لپتین افزایش یافت، گروه انسولین در زمان ۳۰ دقیقه اسپرم مرده کمتری نسبت به گروه کنترل داشت ولی در سایر زمان‌ها هیچ تأثیر معنی‌داری از گروه‌های تیماری بر بقای اسپرم مشاهده نشد ($p<0/05$). همچنین این دو هورمون هیچ تأثیر معنی‌داری بر باروری اسپرم قوچ نداشتند. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد هرچند انسولین و لپتین باعث بهبود پارامترهای ظرفیت یابی و واکنش آکروزومی و حتی بقا اسپرم می‌شود اما بر تولید جنین آزمایشگاهی موثر نیست.

واژه‌های کلیدی: انسولین، لپتین، اسپرم قوچ، ظرفیت یابی، تولید جنین آزمایشگاهی.

مقدمه

لپتین هورمونی پلی پپتیدی است که به وسیله بافت چربی، به خصوص چربی سفید تولید می‌شود. این هورمون از طریق بیان ژن ob (obese) ترشح می‌شود (۱۵). لپتین نقش تنظیم کننده در ذخیره چربی، مصرف غذا و متابولیسم انرژی دارد. لپتین هم چنین نقش مهمی در دامنه وسیعی از فعالیت‌های فیزیولوژیکی از جمله تولید مثل ایفا می‌کند. نقش این هورمون در تعدادی از فرآیندهای تولید مثلی و آبستنی جنس ماده شامل: آغاز بلوغ، باروری، نموروبانی و جفت مشخص شده است. حضور لپتین در پلاسمای منی انسان ثابت شده است (۴). در گذشته این تصور وجود داشته که لپتین موجود در پلاسمای منی از غدد ضمیمه‌ای دستگاه تناسلی ترشح می‌شود ولی مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ژن لپتین در اسپرم انزالی انسان بیان و این ماده ترشح می‌شود (۱۳). اهمیت لپتین در تولید مثل جنس نر هنوز موضوعی بحث برانگیز است (۱۰). De Ambrogi و همکاران در سال ۲۰۰۷ بیان ژن لپتین و گیرنده‌های لپتین را در اسپرماتوزوای خوک گزارش دادند (۷). توافقی در مورد حضور گیرنده لپتین در اسپرم انسان وجود ندارد. در مطالعات Li و همکاران در سال ۲۰۰۸ عدم وجود mRNA گیرنده لپتین در اسپرماتوزوای انسان را تائید کردند (۱۳). در صورتی که Lampiao و همکاران در سال ۲۰۰۸ وجود گیرنده لپتین روی اسپرماتوزوای انسان را نشان دادند (۱۱). Aquila و همکاران در سال ۲۰۰۵ بیان کردند که ژن لپتین در اسپرماتوزوای انزالی انسان بیان و این هورمون ترشح می‌شود (۴). De Ambrogi و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش دادند که گیرنده لپتین بر روی اکروزوم، ناحیه زیر استوایی و قطعه میانی اسپرم خوک وجود دارد (۷)، Jope و همکاران در سال ۲۰۰۳ و Li و همکاران در سال ۲۰۰۵ به وسیله مکان یابی میکروسکوپی به کمک رنگ آمیزی به روش ایمنوفلورسنت، ایزوفرم ۱۴۵-kDa گیرنده لپتین را در ناحیه دم اسپرماتوزوای انزالی انسان مشخص کردند (۹،۱۳).

انسولین هورمونی پلی پپتیدی می‌باشد که به وسیله سلول‌های بتا ـ جزایر لانگرهانس لوزالمعده تولید می‌شود. نقش اولیه آن تنظیم سطوح گلوکز خون به وسیله افزایش مصرف گلوکز در بافت‌ها و ذخیره به عنوان گلیکوژن یا لیپید می‌باشد. اهمیت انسولین در فیزیولوژی اسپرم از طریق تأثیر دیابت نوع یک بر اسپرم مردان مشخص می‌شود که باعث چندین نقص ساختاری، کاهش قابل ملاحظه در تحرک و پایین بودن نفوذ آن در تخمک مشخص می‌شود (۱). اخیراً Aquila و همکاران در سال ۲۰۰۵ بیان کردند که ژن انسولین در اسپرماتوزوای انزالی انسان بیان و انسولین ترشح می‌شود آنها هم چنین بیان کردند که انسولین در اسپرماتوزوای انسانی در سطح زیر اکروزوم قطعه میانی و سراسر دم وجود دارد (۲). Throsby و

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۳۸۱-۴۴۲۴۴۲۷ نمابر: ۰۳۸۱-۴۴۲۴۴۲۷ Email: mirshokraei@vet.sku.ac.ir

همکاران در سال ۱۹۹۸ وجود رونوشت ژن انسولین و پروتئین آن در اسپرماتوزوای انسان را گزارش دادند و بیان کردند که اسپرم انسان به صورت خود مختار قادر به مدیریت انرژی طبق نیازهای متابولیکی و مستقل از تنظیم سیستماتیک می‌باشند(۱۷). Carpino و همکاران در سال ۲۰۰۹ وجود انسولین ۳۶-kDa مشابه با انسولین بتا پانکراسی و اسپرماتوزوای انسان را در اسپرماتوزوای خوک گزارش دادند. آنها هم چنین بیان کردند که گیرنده بتای انسولین فقط از سطح قطعه میانی اسپرماتوزوای خوک قابل جدا سازی است و انسولین از طریق اتوکراین روی گیرنده خود اثر کرده و باعث تنظیم و مدیریت انرژی اسپرماتوزوای خوک می شود(۶). Ando و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که لپتین و انسولین ممکن است در اسپرماتوزوای انزالی برای کنترل وضعیت انرژی حیاتی باشند(۱). تا به حال تحقیقی بر روی نقش انسولین و لپتین بر روی باروری حیوان نر نشخوارکنندگان کوچک بویژه گوسفند انجام نگرفته است و در این مطالعه سعی گردید تا اثرات احتمالی انسولین و لپتین بر باروری اسپرم انزالی قوچ بررسی شود.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری: نمونه‌های منی از ۱۰ قوچ نژاد لری-بختیاری که در ایستگاه اصلاح نژاد و پرورش گوسفندان لری بختیاری شولی وابسته به جهاد کشاورزی با استفاده از واژن مصنوعی تهیه شد و طبق استانداردهای WHO به پژوهشکده فناوری جنین دام دانشگاه شهرکرد منتقل شد. لپتین (Cat no:L4146) انسانی و انسولین (Cat no:I9254) گوسفندی از شرکت سیگما تهیه شد. جهت رقیق سازی اسپرم از محیط کشت (TCM HTCM (HEPES بعلاوه ۱۰٪ سرم گوساله جنینی (FCS) استفاده شد. پس از انجام دوز سنجی لپتین و انسولین موثرترین دوزهای این دو هورمون انتخاب و به صورت چهار گروه شاهد، ۱۰۰ nM لپتین، ۱ nM انسولین و مخلوط این دو هورمون تقسیم بندی شدند. پس از تهیه این دوزها نمونه‌ها گرم خانه‌گذاری شدند و در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰ دقیقه پارامترهای ظرفیت یابی و زنده مانی اسپرماتوزوا مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی ظرفیت یابی و واکنش اکروزومی از رنگ آمیزی CTC که توسط Perry و همکاران در سال ۱۹۹۵ توصیف شده است استفاده شد. جهت بررسی بقای اسپرم از رنگ آمیزی ائوزین نیگروزین استفاده شد(۱۴).

تولید آزمایشگاهی جنین: تخمدان‌ها در سرم فیزیولوژی حاوی آنتی بیوتیک در دمای 37°-۲۵ از کشتارگاه تهیه شدند. کمپلکس اووسیت و سلول‌های کومولوس (COC) به وسیله آسپیراسیون از تخمدان‌ها استحصال شدند. COCها بعد از ۴ بار شستشو در محیط شستشو، به قطرات ۵۰μL کشت منتقل شدند و به مدت ۲۴-۲۲ ساعت در دمای $39^{o}C$، ۵٪ CO2، رطوبت حداکثر قرار می‌گرفتند.

۱۰۰-۸۰μL از انزال تازه در زیر ۱mL محیط HTCM برای انجام فرایند swim-up قرار داده شد. این لوله در انکوباتور $39^{o}C$ به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس مایع رویی برداشت شده و به این مایع ۳mL-۲ محیط اضافه شد و با دور ۲۰۰ و به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. پلیت تشکیل شده را با دقت برداشته، به رقت‌های ساخته شده از لپتین ۱۰۰nM، انسولین ۱nM و مخلوط لپتین-انسولین اضافه شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور قرار گرفتند سپس به مدت دو دقیقه در ۲۰۰g-۳۰۰ سانتریفوژ شدند و از پلیت انتهایی برای انجام IVF استفاده شد. بعد از اضافه کردن اسپرم دیش‌ها در انکوباتور $39^{o}C$، ۵٪ CO2 و رطوبت حداکثر و به مدت ۲۶-۱۸ ساعت قرار داده شدند. زیگوت‌ها پس از برهنه شدن از مایع داخل دیش برداشت شده و پس از ۴ بار شست و شو در محیط شست و شو و یک بار در محیط کشت به قطرات کشت منتقل شدند. تازه کردن (refresh) محیط کشت جنین‌ها هر ۴۸ ساعت انجام شد (روزهای ۳ و ۵). در بار اول (روز ۳) جنین‌های تسهیم شده (cleaved) از تسهیم نشده‌ها جدا شدند. در روز ۱ محیط کشتی که استفاده شد IVC-SOF گلوکز دار بود، ولی در روزهای ۳ و ۵ به این محیط ۱۰٪ FCS اضافه گردید. مشاهده جنین‌ها در روزهای ۳ جهت تعیین تعداد cleavage، ۶ جهت تعیین تعداد بلاستوسیست، ۷ و ۸ جهت تعیین تعداد کلی بلاستوسیست و وضعیت اتساع (expansion) و تفریخ (hatching) بلاستوسیست‌ها بود.

آنالیز آماری: به منظور انجام آزمون‌های آماری در بین گروه‌ها در مقاطع زمانی متفاوت ابتدا آزمون نرمال بودن انجام می‌گیرد. در صورت نرمال بودن توزیع داده‌ها آزمون آماری measurement ANOVA repeated و در غیر این صورت از آزمون کروس کال والیس استفاده می‌شود. در هر دو صورت در صورت معنی‌دار بودن اختلاف در بین گروه‌های آنالیز اسپرم و در مقاطع زمانی متفاوت از آزمون تکمیلی Duncan استفاده شد. جهت مقایسه نتایج حاصل از IVF از تست مربع کای استفاده شد. برای انجام آزمون‌های آماری از نرم افزار Sigma State استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از تأثیر انسولین، لپتین و مخلوط این دو هورمون بر ظرفیت یابی، واکنش اکروزومی و بقا در جدول ۱ آورده شده است. در زمان ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه هر سه گروه تیمار (گروه‌های انسولین، لپتین و مخلوط انسولین - لپتین) موجب افزایش معنی‌داری در ظرفیت یابی اسپرم‌های قوچ نسبت به گروه شاهد شدند ($p<0/05$) ولی در زمان ۱۸۰ دقیقه تنها گروه‌های انسولین و مخلوط انسولین - لپتین موجب افزایش در ظرفیت یابی شدند و نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($p<0/05$). در زمان ۳۰ دقیقه گروه‌های انسولین و لپتین و در زمان ۶۰ دقیقه تنها گروه انسولین نسبت به گروه شاهد موجب افزایش معنی‌داری در واکنش اکروزومی شدند ($p<0/05$). بعد از ۳۰ دقیقه از شروع آزمایش گروه

جدول ۱ـ میانگین±خطای استاندارد ظرفیت یابی ،عدم ظرفیت یابی، واکنش اکروزومی و میزان بقا اسپرم قوچ بر حسب درصد در غلظت‌های ۱nmol انسولین، ۱۰۰ nmol لپتین و مخلوط این دو غلظت در طول زمان. * متفاوت در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

تیمارها / پارامترها	اسپرم‌های ظرفیت یابی شده (٪)	اسپرم‌هایی با واکنش آکروزومی (٪)	اسپرم‌های زنده (٪)
بعد از ۳۰ دقیقه			
کنترل	۱/۶۶±۱۳[a]	۰/۷۸۹/۴[a]	۷۶/۶±۰/۸۳[a]
انسولین (۱nmol)	۲۲±۱/۸۷[b]	۱۲/۴±۰/۹۱[b]	۸۱/۶±۱/۳۶[b]
لپتین (۱۰۰nmol)	۲۴/۲±۱/۶۸[b]	۱۰/۲±۰/۵۷[a]	۷۷/۸±۱/۲۹[ab]
انسولین و لپتین	۲۰/۲±۱/۷۳[b]	۱۰/۶±۰/۳۴[ab]	۷۵/۸±۲/۱[a]
بعد از ۶۰ دقیقه			
کنترل	۱۶/۲±۱/۱[a]	۹±۰/۸۴[a]	۷۳/۴±۱/۱۳
انسولین (۱nmol)	۲۲/۶±۱/۳۶[b]	۱۱/۸±۰/۶۸[b]	۷۹/۴±۱/۴۵
لپتین (۱۰۰nmol)	۲۲/۶±۰/۷۸[b]	۱۰/۴±۰/۷۲[ab]	۷۷/۶±۱/۸۵
انسولین و لپتین	۲۳/۶±۱/۲۹[b]	۱۰±۰/۴۲[ab]	۷۷/۸±۱/۷۶
بعد از ۱۲۰ دقیقه			
کنترل	۱۵/۶±۱/۴۴[a]	۱۲±۰/۹۴	۷۰/۸±۱/۵۱
انسولین (۱nmol)	۲۱/۶±۱/۴۱[b]	۱۲/۲±۰/۷۷	۷۴/۶±۱/۷۷
لپتین (۱۰۰nmol)	۲۱/۴±۰/۷۲[b]	۱۱±۰/۵۶	۷۳/۲±۲/۵۸
انسولین و لپتین	۲۱/۶±۰/۸۶[b]	۱۰/۸±۰/۶۸	۷۴/۴±۲/۵۱
بعد از ۱۸۰ دقیقه			
کنترل	۱۷/۴±۱/۵۳[a]	۹/۲±۰/۲۵	۶۸/۸±۲/۲۲
انسولین (۱nmol)	۲۳/۴±۱/۵۴[b]	۱۱/۲±۰/۵۳	۷۴/۴±۲/۳۸
لپتین (۱۰۰nmol)	۲۱/۲±۰/۹۰[ab]	۹/۶±۰/۵۴	۷۴±۲/۹۴
انسولین و لپتین	۲۴/۴±۱/۶۶[b]	۱۰/۴±۰/۷۵	۷۳/۴±۲/۴۶
بعد از ۲۴۰ دقیقه			
کنترل	۱۵/۴±۱/۳۴	۷/۸±۰/۲۵[a]	۶۸±۲/۵۵
انسولین (۱nmol)	۲۰/۴±۱/۶۳	۱۰/۴±۰/۲۷[b]	۷۲/۸±۲/۵۶
لپتین (۱۰۰nmol)	۱۹/۸±۱/۶۳	۱۰/۲±۰/۴۴[b]	۷۳/۴±۲/۸۹
انسولین و لپتین	۱۸/۲±۱/۷۷	۱۱/۲±۰/۷۱[b]	۷۲/۸±۲/۲۷

جدول ۲ـ تعداد (درصد) اووسیت‌ها، جنین‌های تسهیم شده، بلاستوسیست اولیه، بلاستوسیست اتساع یافته (Expanded Blastocyste)، بلاستوسیست تفریخ شده و تعداد کل بلاستوسیست‌ها در گروه‌های تحت بررسی.

تیمارها / پارامتر	تعداد اووسیت	تعداد جنین‌های تسهیم شده (٪)	تعداد بلاستوسیست اولیه (٪)	تعداد بلاستوسیست اتساع یافته (٪)	تعداد بلاستوسیست تفریخ شده (٪)	تعداد کلی بلاستوسیست (٪)
کنترل	۱۲۵	۱۰۶ (۸۴/۸)	۱۰ (۲۳/۲۶)	۱۵ (۳۴/۸۸)	۱۸ (۴۱/۸۶)	۴۳ (۴۰/۵۷)
انسولین ۱nmol	۱۳۴	۱۱۰ (۸۲/۰۹)	۱۰ (۲۲/۷۳)	۱۶ (۳۶/۳۶)	۱۷ (۳۸/۶۴)	۴۴ (۴۰)
لپتین (۱۰۰nmol)	۱۳۷	۱۱۵ (۸۳/۹۴)	۱۲ (۲۷/۲۷)	۱۴ (۳۱/۸۲)	۱۸ (۴۰/۹۱)	۴۰ (۳۸/۲۶)
انسولین و لپتین	۱۵۰	۱۲۵ (۸۳/۳۳)	۱۲ (۲۴)	۱۴ (۲۸)	۲۴ (۴۸)	۵۰ (۴۰)

انسولین به طور معنی‌داری اسپرم‌های مرده کمتری نسبت به گروه‌های شاهد و مخلوط لپتین و انسولین داشت($p<0/05$). در زمان‌های ۳۰، ۶۰ گروه انسولین به طور معنی‌داری افزایش در واکنش آکروزومی را نسبت به گروه کنترل نشان دادند بعد از ۲۴۰ دقیقه همه گروه‌های تیمار به طور معنی‌داری درصد واکنش اکروزومی بالاتری را نسبت به گروه کنترل نشان دادند($p<0/05$). نتایج اثرات تیمارهای لپتین، انسولین و مخلوط این دو هورمون بر پارامترهای مربوط به IVF در جدول دو آورده شده است. تیمارهای انجام شده هیچ گونه تأثیری بر پارامترهای مربوط به IVF نداشتند.

بحث

مطالعات مختلف وجود گیرنده‌های لپتین و انسولین و ترشح این دو هورمون را در اسپرم برخی گونه‌ها نظیر انسان و خوک مورد تایید قرار داده‌اند. مکان یابی گیرنده‌های این دو هورمون نشان داد که گیرنده‌های این دو هورمون بیشتر در نواحی نظیر قطعه میانی و دم اسپرماتوزوا قرار دارند، Giovambattista و همکاران در سال ۲۰۰۳ بیان کردند پارامترهایی شبیه بقای اسپرم، به شدت با مکانیسم‌های مدیریت انرژی مرتبط است (۸). در این مطالعه گروه‌های تیماری اثر معنی‌داری بر بقای اسپرم نداشتند و تنها تیمار انسولین نسبت به گروه کنترل زمان ۳۰ دقیقه به طور معنی‌داری درصد اسپرماتوزوای زنده بیشتری داشت که این نتایج مشابه نتایج مطالعه Lampiao و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر اسپرم انزالی انسان می‌باشد. Aquila و همکاران در سال ۲۰۰۵ بیان داشتند که لپتین جریان کلسترول و فعالیت اکروزین را در اسپرماتوزوای خوک تحریک کرده که ممکن است نشان دهنده بهبود ظرفیت‌یابی باشد(۳). برخی مطالعات بیان داشتند که اسپرم خوک قادر به ترشح انسولین می‌باشد و این ترشح به گلوکز نیز پاسخ می‌دهد. در حقیقت گلوکز ظرفیت یابی خود به خودی و واکنش اکروزومی را در اسپرماتوزوای خوک تحریک می‌کند(۶). هم چنین اسپرماتوزوای ظرفیت یابی شده لپتین و انسولین بیشتری از اسپرماتوزوای ظرفیت یابی نشده ترشح می‌کند(۳). به همین دلایل تصور می‌شود که این دو هورمون تأثیر مفیدی بر ظرفیت یابی و به دنبال آن واکنش اکروزومی داشته باشند. گروه‌های تیمار انسولین، لپتین و مخلوط انسولین-لپتین باعث افزیش در ظرفیت یابی و به دنبال آن واکنش اکروزومی شدند و این نشان دهنده تأثیر مفید انسولین و لپتین در ظرفیت یابی و واکنش اکروزومی می‌باشد. در تایید مطالعه حاضر برخی مطالعات نشان داده‌اند که انسولین قادر به تنظیم ظرفیت یابی و واکنش اکروزومی است (۶). Lampiao و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیان داشتند که انسولین و لپتین باعث تحریک واکنش ظرفیت یابی در اسپرم انسان می‌شود و واکنش اکروزومی را نیز در پی آن پشتیبانی می‌کند(۱۰). Ando و همکاران در سال ۲۰۰۵ بیان کردند که ترشح انسولین از اسپرم درون محیط کشت القا کنند ظرفیت یابی فوراً اتفاق می‌افتد و این نشان دهنده نقش انسولین در این فرآیند است(۱). هورمون لپتین در اووسیت‌های انسان، موش و مایع فولیکولی انسان مشاهده شده است همچنین درگرانولوزا و سلول‌های کومولوس انسان، گاو و خوک وجود دارد (۱۶). در تحقیقاتی که Boelhauve و همکاران در سال ۲۰۰۵ هم چنین Yong و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی اووسیت گاوسانان و خوکسانان انجام دادند به این نتیجه رسیدند که تیمار لپتین در طی بلوغ اووسیت پتانسیل نمو را بهبود می‌دهد در نتیجه نمو به مرحله بلاستوسیست را افزایش می‌دهد و اپوپتیوزیز در بلاستوسیست‌ها کاهش می‌یابد(۵،۱۸).

Spicer و همکاران در سال ۱۹۹۵ بیان کردند که در بسیاری از پستانداران انسولین تکثیر سلول‌های گرانولوزا و تولید پروژسترون و بهبود استروئیدوژنز سلول‌های جسم زرد را تحریک می‌کند(۱۵). Li و همکاران در سال ۲۰۰۵ بیان کردند که انسولین میزان تشکیل بلاستوسیست در زمان IVF اووسیت‌ها را افزایش می‌دهد و انسولین بلوغ اووسیتی و میوز رویانی را در شرایط آزمایشگاهی تحت تأثیر قرار می‌دهد. انسولین هم چنین سطح گلوتاتیون احیا شده (GSH) درون سلولی و فعالیت تیروزین کینازی در اووسیت در طی بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) را افزایش می‌دهد و نمورویانی را در دوره‌های IVC و IVP بهبود می‌بخشید (۱۲). در مطالعه حاضر هیچ گونه تأثیری معنی‌داری از انسولین، لپتین و مخلوط این دو هورمون بر درصد تسهیم، درصد بلاستوسیست اولیه، درصد اتساع بلاستوسیست، درصد تفریخ بلاستوسیست و درصد کل بلاستوسیست مشاهده نشد. و این نتایج با نتایج Li و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی انسولین Yong و همکاران در سال ۲۰۰۸، Boelhauve و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی لپتین متفاوت است. و علت این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت گونه‌ای های مورد آزمایش و تفاوت در روش های آزمایشگاهی، منشاء لپتین و انسولین مورد استفاده و هم چنین نحوه افزودن این دو هورمون می‌باشد در بیشتر مقالات این دو هورمون به محیط کشت IVM افزوده شده است در حالی که در این مطالعه این دو هورمون پس از انجام Siwm Up به اسپرم افزوده شد و پس از یک ساعت گرمخانه‌گذاری با HEPES SOF شسته شد و با اووسیت‌های بالغ شده مجاور شدند. در واقع هدف از این کار بررسی اثر این دو هورمون بر باروری اسپرم بود و دلیل عدم مشاهده تأثیر معنی‌دار این دو هورمون بر IVF می‌تواند ناشی از غلظت زیاد اسپرم در محیط باشد در این غلظت بالا احتمال وجود اسپرم‌های با باروری بالا در همه گروه زیاد است و همچنین امکان مجاورت کم این هورمون‌ها با اسپرم می‌باشد زیرا بیشترین اثر لپتین بر اسپرم در ۲۴۰ دقیقه و در مورد انسولین در ۱۲۰ دقیقه مشاهده شد در حالی که این دو هورمون تنها یک ساعت در مجاورت اسپرم‌ها قرار داشتند.

تشکر و قدردانی

از گروه محترم علوم دامی دانشگاه زنجان و پژوهشکده فناوری جنین دام دانشگاه شهرکرد به جهت فراهم آوردن امکان انجام این پژوهش و هم چنین از واحد اصلاح و پرورش گوسفند لری بختیاری شولی وابسته به جهاد کشاورزی که امکان تهیه نمونه را فراهم نمودند تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Ando, S., Aquila, S. (2005) Arguments raised by the recent discovery that insulin and leptin are expressed

in and secreted by human ejaculated spermatozoa. Mol. Cell. Endocrinol. 21: 245-246.

2. Aquila, S., Gentile, M.E., Middea, E., Catalano, S., Ando, S. (2005) Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. Endocrinology. 146: 552-557.
3. Aquila, S., Rago, V., Guido, C., Zupo, S., Casaburi, I., Carpino, A. (2008) Leptin and leptin receptor in pig spermatozoa:evidence of their involvement in sperm capacitation andsurvival. Reproduction. 136: 23-32.
4. Aquila, S., Gentileand, M., Middea, E. (2005) Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. J. Clin. Endocrinol. Metab. 90: 4753-61.
5. Boelhauve, M., Sinowatz, F., Wolf, E., Paula-Lopes, F.F. (2005) Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. Biol. Reprod. 73: 737-744.
6. Carpino, A., Rago, V., Guido, C., Casaburi, I., Aquila, S. (2009) Insulin and IR-b in pig spermatozoa: a role of the hormone in the acquisition of fertilizing ability. Int. J. Androl. 32: 1-9.
7. De Ambrogi, M., Spinaci, M., Galeati, G., Tamanini, C. (2007) Leptin receptor in boar spermatozoa. Int. J. Androl. 30: 458-561.
8. Giovambattista, A., Suescun, M.O., Nessralla, C.C., Franca, L.R., Spinedi, E., Calandra, R.S. (2003) Modulatory effects of leptin on Leydig cell function of normal and hyperleptinemic rats. J. Neuroendocrinol. 78: 270-279.
9. Jope, T., LanMert, A., Kratzsch, J., Paasch, U., Glander, H.J. (2003) Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. Int. J. Androl. 26: 335-341.
10. Lampiao, F., Du Plessis, S.S. (2008) Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction andnitric oxide production. Asian J. Androl. 10: 799-807.
11. Lampiao, F., Agarwal, A., Stefan, S.D. (2009) The role of insulin and leptin in male reproduction. Arch Med Sci. 5: 48-54.
12. Lee, M.S., Kang, S.K., Lee, B.C., Hwang, W.S. (2005) The beneficial effects of insulin and metformin on in vitro developmental potential of porcine oocytes and embryos. Biol. Reprod. 73: 1264-1268.
13. Li, H.W., Chiu, P.C., Cheung, M.P., Yeung, W.S., O., W.S. (2008) Effect of leptin on motility, capacitation and acrosome reaction of human spermatozoa. Int. J. Androl. 32: 687-94.
14. Perry, R.L., Naeeni, M., Barratt, C.L., Warren, M.A., Cooke, I.D. (1995) A time course study of capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa using a revised chlortetracycline pattern classification. Fertil. Steril. 64: 150-159.
15. Spicer, L.J., Echternkamp, S.E. (1995) The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. Dom. Anim. Endocrinol. 12: 223-245.
16. Squires, E.J. (2003) Applied Animal Endocrinology. Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph, CABI Publishing. Guelph, Ontario, Canada.
17. Throsby, M., Homo-Delarche, F., Chevenne, D., Goya, R., Dardenne, M., Pleau, J.M. (1998) Pancreatic hormone expression in the murine thymus: localization in dendritic cells and macrophages. Endocrinology. 139: 2399-2406.
18. Yong-Xun, J., Xiang-Shun, C., Young-Joon, H., Nam-Hyung, K. (2009) Leptin accelerates pronuclear formation following intra cytoplasmic sperm injection of porcine oocytes: Possible role for MAP kinase inactivation. Anim. Reprod. Sci. 115: 137-148.

Effect of insulin and leptin on ram sperm capacitation for in vitro embryo production

Riyahi, M.[1], Mirshokraei, P.[2,3*], Hassanpour, H.[2], Memarian, M.[1], Ahmadi, E.[2]

[1]*Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan-Iran.*

[2]*Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord-Iran.*

[3]*Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad-Iran.*

(Received 10 March 2012 , Accepted 23 May 2012)

Abstract:

BACKGROUND: Improvement of sperm quality as a research field in reproductive biotechnology of domestic animal can be considered as a key element for in vitro fertilization. **OBJECTIVES:** The aim of the present study was to investigate the effects of insulin and leptin on ovine sperm capacitation / acrosomal reaction, viability and fertilization. **METHODS:** The semen samples of 10 Bakhtiari rams were collected by artificial vagina. Using dose response study, the most efficient doses of insulin and leptin were chosen. Each sample was assigned to four experimental groups including insulin (1nM), leptin (100nM), mixed of leptin-insulin and control (without hormone). Sperm capacitation/acrosomal reaction, viability and fertilization were evaluated by chlortetracycline staining, eosin-negrosin and in-vitro fertilization methods, respectively. values were compared among groups by 1-way ANOVA. **RESULTS:** Values of capacitation/ acrosomal reaction rate showed significant increase in response to insulin and leptin at 30, 60 and 120 min time points. The sperm viability was significantly ($p<0.05$) increased in response to insulin when compared with the control group at 30 min time point, without any effect in the other time points. On the other hand, insulin and leptin did not show significant effect ($p>0.05$) on sperm fertilization. **CONCLUSIONS:** This study indicated that insulin and leptin improved ram sperm capacitation / acrosomal reaction and viability while their effects on in vitro embryo production were inconsiderable.

Key words: insulin, leptin, ram sperm, capacitation, in vitro fertilization.

Figure Legends and Tabel Captions

Table 1. Mean ± SEM of ram sperm capacitation, acrosomal reaction and viability at 1 mmol insulin, 100 mmol leptin and their combination during different time paints. Different letters show significant difference at each time at $p<0.05$.

Table 2. Number (percentage) of oocyte, cleaved, early blastocyst, expanded blastocyst, hatched blastocyst and total blastocyst embryo in the experimental groups.

***Corresponding author's email: mirshokraei@vet.sku.ac.ir, Tel: 0381-4424427, Fax: 0381-4424427**