الجسيمات الشحمية الحاوية على ATP و سكر الهكسوز وفعاليتها في تنشيط الحيوانات المنوية

الدكتور أنطون اللحام*

الملخص

إن الاهتمام بتنشيط الحيوانات المنوية في الزجاج In vitro (خارج الجسم) قد ازداد في السنوات الأخيرة، خاصة بعد الحصول على الكثير من المعلومات حول هذه الإمكانية، وكثيراً ما نجد أن استعمال هكسوزات الفركتوز أو الغلوكوز أو المانوز قد يساعد في الوصول إلى تنشيط نوعي خلال ١٥٠ دقيقة من إضافتها، إضافة إلى أن لوجود الأدنين Adenine دوراً ملحوظاً في زيادة حركة النطاف.

إن البحوث التي أجريناها حول استخدام الجسيمات الشحمية Liposomes الحاوية على الأدينوزين ثلاثي الفسفات (ATP) في إنقاذ الخلايا من التموت عند حدوث نقص تروية أو نقص في الأكسجة أو نقص في الطاقة الحيوية، دفعتنا لتسليط الضوء على إمكانية استخدام هذه الحويصلات لتنشيط الحيوانات المنوية ضعيفة الحركة من خلال قدرة الجسيمات الشحمية على حمل المواد الفعالة (ATP، الفركتوز، الغلوكوز، المانوز) واجتيازها الأغشية الحيوية.

لقد حصلنا على جسيمات شحمية تتمتع بتجانس جيد وأبعاد أقل من ٢٢٠ نانومتراً حيث يمكن تعقيمها من خلال مراشح جرثومية، وعلى ثباتية جيدة في وسط دارئة.

كذلك فقد استطاعت هذه الجسيمات تنشيط الحيوانات المنوية بنسب متغايرة (١٥ – ٣٠%) وفق تركيب هذه الجسيمات الشحمية، وما تحمله من مواد فعالة ولمدة تتجاوز ٥ ساعات.

A Liposomal ATP, Hexose sugar and its Effect in Spermatozoal Activity

* قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلية – كلية الصيدلة - جامعة دمشق.

Anton Lahham*

Abstract

Recently the interest in enhancement of the spermatozoal activity by some hexose sugar (Fructose, Glucose, Mannose) and ATP is highly increased in order to achieve a higher percentage of fertilization, particularly in vitro studies.

In our research we have used a uniform and a very small liposomes (less than 220 nm in dimensions), which contain the hexose sugars of the ATP to facilitate the activities of spermatazoa.

These liposomes may activate 15 – 30 % of the spermatozal population for a period of 5 hours.

* Dep. of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology – fac. of Pharmacy – Damascus University.

المقدمة

ما إن تتحرر النطفة sperm أو البيضة egg حتى يحكم عليهما بالموت خلال دقائق أو ساعات ما لم تجد كل منهما الأخرى وتندمج معها في عملية الإخصاب fertilization. فالنطفة خلية صغيرة مكتنزة عالية التخصص، تحتوي إنزيمات تساعد في اختراق غلاف البيضة الخارجي حتى تتمكن من القيام بمهمة إخصاب البيضة [1].

ونظراً لصغر حجم النطفة وافتقارها إلى المواد المغذية داخلاً فإنها تعتمد على سكر الفركتوز الموجود في السائل المنوي المحيط بها لتغذيتها وعلى الـ ATP لتسهيل حركتها الذاتية [2].

إضافة إلى ذلك فإنه يوجد نوعان من النطف، نوع يحمل الصبغي chromosome X وآخر يحمل الصبغي Y وبنسب متكافئة، وقد وجد أنَّ النطفة التي تحمل الصبغي X أكبر حجماً من النطفة Y ويحمل سطحها شحنة سالبة (صاعدة) anionic في حين يحمل سطح النطفة Y شحنة موجبة (هابطة) cationic.

من جهة أخرى، فإنه لا يخفى على أحد أنَّ للفركتوز fructose دوراً هاماً في الحفاظ على نشاط activity وحركة movement الحيوانات المنوية في السائل المنوي semen. ولكن وفي كثير من الأحيان لا يكون لهذه المادة دور فعال في إعطاء النشاط والحركة لهذه الحيوانات، وبهذا فإننا نلاحظ أن هنالك مستوى طبيعياً من الفركتوز مع نشاط متدنٍ للحيوانات المنوية.

إن الاهتمام بتنشيط الحيوانات المنوية في زجاج المختبر in vitro قد ازداد في السنوات الأخيرة وخاصة بعد الحصول على الكثير من المعلومات حول استخدام هكسوزات الفركتوز أو الغلوكوز أو المانوز [3,4,5] والتي قد تساعد في الوصول إلى تنشيط نوعي خلال الساعتين الأوليتين، إضافة إلى أن لوجود الأدنين Adenine دوراً ملحوظاً في زيادة حركة النطف [6,7,8,9].

غير أن أكثر الطرق المستخدمة لتنشيط حركة الحيوانات المنوية ضعيفة الحركة والتي تكون فيها نسبة الحيوانات النشطة ٤٠% أو أقل لم تعط نتيجة واضحة وصريحة ولم تؤت ثمارها بشكل مرضٍ [10,11,12,13]. وقد لجأ الكثير من الباحثين إلى استخدام تقانة التلقيح خارج الجسم (طفل الأنبوب) على الرغم من نسب النجاح المتفاوتة والعمل الدقيق الذي تؤدي به المهارة دوراً هاماً في الحصول على وضع طبيعي لإتمام عملية الحمل. ناهيك عن الخطر الكامن في انتقاء نطفة واحدة فقط، تتمتع ببنية سليمة وغير شاذة مورفولوجياً وصبغياً [14].

لهذا ومن خلال البحوث التي أجريناها حول استخدام الجسيمات الشحمية liposomes الحاوية على الادينوزين ثلاثي الفسفات ATP في إنقاذ خلايا الدماغ من الإقفار ischemia عند حدوث نقص تروية أو نقص في أكسجة oxygenation الدماغ [15,16,17]. وحالات نقص التروية القلبية الكاملة أو الجزئية والناجمة عن انسداد أو تضيق في الشرايين التاجية Coronary arteries وخلل كبير في الجهاز التنفسي أو أية أذية في الدماغ، الذي سيؤدي إلى نقص واضح وشديد في الطاقة الخلوية [18,19] ومن ثمَّ إلى إضعاف وموت الخلايا، هذه المعطيات دفعتنا لتسليط الضوء على إمكانية استخدام هذه الحُوَيْصِلات vesicles لتنشيط الحيوانات المنوية ضعيفة الحركة حيوياً من خلال قدرة الجسيمات الشحمية على حمل المواد الفعالة (ATP، الفركتوز، الغلوكوز، المانوز) وقدرتها على اجتياز الأغشية الحيوية لزيادة ورفع إمكانية الإخصاب fertilization (5, 6, 7, 10).

يهدف هذا البحث إلى استخدام جسيمات شحمية معتدلة neutral الشحنة أو ذات شحنة سالبة anionic أو موجبة cationic قادرة على حمل إحدى المواد الفعالة ذات الطاقة العالية (ATP، الفركتوز، الغلوكوز، المانوز) إلى ما وراء الغشاء الخلوي للحيوانات المنوية ضعيفة الحركة.

المواد والطرق

المواد

لتحضير جسيمات شحمية حاوية على مختلف المواد المدروسة فقد استخدمت المواد الآتية:

- فسفاتيديل كولين Phosphatidylcholine (Epikuron 200) (PL) من شركة (Lecithos, France).
- كولستيرول Cholesterol (Chol) من شركة (E. Merck, Darmstadt, Germany).
- ليبيدات شاردرية ionic : الستيارولامين Stearoylamine (SA) وهي تحمل شاردة موجبة cationic. وثنائي سيتيل فسفات Dicetylphosphate (DCP) وهي تحمل شاردة سالبة anionic.
- فركتوز ميمن D- Fructose، غلوكوز Glucose، مانوز ميمن D-mannose. جميع المواد السابقة من شركة (Sigma, St Louis, USA).
- الأدينوزين ثلاثي الفسفات 5'Adenosine triphosphate (ATP) من شركة (Boehringer Mannhein GmbH, Germany).
- الكلوروفورم Chloroforme، الميتانول Methanol، الدي ايتيل ايتر Diethyl ether من شركة (E. Merck, Darmstadt, Germany).

جميع المواد السابقة تتمتع بنقاوة صيدلانية pharmaceutical grade.

الطرق

- **السائل المنوي**

تم الحصول على عينات من السوائل المنوية المدروسة من مرضى كانوا قد راجعوا عيادات معالجة العقم بسبب عدم إنجابهم بعد فترة طويلة (٢ - ٥ سنوات) من زواجهم بسبب ضعف حركة الحيوانات المنوية لديهم.

يؤخذ السائل المنوي من المريض المتطوع ويترك لمدة ٣٠ - ٤٠ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م وفي جو من الهواء الحاوي ٥ % من غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2 لضمان إمَاعَة liquefaction، بعدها يغسل ثلاث مرات بـ ٥٠ ميلي مولاً (50 mM) من دارئة تريس كلورهيدرات Tris-HCl (pH = 7.4) تحتوي ١٣٨ ميلي مولاً كلورور الصوديوم NaCl و واحد ميلي مول كلورور المغنيزيوم $MgCl_2$، باستخدام التنبيذ centrifuation وبسرعة ٣٠٠٠ دورة بالدقيقة (800 x g). بحيث نحصل في النهاية على تركيز من السائل المنوي قدره ٢٠ × ١٠^{٦} / مل من الدرائة المستخدمة في الغسيل.

- **تحضير الجسيمات الشحمية**

الأساس النظري الذي تعتمد عليه طريقة تحضير الحويصلات الشحمية، هو الحصول على طبقة شحمية رقيقة، حيث تحل ثانية في مذيب solvent عضوي آخر، ثم تستحلب emulsify في دارئة buffer، وبالمزج السريع والقوي تتشكل الحويصلات الشحمية [15,20].

عملياً، تحل الشحميات الفسفورية المستعملة والكولستيرول والليبيدات الشاردية، ضمن نسب جزيئية ٧ / ٢ / ١ (٣١٥، ٩٠، ٤٥ مكرومولاً) في ٣٠ مل من مذيب عضوي (كلوروفورم وميتانول: ١/٤ حجم/حجم)، ثم يبخر المذيب الكلوروفورمي والميتانول في الخلاء، ضمن جهاز تبخير دوار، حتى نزع كامل آثار المذيبات العضوية. تعرض بعدها الطبقة الشحمية الرقيقة إلى تيار من غاز الآزوت، ومن ثم تحل ثانية بـ ٣ مل من مذيب عضوي آخر هو الدي اتيل ايتر، ويضاف إلى الحلالة مزيج دارئة تريس (٠,٠١ مول ، pH = 7.4)، والعنصر الفعال (الـ د- فركتوز، الغلوكوز، الـ د- مانوز أو الـ ATP (٥٠

مكرومولاً / مل لكل منها)، بحيث تكون نسبة الطور العضوي إلى الطور المائي ١/٥. يخضع بعدها المحضر لتأثير الأمواج فوق الصوتية ultrasonic لمدة خمس دقائق (باستطاعة ٢٠٠ واط)، حيث يتم الحصول على مستحلب emulsion زيت في ماء، يجانس المستحلب بمساعدة مجانس كهربائي ultra-turax سريع (١٥٠٠٠ دورة / دقيقة)، حيث تتشكل الجسيمات الشحمية في أثناء الدقائق الأولى من المزج بعد انقلاب الأطوار داخلياً، يستمر المزج لمدة خمس دقائق، ومن ثم تنزع آثار المذيب العضوي بواسطة التبخير بجهاز تبخير دوار.

يمكن تحديد أبعاد الجسيمات الشحمية المستخدمة، من خلال دفع المستحلب عبر مرشحة مساميتها ٢٢٠ نانومتراً، باستخدام تقانة الترشيح الفائق ultrafiltration.

تحدد كمية المواد الفعالة المحفوظة encapsulated داخل الحويصلات، بعد فصلها عن التي بقيت خارج الحويصلات (غير المحفوظة non encapsulated)، وذلك بدفع واحد مليلتر من مستحلب الجسيمات الشحمية من خلال عمود فصل (١,٦×٢٠ سم) يحوي هلامة السيفادكس ج ٥٠ (Sephadex G 50 gros) (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) ومن ثم يؤخذ ١٠ مل من الرشاحة الحاوية مجمل الحويصلات الحاملة للمواد الفعالة، حيث يتم التعرف عليها عن طريق المقايسة assay الكيميائية للرشاحة بواسطة مقياس الطيف الضوئي spectrophotometer وبموجة طولها ٢٨٠ نانومتراً.

تتم مقايسة المواد الفعالة المحفوظة داخل الجسيمات الشحمية بعد أن يضاف إليها ٢٠ مكرولتراً من التريتون × ١٠٠ إلى ١ مل من الرشاحة الحاوية على الحويصلات الحافظة للمواد الفعالة.

- **تأثير الجسيمات الشحمية في فعالية الحيوانات المنوية**

لدراسة تأثير الجسيمات الشحمية الحافظة للمواد الفعالة المدروسة في نطف السوائل المنوية المذكورة أعلاه، تم العمل وفق المخطط الآتي ومن خلال استخدام:

١- سائل منوي (شاهد).
٢- سائل منوي أضيفت إليه مادة فعالة حرة (٥ مكرومول من المادة الفعالة المدروسة / ١ مل من السائل المنوي).
٣- سائل منوي أضيفت إليه جسيمات شحمية بيضاء (لا تحوي على مادة فعالة).
٤- سائل منوي أضيفت إليه جسيمات شحمية (معتدلة الشحنة، أو تحمل شحنة هابطية، أو شحنة صاعدية) تحوي مادة فعالة (٥ مكرومول من المادة الفعالة / ١ مل من السائل المنوي).

تدرس حركة، وسرعة، ونشاط الحيوانات المنوية المحضونة بعد إمَاعَة liquefaction السائل المنوي، بعد ٣٠، ٦٠، ١٢٠، ١٨٠، ٢٤٠ دقيقة من المعالجة السابقة.

النتائج والمناقشة

يبيّن الجدول ١، نتائج فحص السوائل المنوية للمرضى والتي عُدَّتْ شواهد للعينات المدروسة بعد ساعة من زمن الحصول عليها. ولقد تم تقسيم نتائج الدراسة وفق ثلاث فئات:

١- **الفئة I:** تضم المرضى الذين لديهم نسبة من الحيوانات المنوية عديمة وضعيفة الحركة أكثر من ٨٥ %، ونسبة حيوانات نشيطة تساوي أو أقل من ١٥%.
٢- **الفئة II:** تضم المرضى الذين تكون لديهم الحيوانات المنوية عديمة وضعيفة الحركة محصورة بين ٧٠ – ٨٠ %، ونسبة حيوانات نشيطة بين ٢٠ و ٣٠ %.
٣- **الفئة III:** تضم المرضى الذين لديهم أقل من ٧٠ % حيوانات منوية عديمة وضعيفة الحركة، وأكثر من ٣٥ % حيوانات نشيطة.

بعد حضن السائل المنوي وفق المخطط السابق تبيّن أن هنالك تحسناً ملحوظاً في حركة ونشاط

الحيوانات المنوية عديمة وضعيفة الحركة، بمقدار ٢٥% بعد ٢٤٠ دقيقة من حضنها، عند إضافة جسيمات شحمية مشحونة هابطياً أو صاعدياً، وتحفظ بداخلها الفركتوز، عما هي عليه في السائل المنوي الشاهد أو السائل المنوي مع جسيمات شحمية بيضاء، وقد تبيّن أيضاً أن زيادة الفركتوز بحالته الحرة (دون حفظ) لم يغير من فعالية ونشاط الحيوانات المنوية. وقد تبين أيضاً أن الجسيمات الشحمية معتدلة الشحنة لم تزد من نشاط الحيوانات المنوية إلا بنسبة ١٥% بعد ٢٤٠ دقيقة من حضنها، الجدول ٢، والشكل ١. مع العلم أن الخطأ المعياري Standard Error (S. E.) لجميع القيم المدونة في الجداول هو ٢%.

في حين أنه عند حضن السائل المنوي مع جسيمات شحمية مشحونة هابطياً أو صاعدياً وتحفظ بداخلها الغلوكوز، لم تستطع أن تحسن حركة ونشاط الحيوانات المنوية عديمة وضعيفة الحركة، إلا بنسبة ٢٠% بعد ٢٤٠ دقيقة من حضنها، مقارنة بالشواهد، وقد تبيّن أيضاً أن زيادة الغلوكوز بحالته الحرة (دون حفظ) لم يغير من فعالية ونشاط الحيوانات المنوية. وتبيّن أن الجسيمات الشحمية معتدلة الشحنة لم تزد من نشاط الحيوانات المنوية إلا بنسبة ١٥% بعد ٢٤٠ دقيقة من حضنها، الجدول ٣، والشكل ٢.

الجدول ١: نتائج فحص السوائل المنوية للمرضى المتطوعين بعد ساعة من زمن الحصول عليها

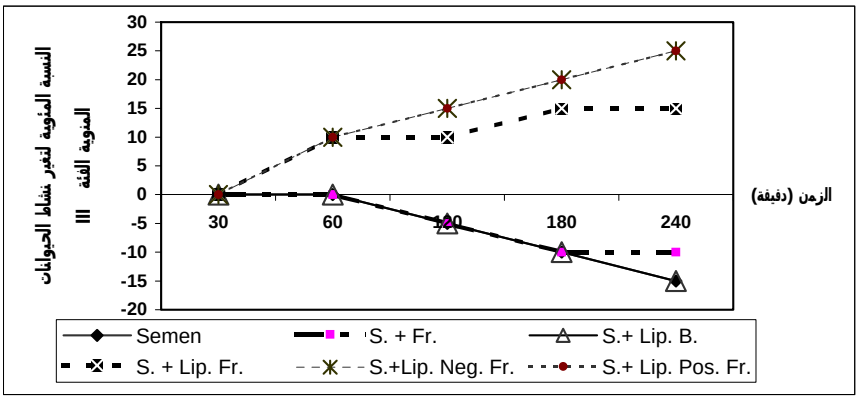
المريض	حجم السائل المنوي	زمن الإماعة (دقيقة)	عدد الكريات البيض / بالساحة	عدد الحيوانات المنوية / مل × ١٠٠٠	% للأشكال الشاذة	النسبة المئوية للحيوانات المنوية		
						عديمة الحركة	ضعيفة الحركة	نشيطة الحركة
١	٢,٧	٣٠	٦-٨	٣٠٠	٢	٨٥	٥	١٠
٢	٢,٨	٤٥	١٢-١٨	٧٦٠٠	٤	٨٠	١٠	١٠
٣	٣,٢	٦٠	١٥-٢٠	٧٤٠	٣	٨٠	٥	١٥
٤	٣,٤	١٥	٣-٥	٨٣٥٠	٦	٧٥	١٠	١٥
٥	١,٨	١٥	١٥-٢٠	٩٠٠٠	٦	٧٠	١٠	٢٠
٦	٣,٧	١٥	٦-٨	١٥٥٠٠	٣	٧٠	١٠	٢٠
٧	٢,٦	٢٠	٤-٦	١١٢٠٠٠	٤	٦٥	١٥	٢٠
٨	٥,٢	٢٠	٤-٦	٦٦٤٠٠	٥	٦٠	١٥	٢٥
٩	١,٧	٦٠	٨-١٠	١٣٤٠٠٠	٦	٦٠	١٠	٣٠
١٠	٥,٧	١٥	٤-٦	١١٨٠٠	٤	٦٠	١٠	٣٠
١١	٣,٤	٣٠	٣-٥	١٨٠٠٠	٢	٦٠	١٠	٣٠
١٢	١,٣	٦٠	٨-١٠	٢٥٣٠٠	٤	٦٠	١٠	٣٠
١٣	٥,٢	٣٠	٥-٧	٤٢٠٠٠	٥	٦٠	١٠	٣٠

١٤	٥,٩	١٥	٥-٣	١١٨٠٠٠	٤	٥٥	١٠	٣٥
١٥	١,١	١٥	٧-٥	١٤٧٥٠	٣	٥٠	١٠	٤٠
١٦	١,١	١٥	٤-٢	١٥٧٠٠	٢	٥٠	١٠	٤٠
١٧	٤,٨	٣٠	٥-٣	٤١٥٠	٢	٥٠	١٠	٤٠
١٨	٢,٤	١٥	٤-٢	٦٢٠٠٠	٣	٥٠	١٠	٤٠
١٩	٣,٢	٣٠	٨-٦	١٠٨٠٠٠	٤	٥٠	١٠	٤٠
٢٠	٣,٨	٣٠	٦-٤	٧٥٨٠٠	٦	٥٠	١٠	٤٠

الجدول ٢: النسبة المئوية لتغير نشاط الحيوانات المنوية في الزجاج in vitro للسوائل المنوية للمرضى بدلالة الزمن، ووفق الفئات المدروسة باستخدام د-فركتوز.

المعالجة		النسبة المئوية لتغير نشاط الحيوانات المنوية بدلالة الزمن (دقيقة)				
		٣٠	٦٠	١٢٠	١٨٠	٢٤٠
سائل منوي (شاهد)	الفئة I	NS	NS	-٥ %	-٧ %	-١٠ %
	الفئة II	NS	NS	-٥ %	-٧ %	-١٥ %
	الفئة III	NS	NS	-٥ %	-١٠ %	-١٥ %
سائل منوي + ٥ مكرومول د-فركتوز / ١ مل سائل منوي	الفئة I	NS	NS	-٥ %	-٧ %	-١٠ %
	الفئة II	NS	NS	-٥ %	-٧ %	-١٠ %
	الفئة III	NS	NS	-٥ %	-١٠ %	-١٠ %
سائل منوي + جسيمات شحمية بيضاء	الفئة I	NS	NS	-٥ %	-٧ %	-١٠ %
	الفئة II	NS	NS	-٥ %	-٧ %	-١٥ %
	الفئة III	NS	NS	-٥ %	-١٠ %	-١٥ %
سائل منوي + جسيمات شحمية معتدلة ممحفظة د-فركتوز	الفئة I	NS	+٥ %	+٥ %	+١٠ %	+١٠ %
	الفئة II	NS	+٥ %	+٥ %	+١٠ %	+١٠ %
	الفئة III	NS	+١٠ %	+١٠ %	+١٥ %	+١٥ %

سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة سالبة ممحفظة د-فركتوز	الفئة I	NS	+٥ %	+٥ %	+١٠ %	+١٠ %
	الفئة II	NS	+٥ %	+٥ %	+١٠ %	+١٥ %
	الفئة III	NS	+١٠ %	+١٥ %	+٢٠ %	+٢٥ %
سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة موجبة ممحفظة د-فركتوز	الفئة I	NS	+٥ %	+٥ %	+١٠ %	+١٠ %
	الفئة II	NS	+٥ %	+٥ %	+١٠ %	+١٥ %
	الفئة III	NS	+١٠ %	+١٥ %	+٢٠ %	+٢٥ %



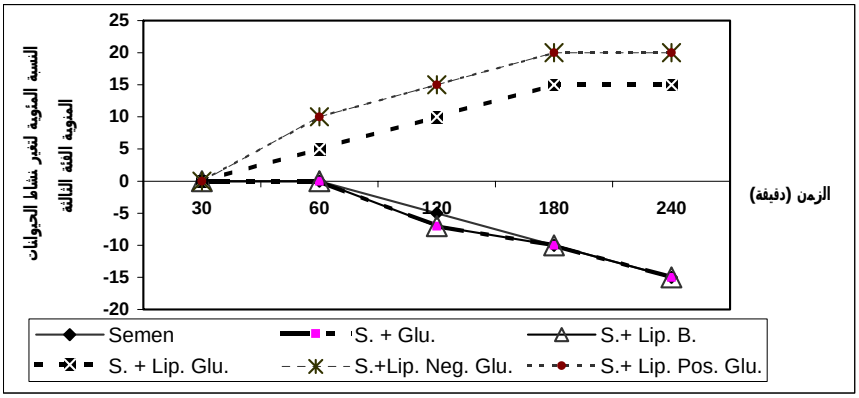
الشكل ١: تغير نشاط الحيوانات المنوية في الزجاج in vitro للسوائل المنوية لمرضى الفئة الثالثة باستخدام د-فركتوز

S. + Fr. = سائل منوي + د-فركتوز S. + Lip. B. = سائل منوي + جسيمات شحمية بيضاء

S. + Lip. Fr. = سائل منوي + جسيمات شحمية ممحفظة د-فركتوز

S. + Lip. Neg. Fr. = سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة سالبة ممحفظة د-فركتوز

S. + Lip. Pos. Fr. = سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة موجبة ممحفظة د-فركتوز



الشكل ٢: تغير نشاط الحيوانات المنوية في الزجاج in vitro للسوائل المنوية لمرضى الفئة الثالثة باستخدام الغلوكوز

S. + Glu. = سائل منوي + غلوكوز S. + Lip. B. = سائل منوي + جسيمات شحمية بيضاء

S. + Lip. Glu. = سائل منوي + جسيمات شحمية ممحفظة غلوكوز

S. + Lip. Neg. Glu. = سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة سالبة ممحفظة غلوكوز

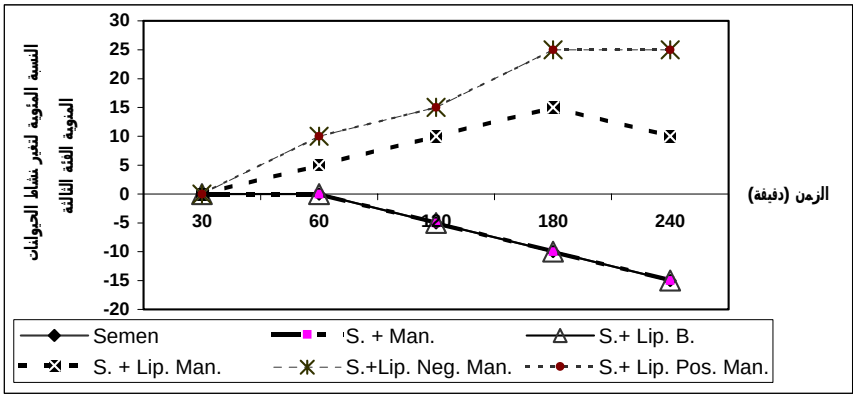
S. + Lip. Pos. Glu. = سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة موجبة ممحفظة غلوكوز

الجدول ٣: النسبة المئوية لتغير نشاط الحيوانات المنوية في الزجاج in vitro للسوائل المنوية للمرضى بدلالة الزمن، ووفق الفئات المدروسة باستخدام الغلوكوز.

المعالجة		النسبة المئوية لتغير نشاط الحيوانات المنوية بدلالة الزمن (دقيقة)				
		٣٠	٦٠	١٢٠	١٨٠	٢٤٠
سائل منوي (شاهد)	الفئة I	NS	NS	٥- %	٧- %	١٠- %
	الفئة II	NS	NS	٥- %	٧- %	١٥- %
	الفئة III	NS	NS	٥- %	١٠- %	١٥- %
سائل منوي + ٥ مكرومول غلوكوز / ١ مل سائل منوي	الفئة I	NS	NS	٥- %	٧- %	١٠- %
	الفئة II	NS	NS	٥- %	٧- %	١٠- %
	الفئة III	NS	NS	٧- %	١٠- %	١٥- %
سائل منوي + جسيمات شحمية بيضاء	الفئة I	NS	NS	٥- %	٧- %	١٠- %
	الفئة II	NS	NS	٥- %	٧- %	١٥- %
	الفئة III	NS	NS	٧- %	١٠- %	١٥- %
سائل منوي + جسيمات شحمية معتدلة ممحفظة غلوكوز	الفئة I	NS	٥+ %	٥+ %	١٠+ %	١٠+ %
	الفئة II	NS	٥+ %	٥+ %	١٠+ %	١٠+ %
	الفئة III	NS	٥+ %	١٠+ %	١٠+ %	١٥+ %
سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة سالبة ممحفظة غلوكوز	الفئة I	NS	٥+ %	٥+ %	١٠+ %	١٠+ %
	الفئة II	NS	٥+ %	٥+ %	١٠+ %	١٥+ %
	الفئة III	NS	١٠+ %	١٥+ %	٢٠+ %	٢٠+ %

سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة موجبة ممحفظة غلوكوز	الفئة I	NS	+٥ %	+٥ %	+١٠ %	+١٠ %
	الفئة II	NS	+٥ %	+٥ %	+١٠ %	+١٥ %
	الفئة III	NS	+١٠ %	+١٥ %	+٢٠ %	+٢٠ %

أما عند حضن السائل المنوي مع جسيمات شحمية مشحونة هابطياً أو صاعدياً وتحفظ بداخلها المانوز، فقد تحسنت حركة ونشاط الحيوانات المنوية عديمة وضعيفة الحركة بنسبة ٢٥% بعد ٢٤٠ دقيقة من حضنها، مقارنة بالشواهد، وتوضح أن زيادة المانوز بحالته الحرة (دون حفظ) لم يغير من فعالية ونشاط الحيوانات المنوية. وأظهر أن الجسيمات الشحمية معتدلة الشحنة لم تزد من نشاط الحيوانات المنوية إلا بنسبة ١٥% بعد ٢٤٠ دقيقة من حضنها، الجدول ٤، والشكل ٣.



الشكل ٣: تغير نشاط الحيوانات المنوية في الزجاج in vitro للسوائل المنوية لمرضى الفئة الثالثة باستخدام د-مانوز

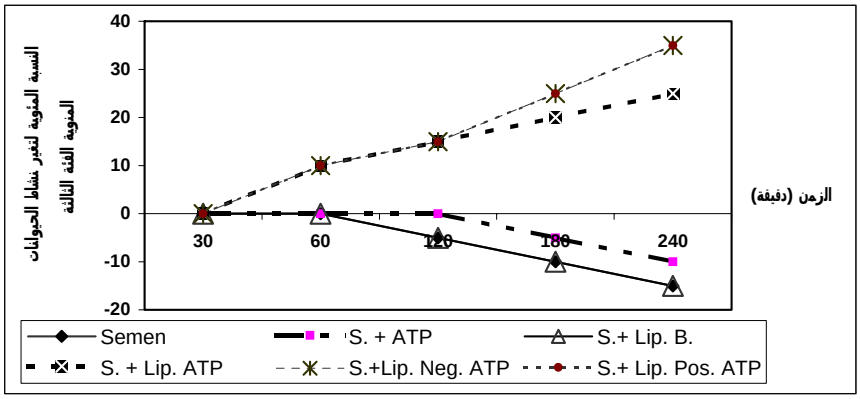
S. + Man. = سائل منوي + د-مانوز
S. + Lip. B. = سائل منوي + جسيمات شحمية بيضاء
S. + Lip. Man. = سائل منوي + جسيمات شحمية ممحفظة د-مانوز
S. + Lip. Neg. Man. = سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة سالبة ممحفظة د-مانوز
S. + Lip. Pos. Man. = سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة موجبة ممحفظة د-مانوز

الجدول ٤: النسبة المئوية لتغير نشاط الحيوانات المنوية في الزجاج in vitro للسوائل المنوية للمرضى بدلالة الزمن، ووفق الفئات المدروسة باستخدام د-مانوز.

المعالجة		النسبة المئوية لتغير نشاط الحيوانات المنوية بدلالة الزمن (دقيقة)				
		٣٠	٦٠	١٢٠	١٨٠	٢٤٠
سائل منوي (شاهد)	الفئة I	NS	NS	٥- %	٧- %	١٠- %
	الفئة II	NS	NS	٥- %	٧- %	١٥- %
	الفئة III	NS	NS	٥- %	١٠- %	١٥- %
سائل منوي + ٥ مكرومول د-مانوز / ١ مل سائل منوي	الفئة I	NS	NS	٥- %	٧- %	١٠- %
	الفئة II	NS	NS	٥- %	٧- %	١٥- %
	الفئة III	NS	NS	٥- %	١٠- %	١٥- %
سائل منوي + جسيمات شحمية بيضاء	الفئة I	NS	NS	٥- %	٧- %	١٠- %
	الفئة II	NS	NS	٥- %	٧- %	١٥- %
	الفئة III	NS	NS	٥- %	١٠- %	١٥- %
سائل منوي + جسيمات شحمية معتدلة ممحفظة د-مانوز	الفئة I	NS	٥+ %	٥+ %	١٠+ %	٥+ %
	الفئة II	NS	٥+ %	٥+ %	١٠+ %	١٠+ %
	الفئة III	NS	٥+ %	١٠+ %	١٥+ %	١٥+ %
سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة سالبة ممحفظة د-مانوز	الفئة I	NS	٥+ %	٥+ %	١٠+ %	١٠+ %
	الفئة II	NS	٥+ %	٥+ %	١٠+ %	١٥+ %
	الفئة III	NS	١٠+ %	١٥+ %	٢٥+ %	٢٥+ %

سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة موجبة محفظة د-مانوز	الفئة I	NS	٥+ %	٥+ %	١٠+ %	١٠+ %
	الفئة II	NS	٥+ %	٥+ %	١٠+ %	١٥+ %
	الفئة III	NS	١٠+ %	١٥+ %	٢٥+ %	٢٥+ %

أما عند حضن السائل المنوي مع جسيمات شحمية مشحونة هابطياً أو صاعدياً وتحفظ بداخلها ATP، فقد أعطت حركة ونشاطاً للحيوانات المنوية عديمة وضعيفة الحركة أكثر مما أعطته المجموعات السابقة، فقد ازداد نشاط الحيوانات المنوية بنسبة ٣٥% بعد ٢٤٠ دقيقة من حضنها، مقارنة بالشواهد، وقد تبيّن أيضاً أن زيادة الـ ATP بحالته الحرة (دون حفظ) لم يغير من فعالية ونشاط الحيوانات المنوية ، إنما أخر من توقف حركتها، وقد تبين أيضاً أن الجسيمات الشحمية معتدلة الشحنة لم تزد من نشاط الحيوانات المنوية إلا بنسبة ٢٥% بعد ٢٤٠ دقيقة من حضنها، الجدول ٥، والشكل ٤.



الشكل ٤ : تغير نشاط الحيوانات المنوية في الزجاج in vitro للسوائل المنوية لمرضى الفئة الثالثة باستخدام ATP.

S. + ATP = سائل منوي + A.T.P.

S. + Lip. B. = سائل منوي + جسيمات شحمية بيضاء

S. + Lip. ATP = سائل منوي + جسيمات شحمية محفظة A.T.P.

S. + Lip. Neg. ATP = سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة سالبة محفظة A.T.P.

S. + Lip. Pos. ATP = سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة موجبة محفظة A.T.P.

الجدول ٥: النسبة المئوية لتغير نشاط الحيوانات المنوية في الزجاج in vitro للسوائل المنوية للمرضى بدلالة الزمن ووفق الفئات المدروسة باستخدام الـ A.T.P.

المعالجة		النسبة المئوية لتغير نشاط الحيوانات المنوية بدلالة الزمن (دقيقة)				
		٣٠	٦٠	١٢٠	١٨٠	٢٤٠
سائل منوي (شاهد)	الفئة I	NS	NS	٥- %	٧- %	١٠- %
	الفئة II	NS	NS	٥- %	٧- %	١٥- %
	الفئة III	NS	NS	٥- %	١٠- %	١٥- %
سائل منوي + ٥ مكرومول A.T.P. / ١ مل سائل منوي	الفئة I	NS	NS	NS	٥- %	٧- %
	الفئة II	NS	NS	NS	٥- %	٧- %
	الفئة III	NS	NS	NS	٥- %	٥- %
سائل منوي + جسيمات شحمية بيضاء	الفئة I	NS	NS	٥- %	٧- %	١٠- %
	الفئة II	NS	NS	٥- %	٧- %	١٥- %
	الفئة III	NS	NS	٥- %	١٠- %	١٥- %
سائل منوي + جسيمات شحمية معتدلة ممحفظة A.T.P.	الفئة I	NS	٥+ %	٥+ %	١٠+ %	١٥+ %
	الفئة II	NS	٥+ %	١٠+ %	١٥+ %	٢٠+ %
	الفئة III	NS	١٠+ %	١٥+ %	٢٠+ %	٢٥+ %
سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة سالبة ممحفظة A.T.P.	الفئة I	NS	٥+ %	٥+ %	١٠+ %	١٥+ %
	الفئة II	NS	١٠+ %	١٥+ %	٢٠+ %	٢٥+ %
	الفئة III	NS	١٠+ %	١٥+ %	٢٥+ %	٣٥+ %
سائل منوي + جسيمات شحمية بشاردة موجبة	الفئة I	NS	٥+ %	٥+ %	١٠+ %	١٥+ %

ممحفظة A.T.P.	الفئة II	NS	% ٥+	% ١٥+	% ٢٠+	٢٥+ %
	الفئة III	NS	١٠+ %	% ١٥+	% ٢٥+	٣٥+ %

المناقشة

إن تفعيل النطفة هو خطوة حدية في الإخصاب، ولهذه الغاية من الضروري الحصول على عوامل قادرة على إعطاء الطاقة الضرورية لهذا التفعيل، لتلافي الخلل في قدرة الحيوانات المنوية على الحركة والنشاط إن وجد.

في هذه الدراسة تم استخدام جسيمات شحمية كعوامل حاملة لهذه المواد، مؤلفة من فسفاتيديل كولين (Epikuron 200) وكولستيرول وعوامل ذات شحنة هابطية أو صاعدية، أما المواد الفعالة المستخدمة فكانت موادَّ قادرة على إعطاء الطاقة الضرورية لحياة النطفة (الغلوكوز، الفركتوز، المانوز أو الـ A.T.P.). وقد وجدنا تبايناً في الأهمية التي تقدمها هذه المواد للحيوانات المنوية، وأيضاً عند اختلاف تركيب الجسيمات الشحمية (معتدلة الشحنة والهابطية أو الصاعدية)، وقد يكون للشحنات الكهربائية التي تحملها الحيوانات المنوية دور في تفعيلها، وهذا ما أكده Garrett ورفاقه [21]، حيث أشاروا إلى أن لشوارد الكلسيوم والمغنيزيوم دوراً محرضاً لتفعيل النطاف. وأظهر تبايناً بين تأثير كل نوع من الجسيمات الشحمية على الفئات المدروسة من المرضى، حيث كانت النتائج أكثر أهمية مع الفئة الثالثة منها مع باقي الفئات. وربما يعود ذلك إلى قدرة الحيوانات المنوية في الفئة الثالثة على التقاط الجسيمات الشحمية والاستفادة من محتواها (الغلوكوز، الفركتوز، المانوز أو الـ A.T.P.)، وهذا ما أكدته أعمال مختلفة كانت قد استعملت أنواعاً مختلفةً من الفسفوليبيدات، من خلال طرق تحضير غير التي استخدمناها في هذا العمل [22,23].

إن استخدام تحليل الحركة بالاستعانة بالحاسوب Computer-assisted motion (CASA) analysis وتحديد سرعة الحيوانات المنوية بالدقيقة (سم/دقيقة)، والمسافة التي يمكن أن تقطعها النطفة، من خلال رصد الاتجاه الذي تسلكه، والمسافة التي تقطعها مقدَّرة بالدقيقة، وتقدير عدد حركات الذيل بالدقيقة، كل ذلك له أهميته في تحديد فعالية النطاف، لأن لزوجة السائل المنوي تؤدي دوراً هاماً في هذه الفعالية، وفي تأخر وصول النطفة إلى البيضة الهدف، فرصد حركات الذيل ومعرفة عدد النطاف النشيطة أو الضعيفة يعطي فكرة عن مدى فعالية هذه النطاف، ومن ثمَّ إمكانية حدوث الإخصاب، لتحديد ذلك وكما أشرنا سابقاً فمن الضروري استخدام (CASA) لتحديد جميع هذه المتطلبات [24].

المصادر

1-Wassarman P. M. and Mortillo S. Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida *Int. Rev. Cytol.,* 130, 85-110, 1991.

2-Bruce A., Dennis B., Julian L., Martin R., Keith R. and James D. W. Molecular biology of The cell. (third edition). *Garland Publishing, Inc.,* New York & London, 1024-1035, 1994.

3-Mori K., Daitoh T., Kamada M., Maeda N., Maegawa M., Hirano K., Irahara M. and Aono T. Blocking of human fertilization by carbohydrates. *Hum. Repord.,* 8 (10): 1729-1732, 1993.

4-Cohen-Bacrie P. Biochemical examinations of human sperm. *Cotracept Fertil Sex*. 21 (12): 891-892, 1993.

5-Arts E. G., Jager S. and Hoekestra D. Evidence for the existence of lipid-diffusion barriers in the equatorial segement of human spermatozoa . *Biochem J.,* 15, 304 (1): 211-218, 1994.

6-Gonzales G. F. Corrected seminal fructose test . *Arch Androl.,* 33 (1): 17-22, 1994.

7-Swanson W. J. and Vacquier V. D. Extraordinary divergence and positive Darwinian selection in a fusagenic protein coating the acrosomal process of abalone spermatozoa . *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 23, 92 (11): 4957-4961. 1995.

8-Balmelli T., Stamm J., Dolina - Giudici M., Peduzzi R., Piffaretti-Yanez A. and Balerna M. Bacteroides ureolyticus in men consulting for infertility. *Andrologia,* 26 (1): 35-38, 1994.

9-Fazano F., Butmeister M. L., De Lucio M. A., Bottcher Luiz F., Neves P. A. and Bahamondes L. Correlation between hypo-osmotic swelling test and water test to assess human sperm membrane integrity. *Andrologia,* 25 (6): 351-353, 1993.

10-Chan S. Y., Pearlstone A., Uhler M., Tucker M., Greenspoon R., Leung A. and Wang C. Human spermatozoal tail hypo-osmotic swelling test, motility characteristics in hypotonic saline , and survival of spermatozoa after cryopreservation . *Hum Reprod*., 8 (5): 717-721,

1993.

11-Fabiani R., Johansson L., Lundkvist O. and Ronquist G. Prolongation and improvement of prostasome promotive effect on sperm forward motility. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.,* 58 (5): 191-198, 1995.

12-Wolff H., Molele T., Bezold G., Bollmann W., bruckner T., Noss U. and Meurer M. Andrologic variables for in vitro fertilization. *Hautarzt.,* 45 (9): 605-610, 1994.

13-Puisieux F., Fattal E., Lahiani M., Auger J., Jouannet P., Couvreur P. and Delattre J. Liposomes, an interesting tool to deliver a bioenergetic substrate (ATP). in vitro and in vivo studies. *J. Drug Target,* 2 (5): 443-448, 1994.

14-Simpson J. L. and Elias S. Fetal cells in maternal blood: Prospects for noninvasive prenatal diagnosis. *Annals of the New York Academy of Sciences,* Vol. 731, 1994.

15-Laham A., Claperon N., Durussel J. J., Fattal E., Delattre J., Puisieux F., Couvreur P. and Rossignol P. Liposomally - entrapped A.T.P.: Improved efficiency against experimental brain ischemia in the rat . *Life Sciences*, 40, 2011-2016, 1987.

16-Laham A., Claperon N., Durussel J. J., Fattal E., Delattre J., Puisieux F., Couvreur P. and Rossignol P. Intracarotidal administration of liposomally-entrapped A.T.P.: Improved efficiency against experimental brain ischemia. *Pharmacological Research Communication*, 20, 8, 699-705, 1988.

17-Couvreur P., Laham A., Chapat S., Frey V., Claperon N., Puisieux F., Rossignol P. and Delattre J. A proposed mechanism for efficiency of liposomal A.T.P. in experimental cerebral ischemia. Controlled Release Society, Inc. *Proced. Intern. Symp. control. rel. Bioact. Mater.,* 18, 1991.

18-Puisieux F. Les liposmes *Editions lavoisier*, 467-560, 1985.

19-Ostro M. Les liposomes *Pour la science,* 76-87, 1987.

20-Laham A., Delattre J., Couvreur P., Rossignol P., Claperon N. et puisieux F. Liposomes de triphosphate d`adenosine (A.T.P.); description d`un mode original de preparation et caracterisation physico-chimique des vesicules obtenues. *S. T. P. Pharma.,* 6, 10, 716

-722, 1990.

21-Garrett F. E., Goel S., Yasul J. and Koch R. A. Liposomes fuse with sperm cells and induce activation by delivery of impermeant agents. *Biochim. Biophys. Acta.*, 4; 1417 (1): 77-88. 1999.

22-Wilhelm K. M., Graham J. K. and Squires E. L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. *Cryobiology*, 33 (3): 320-329, 1996.

23-Skiba-Lahiani M., Auger J., Terribile J., Fattal E., Delattre J., Puisieux F., Jouannet P. Stimulation of movement and acrosome reaction of human spermatozoa by PC12 liposomes encapsulating ATP. *Int J Androl* 1995 Dec;18(6):287-94

24-LAHAM A. and Al-QUOBAILI F. New Prospective for Entrapped Active Materials in Spermatozoa to Increase it's Activity and Motility In Vitro. The 37th Science week of the Supreme Council of sciences, Syria, 1997.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق: ٢٠٠٠/١٢/٤.
تاريخ قبوله للنشر: ٢٠٠١/٤/٢٥.