تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سیتریک بر الگوی حرکتی اسپرم‌های اپیدیدیمی گاو در محیط Hams F10

کیوان عبدی[1*]، پرویز تاجیک[2]، حمید قاسم‌زاده نوا[2]، امیرعلی کاوه[3]، پژمان میرشکرایی[4]

۱. دانش آموخته مامایی و بیماری‌های تولید مثل دامپزشکی، دانشکدهٔ علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
۴. گروه علوم درمانگاهی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: *keivanabdi@yahoo.com*
(دریافت مقاله:۸۷/۸/۹ ، پذیرش نهایی:۸۷/۱۰/۳۰)

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثرات سه غلظت اسید سیتریک بر الگوی حرکتی اسپرم‌های اپیدیدیمی گاو بوده است. برای این‌کار ۵۰ جفت بیضهٔ گاو از کشتارگاه صنعتی ارومیه بلافاصله بعد از کشتار جمع‌آوری و در کنار یخ ۵ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه انتقال داده شد. اسپرم‌های ناحیهٔ دم اپیدیدیم با چند برش در ناحیهٔ بدون رگ آن جمع‌آوری و به محیط Hams F10 با ۱۰٪ سرم گوسالهٔ جنینی و دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انتقال و پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در انکوباتور CO_2 شمارش گردید و رقت‌های ۵۰ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر آماده و در محدودهٔ pH نرمال اسپرم (۶/۷ الی ۷/۴) سه غلظت اسید سیتریک ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ نرمال (غلظت ۱ نرمال اسید سیتریک، ۷ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر مایع منی گاو است) تهیّه شد و به اپندورف‌های حاوی اسپرم اضافه گردید و در دقایق ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰ و ۳۶۰ الگوی حرکتی اسپرم‌های اپیدیدیمی با روش کاسا ارزیابی شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۵ و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، آنالیز گردید. نتایج نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار شاخصه‌های مختلف الگوی حرکت اسپرمی (سرعت خط منحنی، سرعت خط مستقیم ، خطی بودن، درصد حرکت رو به جلو) خصوصاً در غلظت ۰/۳ نرمال در مقایسه با شاهد بود ($p<0/05$).

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۷، دوره ۲، شماره ۳، ۲۳۹-۲۱۷.

کلمات کلیدی: اسپرم اپیدیدیمی، گاو، اسید سیتریک، CASA، محیط Hams F10

مقدمه

استفاده از اسپرم‌های اپیدیدیمی در برخی موارد تنها منبع به‌دست آوردن اسپرم زنده می‌باشد، خصوصاً در مواردی که امکان تهیّهٔ اسپرم از طریق انزال مقدور نباشد و یا در مواردی‌که دام‌های نر با ارزش، با پتانسیل ژنتیکی بالا به دلایلی کشتار شده و یا تلف می‌شوند و یا در مورد حیات وحش و دام‌های در حال انقراض، می‌توان پس از تلف شدن این دام‌ها درصورتی‌که مدت زیادی از مرگ آن‌ها نگذشته باشد، اسپرم‌های اپیدیدیمی را اخذ نمود (۹، ۱۰ و ۲۱). البته اسپرم اپیدیدیمی قوچ بعد از کشتار تا ۲۴ ساعت و در دمای ۵+ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شده و در مقایسه با گروه شاهد، اختلاف معنی‌داری از نظر کاهش تحرک نداشته است (۱۶ و ۲۵). اسپرم‌های دم اپیدیدیم معمولاً کیفیت خوبی داشته و تا حد زیادی بالغ شده‌اند و توانایی لقاح با اووسیت را داشته و با وجود این‌که بالای ۹۰٪

اسپرم‌های اپیدیدیمی در گاو (۵)، بز (٦ و ۱۸) و خوک (١٤) دارای قطرهٔ پروتوپلاسمی‌اند، آبستنی‌های موفقیت‌آمیزی در گونه‌های مختلف دامی با استفاده از اسپرم‌های اپیدیدیمی در تلقیح مصنوعی، لقاح آزمایشگاهی و یا ریزتزریق (Microinjection) داخل سیتوپلاسم تخمک به‌دست آمده است (۱ و ۲). در ژاپن، اسپرم‌های اپیدیدیمی گونه‌ای از بز در حال انقراض با موفقیّت در محیطی با گلیسرول و زردهٔ تخم مرغ منجمد گردید و زنده‌مانی اسپرم‌ها بعد از ذوب نیز ارزیابی شده است (۳، ۱۱ و ٢٤). محققینی توانسته‌اند با موفقیت اسپرم‌های اپیدیدیمی گاومیش را فریز کنند (۱۲). در قسمت آمپول کانال دفران که به‌عنوان منبع ثانویهٔ ذخیرهٔ منی عمل می‌کند (اولیه در دم اپیدیدیم)، فروکتوز و اسید سیتریک به پلاسمای منی اضافه می‌شود (۱۱، ۱۲، ٢٦ و ۲۸) و غلظت آن در پلاسمای منی ۷۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است (۲۰). در این مطالعه، تاثیر سه غلظت مختلف اسید سیتریک در محدودهٔ pH اسپرم بر میزان زنده/ مرده و الگوی حرکتی اسپرم‌های اپیدیدیمی دم گاو با روش CASA طی ٦ ساعت انکوباسیون در محیط Hams F10 بررسی شد. از آن‌جایی‌که ارزیابی تحرک اسپرم در پیشگویی باروری آن نقش مهمی دارد و ارزیابی با CASA روش دقیق و قابل اعتمادی است، لذا از این‌روش در مطالعهٔ فوق استفاده گردید (۸، ۹ و ۱۷).

مواد و روش‌کار

با مراجعه به کشتارگاه صنعتی ارومیه در استان آذربایجان‌غربی از مهر ۸٦ تا شهریور ۸۷، در مجموع تعداد ۵۰ جفت بیضهٔ گاوهای بالغ در محدوده سنی ۱۸ الی ٢٤ ماه (بر اساس فرمول دندانی) بلافاصله بعد از کشتار جمع‌آوری شده و بیضه‌های سالم، بدون چسبندگی و با دم اپیدیدیمی برجسته، انتخاب و در مجاورت پک‌های پلاستیکی دارای یخ ۵ درجه سانتی‌گراد، سریعاً (در مدت کمتر از ۳۰ دقیقه) به آزمایشگاه منتقل می‌گردید. قبلاً محیط Hams F10 و رقت‌های اسید سیتریک آماده شده و در انکوباتور CO2 در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شد. بلافاصله پس از برش تونیکا آلبوژینه، ناحیهٔ دم اپیدیدیم بیضه، بین دو انگشت تثبیت و در بخشی که کمترین عروق خونی وجود داشت، با یک برش سریع، اسپرم‌های موجود، بدون این‌که با خون آغشته شود به خانه‌های میکروپلیت ٢٤ خانه با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت، انتقال می‌یافت (۱۷ و ۱۹). تمامی مراحلی که بیرون از انکوباتور انجام می‌شد، روی صفحه گرم صورت می‌گرفت تا اسپرم‌ها دچار شوک حرارتی نشوند. هر خانه از میکروپلیت حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول Hams F10 با ۱۰٪ FCS بود و پس از جمع‌آوری و انتقال اسپرم‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل ۱۵ دقیقه قرار داده می‌شد تا فعالیّت اسپرم‌ها آغاز گردد. بلافاصله پس از این مرحله ضمن شمارش سریع با کمک لام هماسیتومتر نئوبار زمینه تاریک، تعداد اسپرم اپیدیدیمی موجود در هر خانه مشخص شده و سریعاً یک لام با روش رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین تهیّه می‌گردید و اسپرم‌ها از نظر زنده و مرده بودن بررسی می‌شدند

در آماده‌سازی رقت‌های اسید سیتریک ذکر شده در این مطالعه، محدودهٔ pH نرمال اسپرم گاو (٦/۵ الی ۷)، در نظر گرفته شد و رقت‌های بالاتر به‌دلیل اسیدی کردن محیط بررسی نشد. مقدار ۱ نرمال اسید سیتریک در مایع منی گاو ۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است (۲۰) و بر اساس آن، رقت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ نرمال تهیّه شد.

نحوهٔ شمارش اسپرم‌های اپیدیدمی و بررسی رقت نهایی

به‌منظور شمارش و بررسی رقت‌های نهایی، از اسپرمی که به‌عنوان استوک (Stock) تهیّه شده بود، رقت ۱ به ۱۰۰ با سالین نرمال فرمالینه (۰/۲٪) تهیه شد، سپس از محلول مورد نظر با سمپلر ۲۰ میکرولیتر برداشت گردید و در گوشهٔ لام و لامل قرار داده شد تا اسپرم‌ها به زیر فضای لام نئوبار زمینه تاریک و لامل کشیده شوند. بعد از مدت کمی که اسپرم‌ها ساکن شدند، عمل شمارش انجام گردید. برای انجام شمارش، اسپرم‌های ۲۵ مربع وسط لام شمارش و حاصل در عدد یک

میلیون ضرب شد تا تعداد اسپرم در میلی‌لیتر مشخص شود و از آن برای تهیّهٔ رقت مورد ارزیابی توسط سخت افزار کاسا استفاده شود (٤، ١٨ و ٢٢).

پس از شمارش اسپرم، رقت‌های ٥٠ میلیون اسپرم در ١ میلی‌لیتر محلول هامس با ١٠٪ سرم گوسالهٔ جنینی داخل انکوباتور ٣٧ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت و از طرفی رقت‌های ٠/٢، ٠/٤ و ٠/٦ نرمال اسید سیتریک در ١ میلی‌لیتر محلول هامس با ١٠٪ سرم گوسالهٔ جنینی آماده شد و در انکوباتور ٣٧ درجهٔ سانتی‌گراد، قرار گرفت.

برای بررسی غلظت‌های ٠/١، ٠/٢ و ٠/٣ نرمال اسید سیتریک از رقت‌های ٠/٢، ٠/٤ و ٠/٦ نرمال به میزان ٠/٥ میلی‌لیتر برداشته و همچنین از میکروتیوب حاوی غلظت ٥٠ میلیون اسپرم در ١ میلی‌لیتر محلول هامس با ١٠٪ سرم گوسالهٔ جنینی نیز ٠/٥ میلی‌لیتر برداشته و هر دو رقت به میکروتیوب‌های دیگری انتقال داده شد تا در نهایت رقت‌های ٠/١، ٠/٢ و ٠/٣ نرمال اسید سیتریک در ١ میلی‌لیتر محلول هامس با ١٠٪ سرم گوسالهٔ جنینی و ٢٥ میلیون اسپرم به‌دست آید (CASA قادر به شناسایی و محاسبهٔ الگوی حرکت رقت‌های بالای ٤٠ میلیون نمی‌باشد). هم‌چنین در ارتباط با گروه شاهد نیز ٠/٥ میلی‌لیتر از رقت ٥٠ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر را برداشته و فقط همراه با ٠/٥ میلی‌لیتر محلول هامس با ١٠٪ سرم گوسالهٔ جنینی به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد تا غلظت ٢٥ میلیون اسپرم در ١ میلی‌لیتر محلول هامس با ١٠٪ سرم گوسالهٔ جنینی به‌دست آید. سپس در زمان‌های ١٥،٣٠، ٤٥، ٦٠، ٩٠، ١٢٠، ١٨٠، ٢٤٠ و٣٦٠ دقیقه، به‌میزان ١٠ میکرولیتر از نمونهٔ حاوی اسید سیتریک و گروه شاهد به‌طور جداگانه برداشته شد و داخل خانهٔ ١٠ میکرولیتری لام ماکلر (Makler) که قبلاً روی Warm stage ٣٧ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده بود، ریخته شد و پس از قرار دادن در پوش لام، زیر میکروسکوپ متصل به دوربین و سخت افزار کامپیوتری در ٥ شان میکروسکوپی، الگوی حرکتی اسپرم‌ها توسط دستگاه ثبت گردید. البته به‌منظور بررسی اسید سیتریک در رقت‌های مورد نظر روی زنده/ مرده بودن اسپرم‌ها، هم‌زمان نمونه‌هایی نیز از شاهد و رقت‌های ٠/١، ٠/٢ و ٠/٣ نرمال در زمان‌های ٠، ٣٠، ٦٠، ١٢٠، ١٨٠، ٢٤٠ و٣٦٠ دقیقه جهت رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین تک‌مرحله‌ای گرفته می‌شد. گسترش‌های تهیّه شده سریع در مجاورت هوا خشک شده و سپس ارزیابی با بزرگ‌نمایی ١٠٠٠× انجام پذیرفت و ٢٠٠ عدد اسپرم در هر لام شمارش شد (٦، ٨ و ١٧).

جهت آنالیز آماری از نرم افزار آماری SPSS ویرایش ١٥ و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) استفاده شد. داده‌ها از نظر معنی‌دار بودن تفاوت واریانس‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و برای انجام آزمون‌های تعقیبی (Post Hoc Multiple Comparsions) آزمون توکی (Tukey) مورد استفاده قرار گرفت.

پارامترهائی‌که توسط سیستم CASA ارزیابی می‌شود شامل:

ClassA: درصد اسپرم‌های متحرک با سرعت بالا.

ClassB: درصد اسپرم‌های متحرک با سرعت پائین (حرکت آهسته).

ClassC: درصداسپرم‌هایی که حرکت درجا دارند.

ClassD: درصد اسپرم‌هایی که ساکن بوده واحتمالاً مرده‌اند.

A+B : مجموع درصد اسپرم‌هایی که حرکت سریع و آهسته دارند.

A+B+C: درصد اسپرم‌های زنده که شامل مجموع درصد اسپرم‌هایی که حرکت سریع و آهسته داشته همراه با درصد اسپرم‌های بدون حرکت پیش‌رونده و با حرکت درجا هستند.

در ارتباط با سرعت حرکت اسپرمی داده‌های زیر توسط CASA محاسبه می‌شود:

VCL (Curvilinear Velocity): میانگین سرعت اسپرم در مسیر واقعی که به‌صورت منحنی است و بر حسب میکرومتر بر ثانیه محاسبه می‌شود.

VSL (Straight-line Velocity): به‌صورت میانگین سرعت حرکت اسپرمی در خط مستقیم و بر حسب میکرومتر در ثانیه محاسبه می‌شود.

VAP (Average Path Velocity): میانگین سرعت اسپرم در میانگین مسیر واقعی است و برحسب میکرومتر در ثانیه محاسبه می‌شود.

در ارتباط با بقیه داده‌ها نیز:

MAD (Mean Angel Degree): مجموع زوایایی که میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر منحنی، متوسط سرعت مسیر را قطع می‌کند.

ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement): پهنا یا عرض حرکت جانبی سر اسپرم برحسب میکرومتر است.

BCF (Beat-Cross Frequency): فرکانس ضربان عرضی یا تعداد دفعات عبور سر اسپرم از مسیر حرکت و بر حسب هرتز می‌باشد.

LIN (Linearity): یا خطی بودن مشخص می‌کند که چقدر مسیر حرکت اسپرم در مسیر واقعی به خط مستقیم نزدیک است.

WOB (Wobble): یا لرزش و درصد مستقیم بودن یا STR (Straightness) به‌صورت زیر محاسبه می‌شود (۱۷ و ۲۳).

$$\text{درصد خطی} = \left(\frac{\text{سرعت خط مستقیم}}{\text{سرعت خط منحنی}}\right) \times ۱۰۰$$

$$\text{درصد مستقیم بودن} = \left(\frac{\text{سرعت خط مستقیم}}{\text{متوسط سرعت مسیر}}\right) \times ۱۰۰$$

$$\text{درصد لرزش} = \left(\frac{\text{متوسط سرعت مسیر}}{\text{سرعت خط منحنی}}\right) \times ۱۰۰$$

نتایج

در ارتباط با تغییر الگوی حرکتی اسپرم‌های اپیدیدیمی، موارد معنی‌دار در زیر جداول مربوط به هر الگوی حرکتی، توضیح داده شده است (جداول ۱ الی ۱۳).

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در گروه شاهد دقیقهٔ ۱۵، میزان ٤٦/٧٨٪ اسپرم‌ها دارای حرکت رو به جلو هستند و در اسیدسیتریک ۰/۱ و ۰/۲ و ۰/۳ نرمال این میزان به‌ترتیب ٤٨/٣٦، ٤٥/٨٥ و ٤٧/٦٢ می‌باشد. با گذشت زمان تا دقیقهٔ ٦٠ اختلاف معنی‌داری در گروه‌ها و زمان‌های مختلف مشاهده نمی‌شود، ولی از دقیقهٔ ۹۰ تا ۱۸۰ بین گروه شاهد و اسید سیتریک ۰/۳ نرمال اختلاف معنی‌دار بوده و درصد حرکت رو به جلوی اسپرم‌ها در گروه اسیدسیتریک در مقایسه با شاهد بیشتر است ($p<۰/۰۵$). از دقیقهٔ ۲٤۰ تا ۳٦۰ باز هم بین گروه شاهد و اسید سیتریک ۰/۳ نرمال اختلاف معنی‌دار بوده ($p<۰/۰۵$) و از طرفی اسید سیتریک ۰/۲ نرمال نیز دارای اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

همین‌طور اسید سیتریک ۰/۳ نرمال با اسید سیتریک ۰/۱ نرمال دارای اتلاف معنی‌داری می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، تا دقیقهٔ ۱۸۰ اختلاف معنی‌داری مابین گروه‌های مختلف، وجود ندارد. در دقیقهٔ ۲٤۰، بین گروه شاهد و اسید سیتریک ۰/۳ نرمال اختلاف معنی‌دار بوده و در گروه شاهد، درصد اسپرم‌های ساکن بیشتر است ($p<۰/۰۵$). همین‌طور بین اسید سیتریک ۰/۱ نرمال و اسید سیتریک ۰/۳ نرمال، باز اختلاف معنی‌دار بوده و درصد اسپرم‌های ساکن در اسید سیتریک ۰/۱ نرمال بیشتر است($p<۰/۰۵$). در دقیقهٔ ۳٦۰، فقط گروه اسید سیتریک ۰/۳ نرمال و شاهد، دارای اختلاف معنی‌داری هستند و درصد اسپرم‌های ساکن در گروه شاهد بیشتر است ($p<۰/۰۵$).

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، تا دقیقهٔ ۱۸۰ اختلاف معنی‌داری مابین گروه‌های مختلف وجود ندارد. در دقیقهٔ ۲٤۰ و ۳٦۰ بین گروه شاهد و اسید سیتریک ۰/۳ نرمال

اختلاف معنی‌دار بوده و در اسید سیتریک ۰/۳ نرمال، درصد الگوی A+B بیشتر است (p<۰/۰۵). از طرفی در دقیقهٔ ۳۶۰، بین گروه شاهد و اسید سیتریک ۰/۲ نرمال باز اختلاف معنی‌دار بوده و درصد الگوی A+B در اسید سیتریک ۰/۲ نرمال بیشتر است (p<۰/۰۵).

با توجه به جدول ٤، تا دقیقهٔ ۱۸۰ اختلاف معنی‌داری مابین گروه‌ها وجود ندارد. در دقیقهٔ ۲٤۰ و ۳٦۰ بین گروه شاهد و اسید سیتریک ۰/۳ نرمال اختلاف معنی‌دار بوده و در اسید سیتریک ۰/۳ نرمال، درصد اسپرم‌های زنده بیشتر است (p<۰/۰۵). در دقیقهٔ ۲٤۰ اسید سیتریک ۰/۲ و ۰/۳ نرمال دارای اختلاف معنی‌دار بوده و درصد اسپرم‌های زنده در اسید سیتریک ۰/۳ نرمال بیشتر است (p<۰/۰۵).

با توجه به جدول ٥، از نظر الگوی سرعت خط منحنی تا دقیقهٔ ٦۰ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف وجود ندارد. از دقیقهٔ ۹۰ اختلاف معنی‌دار شروع می‌شود. در دقیقهٔ ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲٤۰ و ۳٦۰ بین شاهد و اسید سیتریک ۰/۳ نرمال اختلاف معنی‌دار بوده و در اسید سیتریک ۰/۳ نرمال، سرعت خط منحنی حرکت اسپرمی که بر حسب میکرومتر بر ثانیه بیان می‌شود، بیشتر است (p<۰/۰۵). البته در دقیقهٔ ۲٤۰ و ۳٦۰ نیز بین اسید سیتریک ۰/۲ نرمال و گروه شاهد، اختلاف معنی‌دار بوده و در اسید سیتریک ۰/۲ نرمال، سرعت حرکت خط منحنی اسپرمی بیشتر است (p<۰/۰۵).

با توجه به جدول ٦، از نظر الگوی متوسط سرعت مسیر تا دقیقهٔ ٦۰ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف وجود ندارد. از دقیقهٔ ۹۰ اختلاف معنی‌دار شروع می‌شود. در دقایق ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲٤۰ و ۳٦۰ بین گروه شاهد و اسید سیتریک ۰/۳ نرمال اختلاف معنی‌دار بوده و در اسید سیتریک ۰/۳ نرمال، متوسط سرعت مسیر که بر حسب میکرومتر بر ثانیه بیان می‌شود، بیشتر است (p<۰/۰۵). در دقیقهٔ ۳٦۰ باز بین گروه شاهد و اسید سیتریک ۰/۲ نرمال، اختلاف معنی‌دار بوده و در اسید سیتریک ۰/۲ نرمال، متوسط سرعت مسیر بیشتر است (p<۰/۰۵).

با توجه به جدول ۷، از نظر سرعت خط مستقیم تا دقیقهٔ ٦۰ اختلاف معنی‌داری مابین گروه‌های مختلف وجود ندارد. از دقیقهٔ ۹۰ اختلاف معنی‌دار شروع می‌شود. در دقایق ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲٤۰ و ۳٦۰ مابین شاهد و اسید سیتریک ۰/۳ نرمال اختلاف معنی‌دار بوده و در اسید سیتریک ۰/۳ نرمال، سرعت خط مستقیم که بر حسب میکرومتر بر ثانیه بیان می‌شود، بیشتر است (p<۰/۰۵). در دقیقهٔ ۱۲۰، بین اسید سیتریک ۰/۲ نرمال و اسید سیتریک ۰/۳ نرمال اختلاف معنی‌دار بوده و سرعت خط مستقیم در اسید سیتریک ۰/۳ نرمال بیشتر است (p<۰/۰۵). در دقیقهٔ ۲٤۰ و ۳٦۰ نیز شاهد با اسید سیتریک ۰/۲ نرمال اختلاف معنی‌دار داشته و از گروه شاهد بیشتر است (p<۰/۰۵).

با توجه به جدول ۸، از نظر الگوی دامنهٔ حرکت جانبی سر اسپرم تا دقیقهٔ ٦۰ اختلاف معنی‌داری مابین گروه‌های مختلف وجود ندارد. از دقیقهٔ ۹۰ اختلاف معنی‌دار شروع می‌شود. در دقایق ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲٤۰ و ۳٦۰ مابین شاهد و اسید سیتریک ۰/۳ نرمال اختلاف معنی‌دار بوده و در اسید سیتریک ۰/۳ نرمال، دامنهٔ حرکت جانبی سر اسپرم که برحسب میکرومتر بیان می‌شود، بیشتر است (p<۰/۰۵). در دقیقهٔ ۲٤۰ گروه شاهد با اسید سیتریک ۰/۱ و ۰/۲ نرمال اختلاف معنی‌دار داشته و کمتر است (p<۰/۰۵).

با توجه به جدول ۹، از نظر الگوی فرکانس ضربان عرضی تا دقیقهٔ ٦۰ اختلاف معنی‌داری مابین گروه‌های مختلف وجود ندارد. در دقایق ۹۰، ۱۸۰ و۲٤۰ بین گروه شاهد و اسید سیتریک ۰/۳ اختلاف معنی‌دار بوده و فرکانس ضربان عرضی که بر حسب هرتز بیان می‌شود، در شاهد بیشتر از اسید سیتریک ۰/۳ نرمال است (p<۰/۰۵). از طرفی در دقیقهٔ ۲٤۰ بین گروه شاهد و اسید سیتریک ۰/۲ نرمال اختلاف معنی‌دار بوده و فرکانس ضربان عرضی شاهد بیشتر است (p<۰/۰۵).

با توجه به جدول ۱۰، از نظر الگوی خطی بودن تا دقیقهٔ ٦٠ اختلاف معنی‌داری مابین گروه‌های مختلف وجود ندارد. از دقیقهٔ ۹۰ اختلاف معنی‌دار شروع می‌شود. در دقایق ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲٤۰ و ۳٦۰ گروه شاهد و اسید سیتریک ۰/۳ نرمال اختلاف معنی‌دار بوده و در اسید سیتریک ۰/۳ نرمال، درصد خطی بودن حرکت اسپرم، بیشتر است ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین بین اسید سیتریک ۰/۱ و ۰/۳ نرمال در دقایق ۹۰، ۱۲۰ و ۲٤۰ اختلاف معنی‌دار بوده و درصد خطی بودن اسید سیتریک ۰/۳ نرمال بیشتر است ($p<۰/۰۵$).

با توجه به جدول ۱۱، از نظر درصد لرزش، تا دقیقهٔ ٦٠ اختلاف معنی‌داری مابین گروه‌های مختلف وجود ندشت. از دقیقهٔ ۹۰، اختلاف معنی‌دار شروع می‌شود. در دقیقهٔ ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲٤۰ و ۳٦۰ مابین گروه شاهد و اسید سیتریک ۰/۳ نرمال اختلاف معنی‌دار بوده و در اسید سیتریک ۰/۳ نرمال، درصد لرزش اسپرم بیشتر است ($p<۰/۰۵$). بین اسید سیتریک ۰/۱ و ۰/۳ نرمال در دقیقهٔ ۹۰، ۱۲۰، ۲٤۰ و ۳٦۰ اختلاف معنی‌دار بوده و درصد لرزش در اسید سیتریک ۰/۳ نرمال بیشتر است ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین بین اسید سیتریک ۰/۲ و ۰/۳ نرمال در دقیقهٔ ۹۰ و ۱۲۰ نیز اختلاف معنی‌دار بوده و درصد لرزش اسپرم‌ها در اسید سیتریک ۰/۳ نرمال بیشتر است ($p<۰/۰۵$).

با توجه به جدول ۱۲، از نظر درصد مستقیم بودن تا دقیقهٔ ۹۰ اختلاف معنی‌داری مابین گروه‌های مختلف وجود ندشت. در دقایق ۱۲۰، ۲٤۰ و ۳٦۰ بین گروه شاهد و گروه اسید سیتریک ۰/۳ نرمال اختلاف معنی‌دار بوده و درصد مستقیم بودن در گروه اسید سیتریک ۰/۳ نرمال بیشتر بوده ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین در دقایق ۱۲۰ و ۳٦۰ بین اسید سیتریک ۰/۱ و ۰/۳ نرمال، اختلاف معنی‌دار و درصد مستقیم بودن در اسید سیتریک ۰/۳ نرمال بیشتر است ($p<۰/۰۵$).

در تمامی گروه‌ها، شمارش اسپرم‌های زنده یا مرده با ارزیابی چشمی (شمارش ۲۰۰ اسپرم با بزرگ نمایی۱۰۰۰× در هر لام با میکروسکوپ نوری) در مقایسه با ارزیابی توسط کاسا معنی‌دار نبود (جدول ۱۳). بنابراین، می‌توان در ارزیابی اسپرم‌های زنده یا مرده به سیستم کاسا اعتماد کرد. البته کاسا همواره اسپرم بیشتری را به‌عنوان مرده ارزیابی خواهد کرد، چراکه اسپرم قبل از این‌که غشاء آن به رنگ ائوزین نفوذ پذیر شود، ممکن است تحرک خود را از دست بدهد و توسط کاسا به‌عنوان اسپرم مرده تلقی شود ولی این میزان از نظر آماری معنی دار نیست ($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

تحرک اسپرم، برای عبور از مجاری تناسلی ماده و نفوذ به‌داخل اووسیت طی لقاح ضروری است و عموماً عقیده بر این است که تحرک اسپرم از شاخصه‌های ضروری است که نشان‌دهندهٔ توانایی لقاح اسپرم و زنده بودن و طبیعی بودن ساختارهای اسپرم است (۱۷). بررسی میزان باروری اووسیت انسان و حیوانات در آزمایشگاه (In Vitro) بیانگر ارتباط معنی‌دار تحرک اسپرم با باروری است و اختلاف آماری معنی‌دار و مهمی در شاخصه‌های تحرک اسپرمی مابین اسپرم‌هائی‌که درصد باروری بالایی دارند با آن‌هائی‌که درصد باروری پائینی داشته و سبب آبستنی ناموفقی می‌شوند، وجود دارد (۱ و ۳). ارزیابی کیفیت منی بر اساس ارزیابی‌های چشمی و فردی مثل حرکت کلی و انفرادی اسپرم‌ها و بررسی‌های عملی‌تر مثل غلظت منی و اختلالات مورفولوژیکی اسپرم انسان و حیوانات، وقتی با میکروسکوپ نوری صورت می‌گیرد، تفاوت‌های ٦٠-۳۰ درصدی مثلاً در ارزیابی یک نمونهٔ انزالی دیده می‌شود (۲۷).

ارتباط مابین معیارهای کاسا و باروری پستانداران در بیشتر گونه‌ها دارای ارزش تشخیصی است و در گونه‌های مختلفی از قبیل موش، گاونر، خوک نر، خرگوش، بوقلمون، نریان و انسان، جهت تجزیه تحلیل الگوی حرکتی اسپرم، به‌کار رفته است و اختلافات معنی‌داری در شاخصه‌های الگوی حرکت اسپرمی مابین اسپرم‌هایی که توانایی لقاح بالاتری دارند در مقایسه با اسپرم‌هایی که توانایی لقاح آن‌ها پائین است وجود دارد (۱۷).

Holt و همکاران در سال ۱۹۹٤ گزارش کرده‌اند که سرعت خط منحنی اسپرم انزالی، قویاً با میزان لقاح آزمایشگاهی ارتباط دارد (۱۳). Janulis و همکاران در سال ۱۹۹٦ مشاهده کردند که دامنهٔ حرکت جانبی سر اسپرم‌های متحرکی که با روش "جداسازی اسپرم طبیعی با حرکت مناسب" انتخاب شده‌اند، با میزان لقاح آزمایشگاهی ارتباط معنی‌داری دارد (۱۵). Chan و همکاران در سال ۱۹۹۰ گزارش کرده‌اند که سرعت خط منحنی اسپرم‌هائی که جدا سازی و انتخاب شده‌اند، عامل مهمی در لقاح آزمایشگاهی می‌باشد (۵). اسپرم گاوهای نر با قدرت باروری بالا (Superior Fertility)، تحرک بالایی داشته و از نظر میزان زنده بودن و سرعت خط مستقیم و همچنین اختلالات مورفولوژیکی کمتر و نیز قابلیت بالا در سویم آپ (Swim up) و میزان نفوذ زیاد در ترشحات مخاطی گردن رحم، با اسپرم گاوهای نر دیگر متفاوتند (۱۵). اهمّیت سرعت خط مستقیم با ظرفیت باروری دام در گونه‌های زیادی از جمله گاو نر و خوک مشاهده شده است. در بررسی Gillan و همکاران در سال۲۰۰۷، پس از سویم آپ ، درصد اسپرم‌های زنده با حرکت پیش‌رونده و سرعت بیشتر (سرعت خط منحنی، سرعت خط مستقیم و متوسط سرعت مسیر) و معیارهای دامنهٔ حرکت جانبی سر، ضربان عرضی سر و خطی بودن مسیر حرکت، در گاوهای نر اصیل، خیلی بیشتر بوده، اختلالات مورفولوژیکی اسپرم این گاوها کمتر بوده و نفوذپذیری اسپرم در ترشّحات مخاطی گردن رحم، در گاوهائی‌که قابلیت باروری بالایی داشته و شاخصه‌های الگوی حرکتی (سرعت خط منحنی، خط مستقیم و متوسط سرعت مسیر و دامنهٔ حرکت جانبی سر) بالاتری داشته‌اند، بیشتر بوده است (۸). بنابراین سیستم کاسا هم می‌تواند درصد اسپرم‌های متحرک و هم شاخصه‌های حرکت اسپرمی را مثل سرعت شنای اسپرم و الگوی شنای اسپرم در نمونه را بررسی کند (۸). در بررسی Kathiravan و همکاران در سال ۲۰۰۷ روی الگوی حرکتی اسپرم‌های گاوهای دو رگه و ارتباط آن با باروری اووسیت بدون زونای هامستر، ارتباط مؤثر و مثبتی مابین حرکت پیش رونده و درصد لقاح و باروری مشاهده شده است. هم‌چنین ارتباط معنی‌داری مابین شاخصه‌های سرعت حرکت اسپرمی (متوسط سرعت مسیر و سرعت خط مستقیم) و درصد باروری در این مطالعه به‌دست آمده است که با نتایج به‌دست آمده در پژوهش‌های پزشکی هم‌خوانی دارد (۱۷). در مطالعهٔ Cox و همکاران در سال ۲۰۰٦ روی الگوی حرکتی اسپرم بز و ارتباط آن با حرکت در ترشّحات مخاطی گردن رحم، مشخص شده است که ارتباط معنی‌داری مابین سرعت خط منحنی و متوسط سرعت مسیر، با قابلیت نفوذ در موکوس سرویکس بز ماده وجود دارد. البته شاخص حرکت جانبی سر اسپرم چندان ارتباط معنی‌داری با نفوذ به‌داخل موکوس نداشته است، چرا که اسپرم بزهای نری که سرعت حرکت یکسانی در مقایسه با اسپرم بزهای دیگر داشته اند، ولی دامنهٔ حرکت جانبی سر آن‌ها بالاتر بوده است، قابلیت نفوذ داخل موکوس سرویکس کمتری داشته‌اند و ارتباط مابین حرکت جانبی سر و قابلیت نفوذ داخل موکوس سرویکس چندان معنی‌دار نبوده است. لکن مشخص گردیده است که شاخصه‌هائی که در بررسی الگوی حرکت اسپرمی با سیستم کاسا به‌دست می‌آید می‌تواند پیشگویی کنندهٔ پتانسیل اسپرم در رسیدن به ناحیهٔ اتصالی رحم و اویداکت (Uterotubal Junction) و به‌دنبال آن لقاح اووسیت باشد (٦). در بررسی Elzanaty و همکاران در سال ۲۰۰۵ روی دورهٔ استراحت جنسی و ترشّحات اپیدیدمی و غدد ضمیمه و نقش آن‌ها در تحرک اسپرم انسان، مشخص شده است که ٥-٤ روز پس از استراحت جنسی، دامنهٔ حرکت جانبی سر اسپرم افزایش یافته، به‌علاوه سرعت خط مستقیم و خطی بودن مسیر حرکت اسپرم در نمونه‌هائی‌که ۳-۲ روز پس از استراحت جنسی تهیه می‌شوند، بالاتر بوده و این نشانگر این مطلب است که دورهٔ استراحت جنسی روی درصد اسپرم‌های متحرک و شاخصه‌های الگوی حرکتی آن‌ها که ناشی از ترشّحات اپیدیدم و پروستات می‌باشد، نقش داشته و برای بررسی این ارتباط

می‌توان از روش کاسا کمک گرفت (۷). در بررسی کیفیت اسپرم اپیدیدمی بیضه‌های راست و چپ و بررسی الگوی حرکتی آن که توسط Goovaerts و همکاران در سال ۲۰۰۶ صورت گرفته است، نتایج کاسا نشان‌دهندهٔ تفاوت بین الگوی حرکت اسپرم‌های اپیدیدمی و انزالی بوده و در یک دورهٔ زمانی مشخص، اسپرم‌های اپیدیدمی سرعت خط مستقیم و متوسط سرعت مسیر کمتری از اسپرم‌های انزالی داشته‌اند و در عین حال سرعت خط منحنی اسپرم‌های اپیدیدمی بیشتر بوده و همچنین فرکانس ضربان عرضی کمتر و دامنهٔ جابجایی سر اسپرمی بیشتری در مقایسه با اسپرم‌های انزالی داشته‌اند. از طرفی درصد اسپرم‌های با حرکت پیش‌رونده، در اسپرم انزالی بالاتر بود و این به‌دلیل کاهش فعالیت‌های متابولیکی ناشی از اثرات اپیدیدیم (و احتمالاً حضور قطرهٔ پروتوپلاسمی دور) بوده است. به‌هرحال، اسپرم‌های انزالی در مقایسه با اسپرم‌های اپیدیدیمی شاخصه‌های حرکتی بهتری داشته و در طی کردن مجاری دستگاه تناسلی دام ماده سریع‌تر و بهتر از اسپرم‌های اپیدیدیمی عمل می‌نمایند (۹).

در این مطالعه، اسید سیتریک ۰/۳ نرمال از دقیقهٔ ۹۰ به بعد الگوی حرکتی اسپرم‌ها را تغییر داده ($p<0/05$) و درصد اسپرم‌های با حرکت سریع (Class A) در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر شده است. همراه با این شاخص، میزان سرعت خط منحنی، سرعت خط مستقیم، متوسط سرعت مسیر، دامنهٔ حرکت جانبی سر و لرزش نیز از دقیقهٔ ۹۰ به بعد بیشتر از گروه شاهد شده است. در گروه اسید سیتریک ۰/۲ نرمال از دقیقهٔ ۲۴۰ به بعد، در مقایسه با گروه شاهد درصد اسپرم‌های با حرکت سریع افزایش یافته است. گروه اسید سیتریک ۰/۱ نرمال در دقایق ۲۴۰ و ۳۶۰ در مقایسه با اسید سیتریک ۰/۳ نرمال تفاوت معنی‌داری نشان داده و درصد اسپرم‌های با حرکت سریع آن کمتر بوده است.

جدول ۱- میانگین و خطای معیار میانگین (SEM) الگوی CLASS A (اسپرم‌های با حرکت سریع) در هر گروه زمانی به تفکیک گروه مورد آزمایش

زمان(دقیقه) / گروه‌ها	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲۴۰	۳۶۰
شاهد	۴۶/۸۷±۲/۵^{a}	۵۶/۵۸±۲/۷۳^{a}	۵۷/۶۵±۲/۸^{a}	۵۴/۷۱±۲/۶۹^{a}	۴۸/۶۶±۱/۸^{a}	۴۶/۹۸±۲/۰۶^{a}	۴۶/۱۴±۲/۵۱^{a}	۴۴/۳۹±۲/۹۳^{c}	۴۳/۳۵±۲/۱۳^{c}
اسید سیتریک ۰/۱ نرمال	۴۸/۳۶±۳/۸۹^{a}	۵۱/۰۲±۲/۱^{a}	۵۷/۵۴±۳/۴^{a}	۵۵/۰۸±۳/۷۷^{a}	۵۱/۶۹±۱/۴۸^{ab}	۵۰/۶۶±۳/۲۵^{ab}	۴۸/۸۱±۲/۵۵^{ab}	۴۷/۰۸±۲/۲۵^{bc}	۴۵/۷۴±۲/۳۴^{bc}
اسید سیتریک ۰/۲ نرمال	۴۵/۸۵±۳/۴۱^{a}	۵۱/۹±۲/۶۸^{a}	۵۲/۱±۳/۰۷^{a}	۵۵/۴±۳/۲۴^{a}	۵۴/۴۵±۲/۷۲^{ab}	۵۳/۷۸±۲/۹۹^{ab}	۵۲±۲/۶۷^{ab}	۵۷/۱۷±۲/۹۲^{ab}	۵۳/۶۶±۲/۲۱^{ab}
اسید سیتریک ۰/۳ نرمال	۴۷/۶۲±۲/۹۵^{a}	۵۳/۲۴±۳/۵۳^{a}	۵۴/۵۲±۲/۷۴^{a}	۵۵/۷۳±۲/۷۶^{a}	۶۰/۷۳±۲/۹۶^{b}	۶۰/۱۴±۲/۷۵^{b}	۶۰/۲۱±۳/۹^{b}	۵۹/۲۸±۲/۴۱^{a}	۵۵/۹۳±۲/۵^{a}

در هر گروه زمانی (در هر ستون)، حروف لاتین غیر مشترک یا غیر یکسان، دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۲- میانگین و خطای معیار میانگین الگوی CLASS D (اسپرم‌های ساکن یا بدون حرکت) در هر گروه زمانی به تفکیک گروه مورد آزمایش

زمان (دقیقه) / گروه‌ها	۱۵	۳۰	٤٥	٦٠	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤۰	۳٦۰
شاهد	۲۲/۳۳±۱/ ٦ a	۱۸/٦۱±٤/ ۷٦ a	۱٤/۲٥±۲/۱۷ a	۱۸/٤٥±۳/۱٦ a	۲۲/۲۷±۲/۲٥ a	۲٥/۸۳±۳/۳۱ a	۲٦/۹۸±۲/۳۹ a	۲۷±۱/۷۳a	۲۹/۸۸±۱/۲٤a
اسید سیتریک ۰/۱نرمال	۲۳/۰٥±٤/۰٤ a	۲۱/٦۷±۳/۳۱ a	۱۷/۰۷±۳/٥٦ a	۱۸/۲۷±۳/۱۱ a	۲۲/۱۹±۳/۰۷ a	۲۱/٥±۲/۹۹ a	۲٦/۱۹±۳/۱۷ a	۲٥/۹±۲/۸۱ac	۲۷/۲۰±۱/۹٥ab
اسید سیتریک ۰/۳نرمال	۲٦/٥±۲/۰٦ a	۲۰/۷٦±۲/٦٦ a	۲۱/۰٦±٤/۱٥ a	۱۹/۷٥±۲/۷۸ a	۱۸/۸۹±۱/٥۲ a	۲۲/۲٥±۲/۱۰ a	۲۲/۷٥±۳/۲٥ a	/۰۹±۲/۱۰ab ۲۱	۲۳/۸٤±۱/٦۳ab
اسید سیتریک ۰/۳نرمال	۲۰/۷۹±۱/۸٥ a	۲۱/۱٥±۳/٤۸ a	۱۸/٦±۳/۱٥ a	۲۰/۰٦±٤/۰۱ a	۱۳/۲٥±۲/۱٤ a	۱۷/۱۹±۲/۹۳ a	۱٦/٦۷±۳/۸۹ a	۱٥/۷±۱/۳٥b	۲۰/۰۱±۲/۲٥b

در هر گروه زمانی (در هر ستون)، حروف لاتین غیر مشترک یا غیر یکسان دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۳- میانگین و خطای معیار میانگین الگوی A+B در هر گروه زمانی به تفکیک گروه مورد آزمایش

زمان(دقیقه) / گروه‌ها	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲۴۰	۳۶۰
شاهد	۶۱/۶۴±۱/ ۹۲ [a]	[a]۶۷/۴۸±۳/۰۶	۷۰/۶۹±۲/۵۳ [a]	۶۷/۸۴±۳/۴۵ [a]	۶۱/۹۱±۲/۴۷ [a]	۵۹/۹۸±۳/۰۵ [a]	۵۷/۹۵±۲/۹۲ [a]	۵۷/۳۹±۲/۱۵[a]	۵۴/۷۵±۱/۳۲[a]
اسید سیتریک ۰/۱ نرمال	۶۲/۴۰±۴/۷۲ [a]	۶۴/۰۲±۳/۷۴ [a]	۷۰/۶۳±۳/۸۶ [a]	۶۶/۷۵±۴/۱۹ [a]	۶۵/۴۳±۲/۶۱ [a]	۶۲/۸۸±۳/۵۵ [a]	۶۰/۸۵±۲/۸۹ [a]	۵۹/۶۵±۳/۴۷[ab]	۵۹/۲۱±۲/۰۳[abc]
اسید سیتریک ۰/۲ نرمال	۵۸/۴۹±۲/۵۶ [a]	۶۴/۰۶±۳/۳۱ [a]	۶۴/۱۵±۳/۸۲ [a]	۶۷/۳۴±۳/۲۲ [a]	۶۶/۶۵±۲/۵۸ [a]	۶۵/۷۵±۲/۸۷ [a]	۶۴/۷۱±۲/۸۲ [a]	۶۶/۹۸±۲/۵۵[ab]	۶۴/۱۰±۱/۸۶[c]
اسید سیتریک ۰/۳ نرمال	۶۰/۰۱±۲/۳۲ [a]	۶۵/۴۹±۳/۸۷ [a]	۶۷/۹±۳/۱۰[a]	۶۸/۱±۳/۷۴[a]	۷۴/۳۳±۲/۸۷ [a]	۷۲/۲۶±۲/۷۳ [a]	۷۲/۲۲±۴/۵۱ [a]	۷۱/۳±۱/۹۶[b]	۶۷/۴۸±۲/۲۹[bc]

در هر گروه زمانی (در هر ستون)، حروف لاتین غیر مشترک یا غیر یکسان دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ٤- میانگین و خطای معیار میانگین الگوی A+B+C (یا درصد اسپرم‌های زنده) در هر گروه زمانی به تفکیک گروه مورد آزمایش

زمان(دقیقه) / گروه‌ها	۱۵	۳۰	٤٥	٦٠	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤۰	۳٦۰
شاهد	۷۷/۸۱±۱/٦۳ a	a۷۹/۰۷±۳/۱٤	۸٤/٤۲±۳/۳٦ a	۸۱/۷٥±۳/۱۷ a	۷۷/۸۱±۲/۲٤ a	۷۳/۹٤±۳/۱۲ a	۷۲/۷٤±۲/٤۱ a	۷۲/٦۹±۱/۷٤a	٦۹/۷۳±۰/۹۱a
اسید سیتریک ۰/۱نرمال	۷۷/٤٥±۳/۹۷ a	۷۷/۹۹±۳/۲ a	۸۲/٦٦±۳/۳٦ a	۸۱/٦۲±۳ a	۷۷/۷۳±۲/۷٤ a	۷۷/۸۷±۳/۰۲ a	۷۳/۹۳±۳/۲۱ a	۷۳/۹±۲/۹۹ab	۷۲/٥۸±۲/۱ab
اسید سیتریک ۰/۲نرمال	۷۳/۲۱±۱/۹٥ a	۷۸/٥٦±۲/٦۹ a	۷۸/٥۷±۳/۹٥ a	۸۰/٤۰±۲/٦۲ a	۸۱/۱٦±۱/٤۷ a	۷۷/۷۷±۲/۳۷ a	۷۷/۰۲±۳/۳۷ a	۷۹/۱٦±۲/۱۹ac	۷٦/٤٦±۱/٥۹ab
اسید سیتریک ۰/۳نرمال	۷۷/۹۳±۲/٤۳ a	۷۸/٥۲±۳/٤۹ a	۸۱/٦٦±۳/۰۷ a	۸۰/٤۳±۳/۹٦ a	۸۷/۰۷±۲/۱۲ a	۸۲/۸۷±۲/۸۳ a	۸۳/٥۷±۳/۷۳ a	۸٤/٥±۱/۳۷b	۸۰/۳۸±۲/۲۳b

در هر گروه زمانی (در هر ستون)، حروف لاتین غیر مشترک یا غیر یکسان دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۵- میانگین و خطای معیار میانگین الگوی VCL (سرعت خط منحنی) در هر گروه زمانی به تفکیک گروه مورد آزمایش

زمان (دقیقه) / گروه‌ها	۱۵	۳۰	٤٥	٦٠	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤۰	۳٦۰
شاهد	۳۱ [a] ۹۰/۲۵±۵/	۹۹/۵۳±۲/۳٤ [a]	۹٦/٤٤±۲/۵۱ [a]	۹۳/٤۱±۵/٦۳ [a]	۸۷/۹۱±۲/۹۰ [a]	۸٤/۸۹±۳/۰۵ [a]	۸۱/٤±۵/۸ [a]	۷۸/۵۸±۵/۷۸ [a]	۷۱/۵٤±۳/۹۹ [a]
اسید سیتریک ۰/۱ نرمال	۹۲/۸۸±۲/۸٤ [a]	۸۹/۵۲±٤/۵۷ [a]	۹۵/۸٦±٦/۷۸ [a]	۹۳/٤۲±۷/۱۷ [a]	۸۹/۳۰±٤/٤٤ [ab]	۸۹/۸٦±٤/۵۷ [ab]	۹۷/۸۵±۲/۳٤ [ab]	۹۰/٤۳±۱/٦٦ [ab]	۸۵/۱۷±۲/۸۷ [ab]
اسید سیتریک ۰/۲ نرمال	۸۹/۵۲±٤/۵۷ [a]	۹۳/۲۵±۸/۷٤ [a]	۹۳/٤٤±۵/۲۰ [a]	۹۲/۷٦±۵/۹۳ [a]	۹۱/۸۵±۲/۹۰ [ab]	۹۱/٤٦±٤/۸۹ [ab]	۹۸/٦۵±٤/۰۱ [ab]	۹۸/٦۵±۱/۸۱ [b]	۹۱/۲۳±۲/۲٦ [b]
اسید سیتریک ۳٪ نرمال	۹۰/۷۷±۵/۱۹ [a]	۹٤/۰۳±۳/۸۰ [a]	۹٤/۷۲±٤/۳۰ [a]	۹۵/۸۲±۵/۲٤ [a]	۱۰۲/۳٦±۲/۲۲ [b]	۱۰۵/۲۲±۳/٤ [b]	۱۰۲/٤٤±٤/۰۸ [b]	۱۰۱/۲۵±۲/۵٦ [b]	۹٦/٤۸±۳/۷۱ [b]

در هر گروه زمانی (در هر ستون)، حروف لاتین غیر مشترک یا غیر یکسان دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ٦- میانگین و خطای معیار میانگین الگوی VAP (متوسط سرعت مسیر) در هر گروه زمانی به تفکیک گروه مورد آزمایش

زمان (دقیقه) / گروه‌ها	۱۵	۳۰	٤٥	٦٠	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤۰	۳٦۰
شاهد	۷٦/۹۷±٤/۷۸ a	۸٦/۹±۱/ ۹۳ a	۸۳/۱۱±۲/۱٦ a	۷۸/۰٤±٤/۳۳ a	۷۲/۸±۲/۹۳a	۷٦/۹۰±۱/۸۲a	۷۳/۱۹±۳/٤۷a	۷۳/٤۹±٦/٥٤ a	٦٤/۷۷±۳/۷٦a
اسید سیتریک ۱٪ نرمال	۷۸/۰۲±۱/۹٦ a	۷۷/٦۲±٤/۲۸ a	۸۲/٥۱±٦/۰۳ a	۸۰/٥±٦/۹٥ a	۷۷/۷۲±۳/۰٦ab	۸۱/٦۲±۳/٦٤ab	۸٥/۰٤±۲/۳۳ab	۸٤/۳۹±۱/۷٦ab	۷٦/۹۰±۲/۹٦ab
اسید سیتریک ۲٪ نرمال	۷۷/٦۲±٤/۲۸ a	۷۹/٦۱±٦/۸۲ a	۷۷/۱٥±٥/٤٥ a	۷۹/۳۹±٦/۱۹ a	۸۱/۲۷±۳/٦۲ab	۷۹/۰٤±۲/۲۷ab	۸٦/٦۰±٤/۰۷ab	۸۹/۰۸±۱/۸٦ab	۸٤/۸٤±۳/۳٦b
اسید سیتریک ۳٪ نرمال	۷۸/۱۸±٥/٦٥ a	۸۰/۱٤±۱/۸۳ a	۷۹/٥۱±۳/۰٤ a	۸۲/۹۱±۳/۳۲ a	۸۸/٦۲±۳/۳۷b	۹۰/٥۹±۳/٤۰b	۸۸/۲۹±۲/٤۲b	۹۲/٦۷±۳/٤۹b	۸۹/۲۲±۲/۹۳b

در هر گروه زمانی (در هر ستون)، حروف لاتین غیر مشترک یا غیر یکسان دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۷- میانگین و خطای معیار میانگین الگوی VSL (سرعت خط مستقیم) در هر گروه زمانی به تفکیک گروه مورد آزمایش

زمان (دقیقه) / گروه‌ها	۱۵	۳۰	٤٥	٦٠	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤٠	۳٦٠
شاهد	۷۱/٦۷±٤/۹٦ ^{a}	۸۲/۱۰±۱/ ۹٦^{a}	۷۸/۰۷±۲/٤۰ ^{a}	۷۲/٤٦±٤/٤۳ ^{a}	٦۸/٥۹±۳/۳۱^{a}	٦۸/٤۱±۱/۳٥^{a}	۷۰/۲۳±۳/۰۸^{a}	٦۲/٥٤±٦/۳٦^{a}	٦۰/۳٥±٥/۲۸^{a}
اسید سیتریک ۰/۱ نرمال	۷۲/۳٤±۱/۹٥ ^{a}	۷۲/۲۹±٤/ ٥ ^{a}	۷۷/٤۳±٦/۰٦ ^{a}	۷٥/۳۱±۷/ ۲۱^{a}	۷۱/۸٥±۳/۰۹^{ab}	۷۲/۹۱±۳/۲۳^{ab}	۷۷/۲۲±۱/٥۹^{ab}	۷۹/۱۷±۱/۹۹^{ab}	۷۲/٤۲±۳/۱۲^{ab}
اسید سیتریک ۰/۲ نرمال	۷۲/۲۹±٤/٥ ^{a}	۷٤/۱٤±۷/۰۲ ^{a}	۷۱/۲۷±٥/٦۲ ^{a}	۷۳/۹۳±٦/٥٤ ^{a}	۷۲/۰۸±۳/٥۳^{ab}	۷۱/٥±۲/۲۳^{a}	۸۰/۲۱±۳/۱۹^{ab}	۸۳/٥۷±۲/۱۰^{b}	۸۰/۸۹±۳/۱۰^{b}
اسید سیتریک ۰/۳ نرمال	۷۲/۸±٥/۹۰ ^{a}	۷٤/۹۰±۱/۸۱ ^{a}	۷۳/۹٥±۳/۰۱ ^{a}	۷۷/٦۳±۳/۲۷ ^{a}	۸۳/۷۲±۳/٤۲^{b}	۸٥/۳۹±۳/۳۳^{b}	۸۳/٥۲±۲/٤٦^{b}	۸۷/٥±۳/٥۷^{b}	۸٤/۹۳±۳/۱۱^{b}

در هر گروه زمانی (در هر ستون)، حروف لاتین غیر مشترک یا غیر یکسان دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۸- میانگین و خطای معیار میانگین الگوی ALH (دامنهٔ حرکت جانبی سر اسپرم) در هر گروه زمانی به تفکیک گروه مورد آزمایش

زمان (دقیقه) / گروه‌ها	۱۵	۳۰	٤٥	٦٠	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤۰	۳٦۰
شاهد	۱/٦۸±۰/ ۰۹ ^{a}	۱/۸۱±۰/۱۱ ^{a}	۱/۷۳±۰/۰۸ ^{a}	۱/۸۲±۰/۱۲ ^{a}	۱/٥٤±۰/۰٥^{a}	۱/٦۷±۰/۰٥^{a}	۱/٥٥±۰/۱۲^{a}	۱/٤۲±۰/٥۹^{a}	۱/٤۱±۰/۰۸^{a}
اسید سیتریک ۰/۱ نرمال	۱/۸۷±۰/۰۸ ^{a}	۱/٦۸±۰/۱۳ ^{a}	۱/۸۲±۰/۱۳ ^{a}	۱/۷۲±۰/ ۱۰^{a}	۱/۷٤±۰/۱۱^{ab}	۱/۸٥±۰/۰۸^{ab}	۱/۹۲±۰/۰۷^{ab}	۱/۹۰±۰/۰۸^{b}	۱/٦۲±۰/۰۸^{ab}
اسید سیتریک ۰/۲ نرمال	۱/٦۸±۰/۱۰ ^{a}	۱/۷٥±۰/۱۲ ^{a}	۱/۸۹±۰/۱۱ ^{a}	۱/۹۳±۰/۰۸ ^{a}	۱/۷۸±۰/۰۸^{ab}	۱/۸۰±۰/۰۷^{ab}	۱/۹٤±۰/۱٦^{ab}	۱/۹۱±۰/۱۰^{b}	۱/٥٦±۰/۱۱^{ab}
اسید سیتریک ۰/۳ نرمال	۱/۸٤±۰/۰٤ ^{a}	۱/۸٥±۰/۱٤ ^{a}	۱/۹۲±۰/۱۰ ^{a}	۱/۷٥±۰/۱۳ ^{a}	۱/۹٤±۰/۰۷^{b}	۱/۹٦±۰/۰۸^{b}	۲/۰٤±۰/۰۸^{b}	۲/۱۰±۰/۰۹^{b}	۱/۸۷±۰/۰۹^{b}

در هر گروه زمانی (در هر ستون)، حروف لاتین غیر مشترک یا غیر یکسان دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۹- میانگین و خطای معیار میانگین الگوی BCF (فرکانس ضربان عرضی) در هر گروه زمانی به تفکیک گروه مورد آزمایش

زمان (دقیقه) / گروه‌ها	۱۵	۳۰	٤٥	٦٠	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤۰	۳٦۰
شاهد	٤/۱۳±۰/۱۷ a	۳/۹۱±۰/۱۲ a	٤/۰۳±۰/۱۰ a	٤/۰٤±۰/۱۷ a	٤/۳۸±۰/۱۲a	٤/۰۷±۰/۰۸ a	٤/٤۷±۰/۲٦a	٤/۵۱±۰/۲۱a	٤/۳۵±۰/۲۷ a
اسید سیتریک ۰/۱ نرمال	٤/۱۰±۰/۱۰ a	٤/۰۹±۰/۱۷ a	۳/۸۷±۰/۱٤ a	٤/۰۷±۰/۲۰ a	٤/۳٤±۰/۲٦ab	٤/۰۱±۰/۱۸ a	۳/۸۸±۰/۱۰ab	۳/۸۹±۰/۰۸ab	٤/۰۸±۰/۰۹ a
اسید سیتریک ۰/۲ نرمال	٤/۰۹±۰/۱۷ a	٤/۰۷±۰/۲۵ a	٤/۰٤±۰/۱٤ a	٤/۰۳±۰/۱۸ a	۳/۹۸±۰/۱۲ab	۳/۸۷±۰/۱٤ a	۳/۹۰±۰/۱۳ab	۳/۷۰±۰/۰۸b	۳/۹۲±۰/۰۸ a
اسید سیتریک ۰/۳ نرمال	٤/۱۳±۰/۱٦ a	۳/۹۸±۰/۱۳ a	۳/۹٦±۰/۱۲ a	۳/۹۳±۰/۱۵ a	۳/٦۲±۰/۱٤b	۳/٤۹±۰/۱۲ a	۳/۵۹±۰/۱۰b	۳/۵۸±۰/۰۸b	۳/۵۵±۰/۰۷ a

در هر گروه زمانی (در هر ستون)، حروف لاتین غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۱۰- میانگین و خطای معیار میانگین الگوی LIN (خطی بودن) در هر گروه زمانی به تفکیک گروه مورد آزمایش

زمان (دقیقه) / گروه‌ها	۱۵	۳۰	٤٥	٦٠	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤٠	۳٦٠
شاهد	۷۱/٦۹±۲/۰۲ ^{a}	۷٤/۸۷±۱/۳٤ ^{a}	۷۵/۳۱±۱/۲۰ ^{a}	۷۰/٤۳±۲/۱۵ ^{a}	۷۱/۵۱±۲/۰۵ ^{a}	٦۲/۳۳±۱/۲۵ ^{a}	۷۱/۹۵±۳/۹۵ ^{a}	۷۱/۲٤±۲/٤٦ ^{a}	٦۹/۷۱±۲/۲۱ ^{a}
اسید سیتریک ۰/۱ نرمال	۷٦/٤۵±۱/۷۷ ^{a}	۷۱/۷٦±۲/۵۸ ^{a}	۷٤/۱۵±۱/٤۷ ^{a}	۷۲/۲٤±۲/۹۷ ^{a}	۷۰/۹۳±۳/۷۵ ^{a}	۷۰/۵۵±۲/۲۲ ^{ab}	۷۵/۰٦±۱ ^{ab}	۷۳/۳٤±۲/۱۰ ^{a}	۷۲/٦٤±۱/۱۷ ^{ab}
اسید سیتریک ۰/۲ نرمال	۷۱/۷٦±۲/۵۸ ^{a}	۷۰/٦۰±۲/۹٤ ^{a}	٦۹/۲٦±۲/٤۰ ^{a}	۷۱/۱۷±۳/٤۷ ^{a}	۷۷/۷۱±۲/٤۱ ^{ab}	۷٤/۱۵±۱/٤۷ ^{b}	۷۸/۸۳±۲/۹۲ ^{ab}	۷۸/۲۳±۲/۲٤ ^{ab}	۷۸/۳۹±۰/۷٦ ^{ab}
اسید سیتریک ۰/۳ نرمال	٦۹/۵۵±۳/۰٦ ^{a}	۷۲/۵۲±۱/۲۱ ^{a}	۷۱/۱۸±۱/٦۰ ^{a}	۷۳/۵۰±۱/۳۲ ^{a}	۸۵/۷٦±۱/۵٤ ^{b}	۸۷/۳۸±۰/۳۳ ^{c}	۸٤/۸۱±۱/۲۵ ^{b}	۸٦/۳۲±۱/۵۳ ^{b}	۸۲/۵۹±۲/۳۲ ^{b}

در هر گروه زمانی (در هر ستون)، حروف لاتین غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۱۱- میانگین و خطای معیار میانگین الگوی WOB (لرزش) در هر گروه زمانی به تفکیک گروه مورد آزمایش

زمان (دقیقه) / گروه‌ها	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲۴۰	۳۶۰
شاهد	۸۳/۱۲±۱/۴۹ ^{a}	۸۵/۷۲±۰/۴۷ ^{a}	۸۳/۳۶±۱/۲۷ ^{a}	۸۲/۸۶±۱/۲۰ ^{a}	۸۳/۱۳±۱/۸۳ ^{a}	۸۱/۰۳±۰/۹۶ ^{a}	۷۷/۰۵±۱/۱۸ ^{a}	۷۶/۴۲±۰/۴۹ ^{a}	۷۳/۷۷±۱/۴۵ ^{a}
اسید سیتریک ۰/۱ نرمال	۸۴/۵۹±۰/۸۲ ^{a}	۸۲/۰۱±۱/۴۷ ^{a}	۸۴/۰۷±۱/۳۲ ^{a}	۸۳/۶۸±۱/۹۱ ^{a}	۸۳/۳۷±۱/۲۹ ^{ab}	۸۳/۳۴±۰/۸۲ ^{a}	۸۵/۰۱±۰/۳۹ ^{b}	۸۳/۴۶±۱/۴۶ ^{b}	۸۲/۰۷±۱/۷۹ ^{ab}
اسید سیتریک ۰/۲ نرمال	۸۴/۱۱±۱/۵۱ ^{a}	۸۲/۷۲±۰/۸۸ ^{a}	۸۱/۱۳±۲/۱۵ ^{a}	۸۲/۹۵±۱/۴۱ ^{a}	۸۴/۸۷±۱/۰۲ ^{ab}	۸۵/۵۷±۱/۱۲ ^{a}	۸۵/۰۶±۱/۶۸ ^{b}	۸۵/۴۶±۱/۴۶ ^{bc}	۸۴/۸۷±۱ ^{bc}
اسید سیتریک ۰/۳ نرمال	۸۲/۸۵±۱/۸۳ ^{a}	۸۳/۳۶±۱/۰۷ ^{a}	۸۲/۰۹±۱/۵۹ ^{a}	۸۴/۰۹±۱/۵۳ ^{a}	۹۲/۷۷±۱/۷۸ ^{c}	۹۴/۲۴±۱/۱۳ ^{b}	۸۸/۴۸±۱/۵۷ ^{b}	۹۱/۴۴±۱/۳۱ ^{c}	۹۱/۴۸±۲/۸۵ ^{c}

در هر گروه زمانی (در هر ستون)، حروف لاتین غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۱۲- میانگین و خطای معیار میانگین الگوی STR (مستقیم بودن) در هر گروه زمانی به تفکیک گروه مورد آزمایش

زمان (دقیقه) / گروه‌ها	۱۵	۳۰	٤٥	٦٠	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲٤٠	۳٦٠
شاهد	۸۳/۷۳±۲ ^{a}	۸٦/۲۳±۱/٤٠ ^{a}	۸٦/۱۰±۰/۹٤ ^{a}	۸٤±۲/٥٤ ^{a}	۸۱/۱۸±۱/ ٦٤ ^{a}	۷۹/۷۳±۱/٥۳ ^{a}	۸۰/۰٤±۳/٤٤ ^{a}	۷٤/٥۹±۲/۲٥ ^{a}	٦۸/٦۳±۲/۳٤ ^{a}
اسید سیتریک ۰/۱ نرمال	۸٥/۱۷±۱/۷۳ ^{a}	۸۲/۹۷±۲/۲۳ ^{a}	۸۳/۲۳±۱/۹۱ ^{a}	۸۳/۸٦±۳/۰۷ ^{a}	۸۲/۸۰±۳/۹۰ ^{a}	۸۰/۸۲±۲/۳۸ ^{a}	۸٦/۳٦±۱/۳٥ ^{a}	۸٥/٤۷±۱/۷۹ ^{b}	۸۰/٥۲±۳/۳۱ ^{b}
اسید سیتریک ۰/۲ نرمال	۸۲/۹۷±۲/۲۳ ^{a}	۸۲/٥۸±۳/۹٤ ^{a}	۸٤/٥۸±۱/۳۷ ^{a}	۸۳/۱۲±۳/۱٤ ^{a}	۸٤/۲۸±۱/۹۳ ^{a}	۸٦/۱۰±۰/۹٤ ^{ab}	۸٥/٥۸±۱/٦۷ ^{a}	۸۸/۷۲±۱/٦۹ ^{bc}	۸۷/۳۳±۱ ^{c}
اسید سیتریک ۰/۳ نرمال	۸۳/٥٤±۲/۸٥ ^{a}	۸٤/۷٦±۲/۲۷ ^{a}	۸٦/۰۷±۲/۲۲ ^{a}	۸٤/۸٦±۱/۹٥ ^{a}	۹۱/۳٦±۲/۱۲ ^{a}	۹۰/۳۷±۱/۳٦ ^{b}	۸۸/۹۹±۱/۸۷ ^{a}	۹٤/۳۸±۰/۳۳ ^{bc}	۹۲/۲۸±۱/۸۰ ^{c}

در هر گروه زمانی (در هر ستون)، حروف لاتین غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۱۳- مقایسهٔ آمار توصیفی (میانگین و خطای معیار میانگین) اسپرم‌های زنده شمارش شده به روش تهیّه گسترش و روش کاسا

زمان (دقیقه)	۳۰		۶۰		۱۲۰		۱۸۰		۲۴۰		۳۶۰	
گروه‌ها	بررسی میکروسکوپی (E&N)	بررسی با CASA	بررسی میکروسکوپی (E&N)	بررسی با CASA	بررسی میکروسکوپی (E&N)	بررسی با CASA	بررسی میکروسکوپی (E&N)	بررسی با CASA	بررسی میکروسکوپی (E&N)	بررسی با CASA	بررسی میکروسکوپی (E&N)	بررسی با CASA
شاهد	۷۷/۳۹±۳/۷۶ a	۷۵/۶۷±۴/۳۴ a	۸۳/۹۳±۳/۲۶ a	۸۱/۳۹±۳/۴۳ a	۷۶/۴۸±۲/۵۶ a	۷۴/۳۹±۲/۸۶ a	۷۱/۲۱±۲/۶۳ a	۶۹/۳۲±۲/۴۳ a	۷۱/۴۸±۱/۷۸	۶۸/۳۴±۱/۴۱	۶۹/۱۴±۰/۹۹	۶۶/۳۹±۰/۸۶
اسید سیتریک ۰/۱ نرمال	۷۵/۹۸±۳/۵۳ a	۷۴/۹۳±۳/۴۶ a	۸۱/۳۱±۴/۲۲ a	۷۹/۰۶±۴/۱۱ a	۷۷/۴۸±۴/۲۴ a	۷۴/۲۵±۴/۲۸ a	۷۲/۶۴±۴/۱۷ a	۶۹/۸۲±۴/۳۶ a	۷۱/۱۴±۱/۶۲	۶۹/۱۲±۲/۱۲	۷۰/۷۵±۱/۴۶	۶۸/۰۲±۱/۲۲
اسید سیتریک ۰/۲ نرمال	۷۷/۷۲±۳/۶۲ a	۷۵/۴۴±۳/۲۰ a	۸۰/۴۵±۳/۷۰ a	۷۸/۲۹±۴/۰۴ a	۷۷/۰۸±۳/۲۰ a	۷۵/۳۶±۳/۰۳ a	۷۶/۷۳±۴/۷۵ a	۷۴/۹۴±۴/۲۳ a	۷۷/۳۷±۱/۸۱	۷۵/۰۴±۲/۴۹	۷۵/۵۱±۱/۸۰	۷۱/۹۵±۱/۷۷
اسید سیتریک ۰/۳ نرمال	۷۹/۳۰±۴/۸۱ a	۷۷/۸۱±۴/۵۹ a	۸۱/۶۱±۵/۳۵ a	۷۸/۹۸±۵/۷۷ a	۸۲/۱۱±۳/۸۵ a	۷۹/۳۲±۳/۶۷ a	۸۳/۰۷±۵/۲۳ a	۸۱/۰۷±۵/۶۴ a	۸۴/۳۷±۱/۹۴	۸۱/۹۱±۳/۰۸	۷۸/۹۵±۲/۴۱	۷۷/۲۲±۲/۴۸

در هر گروه زمانی (در هر ستون)، حروف لاتین غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

فهرست منابع

1. Amann, R.P. (1989): Can fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? Journal of Andrology, 10: 89-98.
2. Amann, R.P., Seidel, G.E. and Mortimer, R.G. (2000): Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. Theriogenology, 54: 515-1499.
3. Auger, J., Leonce, S., Jouannet, P. and Ronot, X. (1993): Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. J. Histochem. Cytochem., 4 1: 1247-1251.
4. Bearden, H.J., Fuquay, J.W. and Willard, S.T. (2004): Applied Animal Reproduction. Pearson Prentice Hall. 6th ed., Chapter 15, pp: 185-189.
5. Cha, S.Y., Tsoi, W.L., Leung, J., Ng, V., Lo, T. and Wang, C. (1990): The accuracy of sperm concentration determination by the automated Cell Soft semen analyzer before and after discontinuous percoll gradient centrifugation. Andrology, 2: 55-61.
6. Cox, J.F., Alfaro, V., Montenegro, H. and Rodriguez, M. (2006): Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. Theriogenology, 66: 860-867.
7. Elzanaty, S., Johan, M. and Aleksander, G. (2005): Duration of sexual abstinence: epididymal and accessory sex gland secretions and their relationship to sperm motility. Human Reproduction, 20: 221-225.
8. Gillan, L., et al. (2007): Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls, Anim. Reprod. Sci., doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.12.010., In press.
9. Goovaerts, G.G., Hoflack, A., Van Soom, J., Dewulf, M., Nichi, A. and de Kruif, P.E.J. (2006): Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyzer indicates variation between the two-caudae epididymides of the same bull. Theriogenology, 66: 323-330.
10. Harayama, H. and Kato, S. (1992): Changes in motility and morphology of spermatozoa during their transit through the epididymis in Meishan boars at various ages. Anim. Sci. Technol. (Jpn), 63: 462-467.
11. Hishinuma, M., Suzuki, K. and Sekine, J. (2003): Recovery & cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 degrees. Theriogenology, 59: 813-820.
12. Herolda, J.E. and Aurichb, D.G. (2004): Epididymal sperm from African buffalo can be frozen successfully with AndoMed1 & Triladyl TM but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. Theriogenology, 61: 715-724.
13. Holt, W., Watson, P., Curry, M. and Holt, C. (1994): Reproducibility of computer-aided semen analysis: Comparison of five different systems used in a practical workshop. Fertility and Sterility, 62: 1277-1282.
14. Ikeda, H., Kikuchi, K., Noguchi, J., Takeda, H., Shimada, A., Mizokami, T., et al. (2002): Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm. Theriogenology, 57: 1309-1318.
15. Janulis, L., Hess, RA., Bunick, D., Nitta, H., Janssen, S., Asawa, Y. and Bahr, J.M. (1996): Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase, which decreases as sperm traverse from the epididymis. Journal of Andrology, 17: 111-116.
16. Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, G.C., Rouissi, H., Herraez, P. and Anel, L. (2003): Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. Theriogenology, 60: 1249-1259.

17. Kathiravan, P., et al. (2007): Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes, Anim. Reprod. Sci., doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.01.002., In press.
18. Kato, S., Toshitaka S.A., Hiroshi, H. and Yasuyuki, K. (1996): Timing of shedding and disintegration of cytoplasmic droplets from boar and goat spermatozoa. Journal of Reproduction and Development, 42: 237-241.
19. Kato, S., Yasui, T. and Kanda, S. (1987): Changes in motility and morphology of goat spermatozoa during their transit through the epididymis. Mem Grad School Sci. & Technol, Kobe University, 5B: 35–42.
20. Donalds, M.C. (2003): Veterinary Endocrinology and Reproduction. 5th ed., Saunders, London, Chapter 7, pp: 267.
21. Martinez-Pastor, C., Guerra, M., Kaabi, A.R., Diaz, E., Anel, P., Herraez, P. and de Paz, L. (2005): Decay of sperm obtained from epididymis of wild ruminants depending on postmortem time. Theriogenology, 63: 24-40.
22. Margo, L., Macpherson (2001): How to Evaluate Semen in the Field. Vol: 47, AAEP (American Association of Equine Practitioners) Proceedings, pp: 413-414.
23. Mortimer, S.T. and Mortimer, D. (1990): Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. J. Androl., 11: 195-203.
24. Naomi, K., Ena, N., Akira, K., Chikashi, T. and Masao, S. (2001): Freezing epididymal spermatozoa of the Japanese serow (*Capricornis crispus*) in liquid nitrogen. Journal of Reproduction and Development, 47(6): 359-363.
25. Pe´rez, S., Aguado, M., Ayllon, E., Garrido, D., Montoro, V. and Garde, J. (1995): Live birth of hybrid (O. musimon-O.aries) lambs following intrauterine insemination in domestic sheep with mouflon semen obtained 40 hours postmortem. Theriogenology, 43: 218.
26. Rao A.R., Bane, A. and Gustafsson, B.K. (1980): Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. Theriogenology, 14: 1-12.
27. Verstegen, J., Iguer-Ouada, M. and Onclin, K., (2002): Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology, 57: 149-179
28. Youngquist, et al. (2007): Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Saunders, London, Chapter 30, pp: 221-237.

Vet. J. of Islamic Azad Uni. Tabriz Branch. 2, 3: 217-239, 2008

The effect of different concentrations of citric acid on motility patterns of bovine epididymal sperms in Hams F10 milieu

Abdy, K.[1*] , Tajik, P.[2], Gasemzade, H.[2], Kave, A.A.[3], Mirshokraei, P.[4]

1-Graduate of Veterinary Reproduction & Obstetrics, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Campus, Tehran, Iran
2-Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3-Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran
4-Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

[*]***Corresponding author's email:*** *keivanabdy@yahoo.com*

(Received: 30.10.2008**, Accepted:** 19.1.2009**)**

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of three concentration of citric acid on motility patterns of bovine epididymal sperms. For this purpose, 50 pairs of bovine testicles were collected immediately after slaughter form urmia abattoir and transferred to the laboratory alongside 5^{oc} ice pack. Epididymal tail sperms were collected with a few incisions in vascular areas and transferred to hams f10 milieu with 10% fetal calf serum and counted after 15 minutes of incubation at 37^{oc} in Co2 incubator. Concentrations of 50 million sperms per ml were proposal and in the normal sperm pH rang of 6.7-7.4, 0.1, 0.2 and 0.3 normal concentration of citric acid were added to sperm continuity micro tubes (normal concentration of acid equals 7 mg/ml of bovine serum) and at 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 and 360 minutes the motility patterns of epididymal sperms were evaluated using the computer assisted sperms analyzing (CASA) method. Data were analyzed with one-way ANOVA using the SPSS 15 software. The results indicated significant differences in various indices of sperm motility patterns (Curvilinear Velocity, Straight-line Velocity, Average Path Velocity, Mean Angel Degree, Amplitude of Lateral Head Displacement, Beat-Cross Frequency, Linearity, Wobble) particularly at 0.3 normal concentration of citric acid compared with the control.

Keywords: Epididymal sperm, cow, citric acid, CASA- Hams F10 milieu