Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره پنجم، شماره بیستم - پائیز ۱۳۹۴

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی تاثیر توأمان گلوکز و اسید سیتریک بر حرکت اسپرم گاو

الهام اسدی

استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، اسلامشهر، ایران

چکیده

سابقه و هدف: از آنجا که تحرک اسپرم یکی از فرایندهای ضرروی و تعیین گر جهت لقاح است و گلوکز از مواد لازم برای تامین نیاز تحرک در اسپرم بسیاری از گونه های جانوری است و هم چنین اسید سیتریک از جمله موادی است که اسپرم قادر به متابولیزه کردن آن می باشد، در تحقیق حاضر به بررسی نقش این دو فاکتور در الگوی تحرک اسپرم گاو در محیط BO پرداخته شده است.

مواد و روش ها: بیضه های بالغ گاو در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. بیضه ها را از داخل تونیکا آلبوژینا خارج نموده سپس با ایجاد شکافی در قسمت فاقد عروق و با فشار بر قسمت دم اپیدیدیم یک قطره مایع سرشار از اسپرم داخل پلیت حاوی محیط Bo نموده و نمونه مذکور را در انکوباتور دارای ۵٪ از گاز CO_2 در هوای مرطوب و درجه حرارت ۳۸ درجه سانتی گراد قرار داده شد، به گونه ای که هر محیط حاوی ۶-۴ میلیون اسپرم در میلی لیتر محیط حاوی اسپرم باشد. محیط های حاوی نمونه اسپرم رقیق شده را در انکوباتور قرار داده و در ساعت های ۱ تا ۸، اسپرم ها از لحاظ پارامترهای زیر مورد بررسی ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج این بررسی نشان داد که بهترین اثر افزایش دهندگی اسید سیتریک بر حرکت سریع اسپرم ها در غلظت G1 گلوکز مشاهده می شود و اسپرم ها در ساعت ۶ افزایش تحرک معنی دار نشان دادند ($P<0/05$). هم چنین از لحاظ میزان اسپرم های متحرک با سرعت سریع و آهسته در حضور اسید سیتریک و غلظت G1 گلوکز در ساعت ۴ و ۶ افزایش معنی دار مشاهده گردید ($P<0/05$).

از لحاظ میزان ماندگاری در حضور اسید سیتریک و غلظت G1 گلوکز در ساعت ۲ و ۴ افزایش معنی داری را شاهد شد($P<0/05$).

این در حالی است که چنین افزایشی را در محیط حاوی اسید و غلظت G2 گلوکز مشاهده نشده است. در بررسی پارامترهای الگوی سرعت حرکت اسپرم در غلظت G1 و G2 گلوکز در حضور و عدم حضور اسید سیتریک گروه های مورد آزمایش فاقد اختلاف معنی دار بودند.

نتیجه گیری: این نتایج نشان می دهد که اگرچه اسید سیتریک بر پارامترهای فوق نقش افزاینده دارد ولی این افزایش مبتنی بر پارامترهای دیگری چون غلظت گلوکز می باشد. هم چنین بر الگوی حرکت و سرعت اسپرم بی تاثیر است.

کلیدواژه ها: اسپرم اپیدیدیمی – گلوکز – اسید سیتریک – ماندگاری – سرعت حرکت.

مقدمه

تحرک در اسپرم عاملی ضروری جهت لقاح است (۱۵،۱۶) و مواد مختلفی از جمله گلوکز و اسید سیتریک بر این فاکتور تاثیر گذار است (۷).

اگر چه اسپرم بسیاری از گونه های جانوری قادر به متابولیزه کردن گلوکز می باشد، از این لحاظ تفاوت های بین گونه ای وجود دارد (۶،۸،۱۴).

تحقیق ها بر روی اسپرم اپیدیدیمی موش نشان دهنده کاهش تحرک آن در محیط فاقد گلوکز است (۱۹). درمورد نقش اسید سیتریک تعیین غلظت و درصد مناسب آن به دلیل اینکه می تواند PH محیط کشت را تغییر دهد باید در محدوده دقیق

نویسنده مسئول :
تهران، شهرک ژاندارمری، خ گلستان ۱۱، پلاک ۴
ایمیل :asadi@asadi.ir
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۰۶/۲۶
تاریخ پذیرش :۱۳۹۴/۰۲/۲۱

www.SID.ir

Archive of SID

تنظیم شود (۲،۱۱). گزارش های متناقضی در مورد اثر اسید سیتریک افزوده شده به محیط نگهداری اسپرم وجود دارد (۱۱).

استفاده اسپرم گاو میش از گلوکز نیز مشاهده گردیده (۳، ۹). هم چنین یافته هایی دال بر عدم استفاده اسپرم گاو از گلوکز و قابلیت بقاء آن در محیط فاقد گلوکز می باشد (۱۸،۱۷). اگر چه مدت زمانی که اسپرم قادر به ماندگاری و تحرک در چنین محیطی است ذکر نشده و احتمال دارد گزارش اخیر به دلیل استفاده از اسپرم انزالی و تفاوت آن با اسپرم اپیدیدیمی باشد.

در حال حاضر تحقیقات در زمینه بررسی محیط های مناسب جهت تلقیح مصنوعی در گونه های جانوری مختلف صورت می‌گیرد. برخی محیط ها بر پایه فرمول ساده نمکی ارائه شده توسط Eagle, Earl, Ringer به همراه افزودن پیروات، لاکات، گلوکز و آلبومین می باشد. نمونه دیگر محیط BO است که اولین بار توسط Bracket and Oliphant طرح گردید و جهت کشت طولانی مدت اسپرم مناسب است(۲۳). این تحقیق طراحی شده تا ارتباطی بین اثر توامان گلوکز و اسید سیتریک بر تحرک و الگوی آن و بقای اسپرم بیابد.

مواد و روش کار

در تحقیق حاضر جهت به دست آوردن اسپرم اپیدیدیمی، بیضه های بالغ گاو از کشتارگاه های اطراف تهران در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال یافت و این انتقال به زمانی در حدود یک ساعت احتیاج داشت.

مطابق پژوهش Kaabi و همکاران در سال ۲۰۰۳ بهترین کیفیت اسپرم اپیدیدیمی از بیضه هایی که در کنار یخ ۵ درجه سانتی گراد حمل شده اند در مقایسه با آن هایی که در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد منتقل شده اند، حاصل می شود. سپس بیضه ها را از داخل تویکا آلبوژینا خارج کرده، قسمت دم اپیدیدیمی را با سرم فیزیولوژیکی ۳۷ درجه سانتی گراد شسته و با گاز استریل خشک نموده و با اسکالپل شماره ۲۱ شکافی را در قسمت فاقد عروق ایجاد کرده و با فشار دادن این قسمت یک قطره مایع سرشار از اسپرم داخل پلیت حاوی ۲ سی سی محیط BO ۳۷ درجه سانتی گراد ریخته و جهت جلوگیری از به هم چسبیدن اسپرم ها (اگلونیناسیون) چند مرتبه توسط سمپلر نمونه را مخلوط نمودند و محیط فوق در شرایط استریل تهیه شده است. سپس نمونه ذکر شده را در انکوباتور دارای ۵٪ از گاز CO_2 در هوای مرطوب و درجه حرارت ۳۸ درجه سانتی گراد قرار داده شد. جهت شمارش اسپرم های رقیق شده و تعیین غلظت نمونه به دست آمده با استفاده از لام نئوبار دقت مناسب اسپرم را تهیه کرده به طوری که حدود ۶-۴ میلیون اسپرم در میلی لیتر در هر محیط وجود داشته باشد زیرا تراکم بیش از حد اسپرم در محیط BO موجب اشتباه در آزمایش می شود. محیط‌های مورد آزمایش ما دارای BSA و Na pyruvate و$NaHco_3$ و $Mgcl_2$ و $6H_2o$ و NaH_2Po_4 و $2H_2o$ و $Cacl_2$ و Kcl و Nacl و D glucose و ۲ غلظت مختلف گلوکز ۰/۶۲۵ و ۱/۲۵ گرم بر لیتر در حضور و عدم حضور اسید سیتریک است.

سپس محیط های حاوی نمونه اسپرم رقیق شده را در انکوباتور با دمای ۳۸ درجه و غلظت ۵٪ از گاز Co_2 قرار داده و در ساعات ۱ و ۲ و ۳ و ۴ و ۶ و ۸ اسپرم ها از لحاظ پارامترهای زیر با استفاده از دستگاه CASA مورد ارزیابی قرار گرفتند.

- اسپرم های متحرک با سرعت بالا class A
- درصد اسپرم های متحرک با حرکت سریع و آهسته ClassA+B
- درصد اسپرم های زنده [۱]
- میانگین سرعت حرکت سر اسپرم در یک خط مستقیم (میکرومتر بر ثانیه) VSL [۲]
- میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر منحنی (میکرومتر بر ثانیه) VCL [۳]
- میانگین سرعت اسپرم در میانگین مسیر واقعی (میکرومتر بر ثانیه) VAP [۴]
- فرکانسی که در آن سر اسپرم مسیر میانگین حرکت اسپرم را قطع می کند (هرتز) BCF [۵]

آنالیز آماری

پس از اندازه گیری پارامترهای مختلف حرکت توسط سیستم CASA در محیط‌های BO در حضور و عدم حضور اسید سیتریک تا مدت ۸ ساعت انکوباسیون، داده های به دست آمده برای هر گروه تعیین گردید و توسط آزمون آماری One Way Anova و تست های تکمیلی Turkey و Sheffe مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت و مرز استنتاج آماری مورد قبول برای بررسی اختلاف میانگین ها ($P<0/05$) در نظر گرفته شد.

۱ Live ratio
۲ Straight Line Velocity
۳ Curvilinear velocity
٤ Average Path Velocity
٥ Beat Cross Frequency

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج:

جدول ۱ درصد اسپرم هایی که حرکت سریع دارند در دو غلظت G۱ و G۲ گلوکز در حضور و عدم حضور اسید سیتریک نمایش می دهد. جدول بر اساس میانگین ± خطای استاندارد تنظیم شده است.

اسپرم ها از لحاظ میزان حرکت سریع در ساعت ۶ در حضور اسید سیتریک افزایش معنی دار نشان دادند ($P<۰/۰۵$) در حالی که چنین افزایشی در غلظت G۲ گلوکز مشاهده نگردید.

جدول ۲ درصد اسپرم های متحرک را در دو غلظت G۱ و G۲ گلوکز در حضور و عدم حضور اسید سیتریک نشان می دهد. جدول بر اساس میانگین ± خطای استاندارد تنظیم شده است.

از لحاظ درصد اسپرم های متحرک در غلظت G۱ گلوکز در حضور اسید سیتریک در ساعت ۴ و ۶ افزایش معنی دار نشان دادند ($P<۰/۰۵$) در حالی که چنین اثری در غلظت G۲ گلوکز در حضور اسید سیتریک مشاهده نشد.

جدول ۳ نشانگر درصد اسپرم های زنده در دو غلظت G۱ و G۲ گلوکز در حضور و عدم حضور اسید سیتریک است. جدول بر اساس میانگین ± خطای استاندارد تنظیم شده است.

اسپرم ها از لحاظ درصد ماندگاری در حضور اسید سیتریک در ساعت ۲ و ۴ افزایش معنی دار نشان دادند. درحالی که چنین افزایشی در غلظت G۲ گلوکز و اسید مشاهده نشد.

جدول ۴ میانگین سرعت حرکت سر اسپرم در یک خط مستقیم برحسب میکرومتر بر ثانیه در غلظت های G۱ و G۲ گلوکز در حضور و عدم حضور اسید سیتریک را نشان می دهد . جدول بر اساس میانگین ± خطای استاندارد تنظیم شده است. گروه ها با یکدیگر فاقد اختلاف معنی دار بودند.

جدول ۵ سرعت حرکت اسپرم در مسیر منحنی (میکرومتر بر ثانیه) در قسمت های G۱ و G۲ گلوکز در حضور و عدم حضور اسید سیتریک را نشان می دهد. جدول براساس میانگین ± خطای استاندارد تنظیم شده است. گروه ها با یکدیگر فاقد اختلاف معنی دار بودند.

جدول ۶ میانگین سرعت حرکت اسپرم در میانگین مسیر واقعی (میکرومتر بر ثانیه) در غلظت های G۱ و G۲ گلوکز در حضور و عدم حضور اسید سیتریک را نشان می دهد. جدول بر اساس میانگین ± خطای استاندار تنظیم شده است. گروه ها با یکدیگر فاقد اختلاف معنی دار بودند .

جدول ۷ فرکانسی که در آن سر اسپرم میانگین حرکت اسپرم را قطع می کند (هرتز) در غلظت‌های G۱ و G۲ گلوکز در حضور و عدم حضور اسید سیتریک را نشان می دهد. جدول بر اساس میانگین ± خطای استاندار تنظیم شده است. گروه ها با یکدیگر فاقد اختلاف معنی دار بودند.

زمان آزمایش						
هشتم	ششم	چهارم	سوم	دوم	اول	
56/1±3/2	57/13/9	51/7±±2/6	56/8±7/9	45± 0/7	51/2±3/8	G_1+A
48/6±6/6	35±3	41/2±2/9	49/5±1/8	34/4±3/9	51/3±3/6	G_1
50/1±4/6	60/5±35/3	54/4±4/5	56/2±4/5	48/7±54/4	43/9± 6/7	G_2+A
47/7±0/8	47/2±2/7	50/2±4	52/4±5/3	50/8±4/2	48± 2/4	G_2

جدول ۱ – بررسی نتایج اثر گلوکز و اسید سیتریک بر پارامتر class A

زمان آزمایش						
هشتم	ششم	چهارم	سوم	دوم	اول	
79/4±5/2	71/6±6/3	73/4±1/4	77/9±3/8	68/6±2/3	80/5±1/6	G_1+A
91/7±5/	86/1±2/	85/7±1/	90/3±4	80/6±1/	84/3±1/	G_1
3	7	9		8	8	
85/3±0/7	85±0/5	85/5±3/2	86/9±4/3	81/1±5/1	80/5±0/8	G_2+A
83/1±1/4	88/9±1/8	88/1±2/6	88/4±1/3	84±2/4	82/7±2/7	G_2

جدول ۲ – بررسی نتایج اثر گلوکز و اسید سیتریک بر پارامتر class B

زمان آزمایش						
هشتم	ششم	چهارم	سوم	دوم	اول	
79/4±5/2	71/6±6/3	73/4±1/4	77/9±3/8	68/6±2/3	80/5±1/6	G_1+A
91/7±5/3	86/1±2/7	85/7±1/9	90/3±4	80/6±1/8	84/3±1/8	G_1
85/3±0/7	85±0/5	85/5±3/2	86/9±4/3	81/1±5/1	80/5±0/8	G_2+A
83/1±1/4	88/9±1/8	88/1±2/6	88/4±1/3	84±2/4	82/7±2/7	G_2

جدول ۳ – بررسی نتایج اثر گلوکز و اسید سیتریک بر پارامتر live ratio

www.SID.ir

Archive of SID

	زمان آزمایش					
	اول	دوم	سوم	چهارم	ششم	هشتم
G_1+A	53/8±2/6	52/5±1/3	56/1±3/6	53/1±0/3	56/6±2/2	55/3±3/1
G_1	68/7±9/2	54/3±4/2	66/7±2/9	60/5±2/9	57/1±3/6	65/1±5/3
G_2+A	46/8±5/5	53/1±2/8	56/1±2/7	53/5±2/5	56/6±2/2	55/3±3/1
G_2	58/4±4/1	56/2±1/1	47/5±5/9	61/7±4	57/7±4/8	55/3±4

جدول ۴– بررسی نتایج اثر گلوکز و اسید سیتریک بر پارامتر vsl

	زمان آزمایش					
	اول	دوم	سوم	چهارم	ششم	هشتم
G_1+A	80/3±1	76/6±1/6	77/8±3/8	78/9±1/4	80/6±1/4	77/6±4/4
G_1	84±3/4	76/8±4/4	86/2±3	82/5±2/9	87/7±3/8	85/6±6/5
G_2+A	70/4±3/3	78/4±3	87/4±2/4	77/7±3	87/5±1/5	80/77±2/5
G_2	85/6±5	77±4/3	74/6±6	85±5/7	81/9±4/9	82±5

جدول ۵ – بررسی نتایج اثر گلوکز و اسید سیتریک بر پارامتر vcl

	زمان آزمایش					
	اول	دوم	سوم	چهارم	ششم	هشتم
G_1+A	60/1±2/4	58/9±1/1	61/8±3/9	59/6±0/3	64/2±1/8	60/7±3/7
G_1	67/4±3	60/1±4/2	72/5±3/1	66±2/6	62/5±3/4	70/2±5/6
G_2+A	52/7±5/5	59/3±2/8	61/8±2/6	59/6±2/4	68/6±2/2	62/1±3/6
G_2	64/4±4/1	62±1/5	63±6	67/9±4/2	63/7±5/1	61/5±4/2

جدول ۶ – بررسی نتایج اثر گلوکز و اسید سیتریک بر پارامتر VAP

	زمان آزمایش					
	اول	دوم	سوم	چهارم	ششم	هشتم
G_1+A	5/5±0/6	7/2±0	5/7±0/8	5/7±0/9	5±0/9	6/8±0/4
G_1	5/8±0/9	7/6±0/2	6/7±0/4	7/3±0/2	8/2±0/4	6/8±0/5
G_2+A	7/3±0/5	6±1	4/9±0/7	5/9±0/9	6/1±0/2	6/8±0/4
G_2	6/9±0/2	6/2±1	1/6±5/7	6/8±0/6	7/2±0/6	5/8±0/6

جدول ۷ – بررسی نتایج اثر گلوکز و اسید سیتریک بر پارامتر BCF

بحث

تحرک اسپرم از پارامترهای مهمی است که در تحقیق های انجام گرفته در زمینه ناباروری بسیار مورد توجه قرار می گیرد از جمله فاکتورهای تاثیر گذار بر آن می توان به متابولیسم اسپرم و منبع انرژی مورد استفاده برای این سلول های اشاره نمود(۴،۵،۱۲) .گزارش هایی حاکی از وجود مقادیر مختلفی گلوکز در پلاسمای سمینال جانوران مختلفی هم چون گاو میش، سگ، انسان ارائه شده است(۱،۲۰،۲۲) . هم چنین میزان گلوکز وقتی که منی در دمای بدن انکوبه می شود کاهش یافته و در طی این مسیر الگوی حرکت اسپرم تغییر می کند (۱). نیز دلایلی حاکی از توانایی اسپرم برخی جانوران مانند سگ جهت گلوکونئوژنز وجود دارد و این امر آن ها را قادر می سازد که در محیط های فاقد گلوکز متحرک بماند (۲۰). گزارش ها در بررسی حرکت اسپرم سگ حاکی از تاثیر گذار بودن غلظت گلوکز بر نوع حرکت اسپرم و فاکتورهای VCL, BCF, ALH در این جانور می باشد. گزارش های متناقض می تواند به خاطر تجویز دوزهای مختلف این ماده و نوع جانور مورد آزمایش باشد (۲۰).

از طرفی منی پستانداران عالی محتوی مقادیر بسیار بالا اسید سیتریک است و بسیاری از تشکیل دهنده های منی به عنوان یک منبع انرژی نقشی در تحرک اسپرم دارند(۱۱) و وجود اسید سیتریک در منی بیش از ۱۰۰ گونه جانوری گزارش گردیده(۱۰،۲۲) به علاوه اسید سیتریک می تواند در برقراری یک بالانس اسمزی برای اسپرم موثر بوده و از این طریق در تحرک آن موثر باشد(۱۳). در این تحقیق به تاثیر این دو ماده در محیط حاوی دو غلظت G۱ و G۲ گلوکز در حضور و عدم حضور اسید سیتریک پرداخته و پس از افزودن اسپرم به این محیط ها تا ۸ ساعت انکوباسیون از لحاظ ماندگاری الگوی حرکت اسپرم بررسی شده اند.

در مقایسه تحرک اسپرم در محیط BO پارامتر Class A در غلظت G۱ گلوکز در حضور اسید سیتریک در مقایسه با محیط فاقد اسید سیتریک در ساعت ششم افزایش معنی دار مشاهده شد.

در مقایسه اسپرم های متحرک نیز شاهد افزایش آن در حضور اسید سیتریک و غلظت G۱ گلوکز هستیم و درساعت های ۴ و ۶ گروه ها دارای اختلاف معنی دار بودند.

هم چنین از لحاظ میزان درصد اسپرم های زنده نیز در ساعات مختلف شاهد افزایش بوده و در ساعت های ۲ و ۴ گروه ها با یکدیگر دارای اختلاف معنی دار بودند.

این نتایج در توافق با برخی گزارشات حاکی از افزایش تحرک اسپرم در نتیجه افزودن اسیدسیتریک به محیط نگه داری اسپرم است (۲،۱۷). گزارشات در موش نیز حاکی از این است که افزودن اسید سیتریک به محیط نگه داری اسپرم موجب افزایش تحرک و در نتیجه افزایش میزان باروری در IVF می شود(۱۴) .

www.SID.ir

Archive of SID

احتمالا نقش اخیر در افزایش تحرک از طریق متابولیزه شدن این ماده توسط این سلول هاست.

نتیجه گیری

از مجموع این نتایج چنین برمیآید که در گاو، اسید سیتریک بر تحرک و ماندگاری اسپرم نقش افزاینده دارد و احتمالا می تواند میزان باروری را از این طریق بالا ببرد. حال آن که چنین اثری در غلظت G۲ گلوکز مشاهده نشد. محتمل است که چنین اثری از طریق تامین یک منبع انرژی مازاد بر گلوکز باشد.

در هر دو غلظت G۱ و G۲ گلوکز پارامترهای VSL, VCL, VAP, BCF بین گروه ها فاقد اختلاف معنی دار بودند که نشان می دهد اگر چه اسید سیتریک در غلظت G۱ گلوکز بر بقا و تحرک اسپرم نقش افزاینده دارد ولی بر الگوی حرکتی آن ها بی اثر است و احتمالا علت بی تاثیری آن در ماندگاری و تحرک در غلظت G۲ گلوکز ترجیح سلول های جنسی در استفاده از گلوکز به جای اسید سیتریک است. این که اسید سیتریک با چه تاثیرگذاری و از چه طریق چنین نقش محرکی را بر ماندگاری و سرعت حرکت اسپرم ایجاد می کند و در همان حال بر الگوی حرکت اسپرم فاقد تاثیر می ماند مشخص نیست. این درحالی است که احتمال می دهیم این ماده در غلظت G۱ گلوکز نقش مکمل را در تهیه انرژی برای این سلول ها ایفا کند.

پیشنهادها:

- بررسی دوزهای متفاوتی از گلوکز در محیط های مذکور.
- بررسی دوزهای متفاوت اسید سیتریک بر تحرک اسپرم.
- بررسی نقش اسید سیتریک بر قطره پروتوپلاسمی و تحرک اسپرم در محیط های فوق.

سپاسگزاری:

از جناب آقای دکتر پرویز تاجیک به خاطر دراختیار قرار دادن سیستم کاسا جهت انجام این پژوهش نهایت قدردانی را دارم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Abdelhakem, A.A & Zenat, R.B.. Storage ability and survival of French Alpine goat, spermatozoa as effected by the type of extender and sugar. Anim. Reprod. Sci. 1991; 53: p. 3-22.

2. Agarwal, V.K. Ram, L. Rai, A.K. Khanna, N.D. &. Agarwal, S.P. Physical & biochemical attributes of camel semen.J.Camel Sci. 2004;.2, (5): p. 16-24.

3. Aman, R.P. & J.O. Almguist. Maturation changes in bull epididymal spermatozoa. J. Dairy sci. 1962; 45: p. 1516.

4. Andrew C. Williams & W. Christopher, L. Ford. The role of glucose in supporting motility & capacitation in human spermatozoa. J. androl. 2001; 22, (4): p. 680-691.

5. Anna Gergely, Ertug Kovanci, Levent Senturk, Eric Cosmi. Morphometric assessment of mature & diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. Hum. Reprod. 1999; 14, (8): p. 2007-2014.

6. Bajpai,M. & Doncel, G.F. Involvement of tyrosine Kinase & cAMP-dependent Kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. Reprod. 2003; p. 126-183-195.

7. Bayard T. Story & Fredrick J. Kayne. Energy metabolism of spermatozoa, Interactions between lactate, pyruvate & malate as oxidative substrates for rabbit sperm mitochondria. Biol. Reprod. 1978; 18: p. 527-536

8. Boatman D.E. & Robbins, R.S. Bicarbonate carbon dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility & acrosome reactions. Biol. Reprod. 1991; 44: p. 806-813.

9. Branton C & Salisbury GW. Morphology of spermatozoa from different levels of the reproductive tract of the bull. J anim sci. 1947; 6: p. 154-160.

10. Brokaw C.J. Direct measurement of sliding between outer doublets in swimming sperm flagellar. Sci. 1989; 243: p. 1593-1596.

11. Brown Woodman P.D., Post EJ, Chow PY, white IG. Effect of malonic, maleic, citric & coffeic acids on the motility of human sperm & penetration of cervical mucus. Int j fertile. 1985; 30 (3): p. 38 44

12. Chandler, J.E., Degelos, S.D., Canal, A.M. & Paul, J.B. A technique for the evaluation of sperm penetrating ability and quality of bovine semen processed in an extender made with Brackett-Oliphant medium and egg yolk. Theriogenology. 1999; 51: p. 1467-1476.

www.SID.ir

Archive of SID

13. Chantler, E, Abraham- Peskir, J. Significance of midpiece vesicles & functional intergrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress. 2004; 36: p. 87- 93.

14. Cooper TG. Yeung CH. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis & the role of cytoplasmic droplet. Micros Res Tech. 2003; (61): p. 28-38.

15. Dajsuter, P.Y.W. Chow, & I.C.A. Martin. Maintenance of motility in human spermatozoa by energy derived through oxidative phosphorylation & addition of albumin. Biol Reprod. 1979; 20: p. 505-510.

16. Dana, A & Alan, Assessment of sperm function and clinical aspects of impaired sperm. FunctFront Biosci. 1996; 1: p. 96-108.

17. David L. Garbers, Takashi Wakabayashi, & Peter W. Reed. Enzyme profile of the cytoplasmic Droplet from bovine epididymal spermatozoa. Biol Reprod. 1970; 3: p. 327-337.

18. Desnoyers, L. & Manjunath, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. J. Biol. Chem. 1992; 267: (14): p. 10149-10155.

19. Dietz, R.W. & Flipse, R.J. Metabolism of bovine semen. Biol. Reprod. 1969; 1: p. 200-206.

20. Dobrinski I, Lulai C, Barth AD. Post K. Effect of four different extenders & three different freezing rates on post thaw viability of dog semen. J. Reprod fertil suppl. 1993; 47: p. 291-290.

21. Elzanaty S., Richthoff J., Malm J. & Giwercman A. The impact of epididymal & accessory sex gland on sperm motility. Hum. Reprod. 2002; 17: (11): p. 2904-2911.

22. Fawcett, D.W. The mammalian spermatozoon. Dev Biol. 1975; 44: p. 394-436

23 . Emady L.Babapour V.,Tajic P.,Effect of different concentrations of calcium on motility pattern of bovine epididymal Sperm in modified BO. J. Vet. Res2007. 62: (3) 177-182.

www.SID.ir