

استفاده از روشی کارآمد برای جداسازی اسپرم‌های با تحرک کم و زیاد در منی تازه تیمار شده با Resiquimod (R848) در نریان، باهدف جداسازی اسپرم‌های حامل کروموزوم X از Y

سید پوریا حسینی^۱، علی کدیور^{۲*}، ناصر شمس اسفندآبادی^۲، نجمه داودیان^۲،
سید عباس میرزایی^۴

۱. دانشجوی دستیاری رشته مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۴. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد- ایران.

پذیرش: ۲۸ مردادماه ۱۴۰۴

دریافت: ۱۹ خردادماه ۱۴۰۴

چکیده

هدف از مطالعه حاضر تنظیم و بهینه‌سازی روشی کارآمد برای جداسازی اسپرم‌های کم‌تحرک و پرتحرک تیمار شده با Resiquimod (R848) در اسب بود، با این هدف که بتوان از این روش در تولید اسپرم تعیین جنسیت شده در اسب استفاده کرد. در مطالعه حاضر، نمونه منی تازه از سه نریان متفاوت در سه تکرار اخذ شد. برای تعداد ۳۰ میلیون اسپرم، فرایند Swim-up در محیط HTF برای مدت زمان ۳۰ دقیقه انجام شد. در پایان، ۵ لایه مختلف، به ترتیب از بخش بالایی محیط به سمت پایین جداسازی شدند. چهار دز ۰/۰۶ (D_{۰/۰۶})، ۰/۱۲ (D_{۰/۱۲})، ۰/۱۶ (D_{۰/۱۶}) و ۰/۲۴ (D_{۰/۲۴}) میکرولیتر از Resiquimod با غلظت ۳ میکرومولار مورد آزمایش قرار گرفتند و با گروه‌های کنترل بدون Resiquimod از نظر شاخص‌های مختلف حرکتی اسپرم مقایسه شدند. دزهای D_{۰/۱۲}، D_{۰/۱۶} و D_{۰/۲۴} سبب کاهش معنی‌دار در شاخص‌های مرتبط با سرعت حرکت اسپرم در اغلب لایه‌های برداشت شده شدند ($P < 0/05$). برای دز D_{۰/۱۶}، شاخص VSL در لایه‌های دوم و سوم (از بالا به پایین) در گروه درمان نسبت به کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد ($P < 0/05$). همچنین دز D_{۰/۱۶} سبب کاهش معنی‌دار در شاخص‌های سرعت حرکت اسپرم در ۲ لایه پایینی شد ($P < 0/05$). در بالاترین لایه برداشت شده در این دز، میزان VSL در گروه درمان بیش از گروه کنترل بود ($P < 0/05$) و ۲ شاخص VCL و VAP اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کنترل و درمان نداشتند ($P > 0/05$). در مجموع بهترین دز استفاده شده در این مطالعه که منطقی‌ترین تغییرات را در شاخص‌های حرکتی اسپرم در لایه‌های برداشت شده داشت دز D_{۰/۱۶} بود.

واژه‌های کلیدی: اسپرم اسب، Swim-up، Resiquimod، شاخص‌های حرکتی اسپرم

مقدمه

و دست‌ورزی‌های مربوط به آن در گاو حاصل شده است، به شکلی که امروزه در میان تمام گونه‌های اهلی، استفاده از اسپرم تعیین جنسیت شده در گاو بسیار رایج‌تر است (۹). در صنعت پرورش اسب، استفاده از اسپرم تعیین جنسیت شده ارزش اقتصادی قابل توجهی دارد. ارزش اقتصادی کره اسب‌های نر و ماده، بسته به نوع کاربرد نژاد خاص اسب و همچنین کیفیت ژنتیکی نریان‌ها و مادریان‌های مولد آن‌ها، به طور قابل توجهی متفاوت است. با این وجود، استفاده از

در صنعت پرورش دام‌های اهلی، جداسازی اسپرم‌های حاوی کروموزوم جنسی X و Y به منظور تولید نتاج با جنسیت دلخواه دارای اهمیت اقتصادی زیادی است. در نتیجه، روش‌های مختلفی برای تشخیص و جداسازی مؤثر اسپرم‌های حاوی کروموزوم‌های X از Y توسعه یافته و مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. پیشرفت‌های قابل توجهی در زمینه توسعه روش‌های تولید اسپرم تعیین جنسیت شده



اسپرم تعیین جنسیت شده در صنعت پرورش اسب به اندازه گاو گسترش نیافته است. دلایل متعددی برای این امر وجود دارد. از جمله دلایل غیر مستقیم، وجود تفاوت‌های قابل توجه در فیزیولوژی چرخه فحلی بین گاو و اسب است. در مادیان، دوره فحلی طولانی‌تر از گاو است که امکان استفاده از اسپرم منجمد را سخت می‌کند. برای به حداکثر رساندن احتمال لقاح، تلقیح با اسپرم منجمد باید در یک بازه زمانی بسیار محدود در حوالی زمان تخمک‌گذاری انجام شود. تنظیم این زمان بندی در مادیان‌ها به دلیل مدت زمان طولانی فحلی آن‌ها، چالش برانگیزتر است. به طور کلی، استفاده از اسپرم منجمد در مادیان در مقایسه با گاو چالش‌های بیشتری را دارد و دستیابی به باروری مطلوب در این روش، مستلزم توجه دقیق به عوامل کلیدی متعددی است (۵). از آنجایی که معمولاً پس از تعیین جنسیت اسپرم، آن را برای ذخیره‌سازی و استفاده‌های بعدی منجمد می‌کنند، همان محدودیت‌هایی که برای استفاده از اسپرم منجمد در مادیان وجود دارد، در مورد اسپرم تعیین جنسیت و منجمد شده نیز صادق است. علاوه بر این مورد، مهمترین دلیل محدودیت دسترسی به اسپرم تعیین جنسیت شده در اسب، روش فعلی جداسازی است که چالش برانگیز، گران و با راندمان پایین تولید است. در حال حاضر، فلوسایتومتری پرکاربردترین روش تجاری برای تولید اسپرم تعیین جنسیت شده است. در پستانداران اسپرم‌های حاوی کروموزوم‌های X و Y از نظر محتوای DNA متفاوت هستند و همین اساس جداسازی آن‌ها در روش فلوسایتومتری است، به صورتی که DNA اسپرم با رنگ فلورسنت رنگ‌آمیزی شده و با تشخیص تفاوت در شدت نور فلورسنت ساطع شده، تمایز بین اسپرم‌های حاوی کروموزوم X و Y امکان‌پذیر می‌شود. در طی سال‌های گذشته، استفاده از فلوسایتومتری در تعیین جنسیت اسپرم منجر به توسعه یک روش تجاری موفق مبتنی بر جداسازی سلول‌های فعال‌شده با فلورسانس (FACS) شده است. با این حال، استفاده از این روش در تعیین جنسیت اسپرم معایبی دارد که کاربرد گسترده آن را محدود می‌کند. از جمله این معایب، می‌توان به سرعت پایین جداسازی، آسیب به اسپرم، میزان باروری پایین و هزینه بالای تولید اسپرم تعیین جنسیت‌شده اشاره کرد (۱۶).

Umehara و همکاران در سال ۲۰۱۹، توالی‌یابی rRNA روی اسپرم موش انجام دادند تا تفاوت‌های موجود را از این نظر بین اسپرم‌های حاوی کروموزوم X و Y مشخص کنند. این محققین دریافتند که گیرنده شبه تول ۷ (TLR7) و گیرنده شبه تول ۸ (TLR8) منحصراً در اسپرم X وجود دارند. TLR7 در دم و TLR8 در قطعه میانی اسپرم قرار دارند (۱۴). این دو ناحیه، بخش‌های کلیدی مسئول تولید ATP در سلول اسپرم هستند (۲). ترکیب Resiquimod (R848) یک فعال‌کننده TLR7 و TLR8 است و انکوباسیون اسپرم موش با این ترکیب، فعالیت گلیکولیتیک و سنتز ATP را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. بر اساس این یافته‌ها، Resiquimod تولید ATP را در اسپرم‌های حاوی کروموزوم X کاهش داد و منجر به کاهش تحرک، به ویژه در شاخص‌های سرعتی حرکت اسپرم شد. بنابراین، هنگامی که بتوان اسپرم‌های با تحرک کم و زیاد را به طور مؤثر و کارآمد از هم جدا کرد، روش استفاده از Resiquimod را می‌توان برای جداسازی اسپرم‌های حاوی کروموزوم X و Y مورد استفاده قرار داد. این روش با موفقیت برای تولید اسپرم تعیین جنسیت شده در گاو نر و موش به کار گرفته شده است (۱۵). مطالعه Ren و همکاران نشان داد که فعال‌سازی TLR7/8 تحرک اسپرم‌های حامل کروموزوم X را کاهش می‌دهد و تولید اسپرم تعیین جنسیت شده بز را امکان‌پذیر می‌سازد (۱۰). از این روش می‌توان به راحتی در آزمایشگاه‌ها استفاده کرد زیرا به تجهیزات خاص و پیشرفته نیاز ندارد. نکته کلیدی این است که از آنجایی که این روش مبتنی بر جداسازی اسپرم‌ها از لحاظ میزان تحرک است، کارایی کلی آن کاملاً به میزان موفقیت در جداسازی اسپرم‌های کم‌تحرک از اسپرم‌های پرتحرک بستگی دارد. در مطالعات فوق که بر روی اسپرم رت، گاو نر و بز انجام شدند، برای جداسازی اسپرم‌های کم‌تحرک از پرتحرک، از روش Swim-up استفاده شد. عوامل متعددی از جمله تحرک اولیه اسپرم، غلظت اسپرم، نوع محیط جداسازی و حجم آن، شکل ظروف مورد استفاده، دمای محیط کار و مدت‌زمان فرایند Swim-up، بر کارایی روش Swim-up تأثیر می‌گذارند. (۱۲ و ۱۳).

میزان ۲ میلی لیتر از محیط HTF درون چندین لوله فالكون ریخته شد و سپس لوله‌ها به منظور تنظیم دما در انکوباتور 37°C قرار گرفتند. نمونه‌های اولیه منی در میکروتیوب‌های $1/5$ میلی لیتری ریخته شده و به مدت ۳ دقیقه در دور $400 \times \text{g}$ سانتریفیوژ شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از پلت به دست آمده از اسپرم‌های سانتریفیوژ شده در کف لوله‌های فالكون ریخته شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از طی زمان مذکور، ۱۵۰۰ میکرولیتر از لایه رویی محیط از هر کدام از لوله‌های فالكون برداشت شده و اسپرم‌های جمع‌آوری شده از تمام لوله‌ها در یک لوله فالكون جمع‌آوری شد و مجدداً با استفاده از دستگاه CASA مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه اسپرم Swim شده پس از تعیین غلظت با استفاده از لام هموسایتومتر و با روش زیر وارد آزمایش اصلی مطالعه شد (۱۱):

میزان رقیق‌سازی $10000 \times$ تعداد اسپرم شمارش شده در ۲۵ مربع کوچک لام = تعداد اسپرم در ۱ میلی لیتر
حجمی از محیط حاوی اسپرم Swim شده که بر اساس شمارش تعداد ۳۰ میلیون اسپرم داشت به میکروتیوب $1/5$ میلی لیتری منتقل و به مدت ۳ دقیقه در دور $400 \times \text{g}$ سانتریفیوژ شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ، پلت اسپرم موجود در میکروتیوب، به آرامی به کف لوله فالكون حاوی ۲ میلی لیتر محیط HTF که در گروه‌های درمانی دارای Resiquimod و در گروه‌های کنترل بدون Resiquimod بود منتقل و سپس در انکوباتور 37°C قرار داده شد. فرایند Swim-up برای مدت زمان ۳۰ دقیقه به انجام رسید. در این مطالعه و به منظور مشخص کردن موثرترین غلظت Resiquimod در جداسازی اسپرم، گروه‌های درمانی به شرح زیر بودند:

گروه درمانی اول (D.۱/۰۶): مقدار $0/06$ میکرولیتر از Resiquimod با غلظت ۳ میکرومولار استفاده شد.
گروه درمانی دوم (D.۱/۱۲): مقدار $0/12$ میکرولیتر از Resiquimod با غلظت ۳ میکرومولار استفاده شد.
گروه درمانی سوم (D.۱/۱۶): مقدار $0/16$ میکرولیتر از Resiquimod با غلظت ۳ میکرومولار استفاده شد.
گروه درمانی چهارم (D.۱/۲۴): مقدار $0/24$ میکرولیتر از Resiquimod با غلظت ۳ میکرومولار استفاده شد.

باتوجه به اهمیت اقتصادی تعیین جنسیت اسپرم در صنعت تولید و پرورش اسب، هدف از این مطالعه تنظیم و بهینه‌سازی روشی کارآمد برای جداسازی اسپرم‌های کم‌تحرك و پرتحرك تیمار شده با Resiquimod در اسب بود، با این هدف که بتوان از این روش در تولید اسپرم تعیین جنسیت شده در اسب استفاده کرد.

مواد و روش کار

این پژوهش به‌وسیله کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه شهرکرد مورد تصویب قرار گرفت (شناسه: IR.SKU.REC.1402.053).

مواد مورد استفاده در این پژوهش برای ساخت محیط HTF و همچنین Resiquimod از شرکت سیگما آلدْرِیچ آلمان تهیه شدند. محیط مورد استفاده در این پژوهش برای نگهداری و جداسازی اسپرم، محیط HTF بود. میزان مواد حل شده در ۱۰ سی‌سی آب مقطر جهت ساخت محیط بدین شرح بود: $0/0594$ گرم کلرید سدیم، $0/0035$ گرم کلرید پتاسیم، $0/0005$ گرم سولفات منیزیم، $0/0005$ گرم فسفات پتاسیم، $0/003$ گرم کلرید کلسیم، $0/0048$ گرم بی‌کربنات سدیم، $0/002$ گرم سدیم پیرووات، $0/0007$ گرم پنی‌سیلین جی، $0/0005$ گرم استرپتومایسین، $0/238$ گرم HEPES-free acid، $0/26$ گرم HEPES-Nasalt، $0/05$ گرم آلبومین سرم گاوی، $0/005$ گرم گلوکز، $34/2$ میکرولیتر سدیم لاکتات.

در این مطالعه، نمونه منی تازه از نریان‌ها با استفاده از واژن مصنوعی و در حضور مادیان فحل اخذ شد. نمونه‌گیری از سه نریان مختلف در سه تکرار انجام شد. بخش ژلاتینی منی با استفاده از فیلتر نصب شده روی واژن مصنوعی جداسازی شد. نمونه منی تازه پس از اخذ، بلافاصله به نسبت ۱ به ۱ با محیط HTF مخلوط و بدون سردسازی درون فالكون‌های محصور شده در فویل جهت محافظت از نور، به آزمایشگاه منتقل شد. پس از بررسی اولیه تحرك اسپرم با دستگاه CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) (هوشمند فن‌آور تهران، ایران)، به منظور جداسازی اسپرم‌های غیر متحرك و مرده، به مدت ۳۰ دقیقه در لوله‌های فالكون به روش زیر Swim-up انجام شد.



متقابل دز مصرفی در لایه نمونه برداری و e_{ijk} نیز اثر تصادفی خطای آزمایش بود. مقایسه میانگین‌ها یا روش میانگین حداقل مربعات (Least squares means) و در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد ($P < 0.05$) انجام شد.

نتایج

جداول ۱ و ۲ نتایج مقایسه شاخص‌های مختلف حرکت اسپرم را در لایه و دزهای مختلف Resiquimod مطالعه شده نشان می‌دهند. ابتدا با استفاده از تجزیه و تحلیل آماری اثر دز Resiquimod به صورت مستقل مورد بررسی قرار گرفت، بدون اینکه نوع لایه برداشت شده پس از Swim-up دخیل گردد. نتایج نشان داد که کمترین مقدار شاخص‌های مربوط به سرعت حرکت اسپرم (VCL، VAP، VSL) مربوط به دز $D_{0.12}$ بود که اختلاف برای ۲ شاخص VCL و VAP نسبت به یکی از گروه‌های کنترل ($D_{0.24}$) معنی دار بود ($P < 0.05$). سایر شاخص‌ها نیز پس از تیمار با دز $D_{0.12}$ کاهش یافتند که این کاهش در شاخص WOB با گروه کنترل $D_{0.24}$ ، در شاخص MAD با گروه‌های کنترل $D_{0.12}$ ، $D_{0.16}$ و $D_{0.24}$ و در شاخص ALH با تمامی گروه‌های کنترل و درمان معنی دار بود ($P < 0.05$). در جداول ۱ و ۲، شاخص‌های حرکتی اسپرم در لایه‌های مختلف برداشت شده پس از انجام Swim-up نیز با یکدیگر مقایسه شده‌اند. در این مقایسه نیز مانند مورد قبل، تاثیر نوع لایه برداشت شده به صورت مستقل، با استفاده از تجزیه و تحلیل آماری مورد ارزیابی قرار گرفته است. مقادیر VCL، VSL، LIN، WOB، BCF و MAD در ۲ لایه پایین به طور معنی‌دار کمتر از ۳ لایه بالا بود ($P < 0.05$). در شاخص STR، کمترین مقدار مربوط به لایه D بود که با لایه‌های B و C اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0.05$). جداول ۳ و ۴ نتایج مربوط به تاثیر همزمان دز و لایه در شاخص‌های حرکت اسپرم را نشان می‌دهند. در بالاترین لایه برداشت شده (A)، استفاده از دز $D_{0.24}$ سبب بیشترین میزان کاهش در شاخص‌های سرعت حرکت اسپرم شده است. در این لایه برای شاخص‌های VCL، VSL، VAP، دزهای $D_{0.12}$ و $D_{0.24}$ سبب افت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل خود شدند. برای شاخص VAP دزهای $D_{0.16}$ ، $D_{0.12}$ و $D_{0.24}$ افت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ایجاد

در هر نوبت از انجام آزمایش، برای هر غلظتی از ترکیب Resiquimod که به عنوان گروه درمان مورد ارزیابی قرار می‌گرفت، گروه کنترل از نمونه اسپرم همان روز بدون اضافه کردن Resiquimod قرار داده شد. (گروه‌های کنترل به ترتیب $D_{0.12}$ ، $D_{0.16}$ ، $D_{0.24}$ و $D_{0.24}$ نام گذاری شدند). کلیه مراحل ذکر شده در فوق برای هر دو گروه به صورت مشابه به انجام رسید.

بعد از گذشت زمان ۳۰ دقیقه در هر دو گروه کنترل و درمان، ۵ لایه‌ی مختلف (A، B، C، D، E) به ترتیب از بخش بالایی محیط موجود در لوله فالتون به سمت پایین به این شرح بر اساس حجم جداسازی شدند: A: ۷۵۰ میکرولیتر، B: ۷۵۰ میکرولیتر، C: ۲۵۰ میکرولیتر، D: ۱۰۰ میکرولیتر و E: ۲۵۰ میکرولیتر. لایه‌های جداسازی شده بر روی صفحه گرم 37°C قرار داده شدند و سپس شاخص‌های حرکتی زیر با سیستم CASA مورد ارزیابی قرار گرفت.

VCL (Curvilinear Velocity): سرعت متوسط سلول اسپرم در طول مسیر واقعی، VAP (Average Path Velocity): سرعت طی شده سلول اسپرم در میانگین یک مسیر، VSL (Straight-Line Velocity): سرعت حرکت سلول اسپرم در یک خط مستقیم، ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement): میزان انحراف سر اسپرم به چپ و راست نسبت به مسیر اصلی حرکت آن، BCF (Beat Cross Frequency): بسامد عبور دم از خط میانی، STR (Straightness): راستای حرکت، به صورت نسبت VSL به VAP محاسبه می‌شود، LIN (Linearity): خطی بودن، به صورت نسبت VSL به VCL محاسبه می‌شود، WOB (Wobble): به صورت نسبت VAP به VCL محاسبه می‌شود، MAD (Mean Angular Displacement): میانگین جابجایی زاویه‌ای سر اسپرم در اطراف مسیر منحنی.

برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار (SAS, 2016) نسخه ۹/۴ و رویه GLM استفاده شد. بخاطر نامتعادل بودن تعداد مشاهدات در هر زیر گروه (متفاوت بودن تعداد مشاهدات) از این رویه استفاده شد. مدل نهایی به شرح زیر بود:

$$y_{ijk} = U + D_i + L_j + DL_{ij} + e_{ijk}$$

که y_{ijk} هر کدام از صفات مورد اندازه‌گیری، D_i اثر نوع دز مصرفی، L_j اثر تصادفی لایه نمونه برداری و DL_{ij} اثر

کردند. در دز D_{0.۱۶} میزان VSL در گروه درمان به طور معنی‌دار بیش از گروه کنترل بود ($P < 0.05$) و در شاخص

صفات مورد اندازه گیری

VCL; Curvilinear velocity, VSL; Straight-line velocity, VAP; Average path velocity, LIN; Linearity, STR; Straightness.

صفات مورد اندازه گیری

BCF; Beat cross frequency, MAD; Mean angular displacement, ALH; Amplitude of lateral head displacement, WOB; Wobble

از Resiquimod، مقدار ۰/۲۴ میکرولیتر از Resiquimod. (گروه‌های کنترل به ترتیب D_{0/۱۶C}, D_{0/۱۲C}, D_{0/۱۶C}, D_{0/۳۴C}). (لایه‌ها به ترتیب از بالا به پایین: A, B, C, D, E).

جدول ۳- میانگین $\pm$ خطای استاندارد الگوی حرکتی اسپرم در اثر متقابل دز در لایه

صفات مورد اندازه گیری					منبع تغییرات	
STR	LIN	VAP	VSL	VCL		
اثر دز* لایه						
۷۳/۳۰ $\pm$ ۱/۴۴ ^{cdbe}	۶۱/۹۵ $\pm$ ۱/۵۵ ^{ced}	۶۲/۹۵ $\pm$ ۱/۹۴ ^{gh}	۵۸/۱۰ $\pm$ ۱/۹۳ ^e	۷۰/۵۳ $\pm$ ۱/۸۷ ^{hji}	D./۰.۶	A
۶۵/۰۹ $\pm$ ۱/۳۴ ^{gfh}	۵۲/۵۹ $\pm$ ۱/۳۸ ^{hgif}	۷۴/۲۲ $\pm$ ۲/۳۴ ^{cde}	۵۷/۰۱ $\pm$ ۲/۰۹ ^{ef}	۸۴/۱۸ $\pm$ ۲/۲۷ ^{de}	D./۰.۶C	
۶۴/۴۹ $\pm$ ۱/۰۲ ^{ijk}	۴۸/۵۲ $\pm$ ۱/۰۲ ^{mnl}	۳۸/۴۹ $\pm$ ۱/۱۳ ^{mn}	۳۳/۶۳ $\pm$ ۱/۱۱ ^l	۴۷/۸۵ $\pm$ ۱/۱۰ ^{nm}	D./۱.۲	
۶۴/۵۶ $\pm$ ۰/۷۷ ^{gfh}	۵۱/۵۱ $\pm$ ۰/۷۹ ^{hgif}	۶۳/۸۱ $\pm$ ۱/۲۷ ^g	۴۸/۸۴ $\pm$ ۱/۱۴ ^{hfg}	۷۴/۸۹ $\pm$ ۱/۲۴ ^{ghf}	D./۱.۲C	
۷۵/۷۸ $\pm$ ۱/۷۱ ^{ab}	۶۳/۲۶ $\pm$ ۱/۸۴ ^{cd}	۶۱/۴۶ $\pm$ ۲/۲۰ ^{efg}	۵۵/۱۸ $\pm$ ۲/۱۷ ^e	۷۱/۴۲ $\pm$ ۲/۰۳ ^{ghfe}	D./۱.۶	
۵۰/۶۴ $\pm$ ۱/۵۶ ⁿ	۳۸/۲۵ $\pm$ ۱/۳۸ ^{qp}	۶۳/۳۹ $\pm$ ۲/۲۹ ^{gh}	۳۷/۳۶ $\pm$ ۱/۷۴ ^{jk}	۷۵/۴۸ $\pm$ ۲/۲۸ ^{ghf}	D./۱.۶C	
۶۵/۳۸ $\pm$ ۱/۶۶ ^{gijh}	۴۸/۳۶ $\pm$ ۱/۶۸ ^{mnlk}	۳۱/۳۸ $\pm$ ۱/۵۱ ^o	۲۶/۷۷ $\pm$ ۱/۵۰ ^{mn}	۴۱/۶۹ $\pm$ ۱/۴۶ ^{npo}	D./۲.۴	
۷۲/۷۹ $\pm$ ۱/۹۱ ^{abc}	۶۳/۷۸ $\pm$ ۲/۰۷ ^{abc}	۱۰۱/۹۴ $\pm$ ۳/۵۱ ^a	۸۳/۴۸ $\pm$ ۳/۳۳ ^{ab}	۱۱۳/۲۴ $\pm$ ۳/۴۰ ^a	D./۲.۴C	
۷۸/۶۵ $\pm$ ۱/۰۸ ^a	۶۷/۰۷ $\pm$ ۱/۲۵ ^{ab}	۶۸/۹۹ $\pm$ ۱/۷۲ ^{cd}	۶۳/۴۳ $\pm$ ۱/۷۱ ^{cd}	۷۶/۶۹ $\pm$ ۱/۶۴ ^{fe}	D./۰.۶	B
۶۴/۵۰ $\pm$ ۱/۲۴ ^{gih}	۵۲/۵۵ $\pm$ ۱/۲۷ ^{hgf}	۶۴/۸۰ $\pm$ ۲/۰۸ ^{gh}	۵۰/۸۱ $\pm$ ۱/۸۳ ^{fg}	۷۳/۷۸ $\pm$ ۲/۰۴ ^{ghji}	D./۰.۶C	
۶۸/۲۰ $\pm$ ۰/۶۸ ^{gf}	۵۱/۴۵ $\pm$ ۰/۶۹ ^{hgij}	۴۰/۳۴ $\pm$ ۰/۷۹ ^l	۳۴/۹۳ $\pm$ ۰/۷۷ ^{lk}	۴۹/۵۰ $\pm$ ۰/۷۸ ^m	D./۱.۲	
۶۵/۷۲ $\pm$ ۱/۰۳ ^{gih}	۵۳/۸۹ $\pm$ ۱/۰۵ ^{gf}	۷۴/۳۳ $\pm$ ۱/۷۱ ^{cd}	۵۹/۴۹ $\pm$ ۱/۵۷ ^e	۸۴/۱۴ $\pm$ ۱/۶۸ ^{de}	D./۱.۲C	
۷۴/۶۸ $\pm$ ۱/۷۶ ^{abc}	۶۰/۹۵ $\pm$ ۱/۹۵ ^{ced}	۵۹/۹۴ $\pm$ ۲/۲۹ ^{gh}	۵۴/۹۶ $\pm$ ۲/۳۱ ^{ef}	۷۰/۷۵ $\pm$ ۲/۰۸ ^{ghfi}	D./۱.۶	
۵۷/۶۹ $\pm$ ۱/۳۹ ^{ljmk}	۴۷/۰۵ $\pm$ ۱/۳۳ ^{mlkj}	۶۸/۷۲ $\pm$ ۲/۲۳ ^{efcd}	۴۵/۶۶ $\pm$ ۱/۸۶ ^{hig}	۷۹/۹۳ $\pm$ ۲/۲۳ ^{dfe}	D./۱.۶C	
۷۴/۳۳ $\pm$ ۲/۱۱ ^{abcde}	۶۲/۱۷ $\pm$ ۲/۲۳ ^{cedb}	۴۷/۹۷ $\pm$ ۲/۵۲ ^{jki}	۴۳/۰۰ $\pm$ ۲/۵۱ ^{hig}	۵۶/۶۸ $\pm$ ۲/۴۱ ^{kl}	D./۲.۴	
۷۳/۴۷ $\pm$ ۱/۵۸ ^{abc}	۶۸/۲۸ $\pm$ ۱/۶۵ ^a	۱۰۵/۵۰ $\pm$ ۲/۸۵ ^a	۸۸/۴۱ $\pm$ ۲/۷۲ ^a	۱۱۳/۱۳ $\pm$ ۲/۷۴ ^a	D./۲.۴C	
۷۷/۶۹ $\pm$ ۱/۲۲ ^a	۶۷/۰۴ $\pm$ ۱/۳۹ ^{ab}	۷۰/۰۵ $\pm$ ۱/۸۰ ^{cd}	۶۴/۶۳ $\pm$ ۱/۸۰ ^c	۷۸/۲۵ $\pm$ ۱/۶۷ ^{de}	D./۰.۶	C
۶۷/۱۵ $\pm$ ۱/۱۸ ^{gcfde}	۵۶/۴۶ $\pm$ ۱/۲۳ ^{ed}	۷۴/۲۶ $\pm$ ۲/۲۲ ^{cd}	۵۷/۲۳ $\pm$ ۱/۹۹ ^e	۸۳/۵۲ $\pm$ ۲/۱۹ ^{de}	D./۰.۶C	
۶۰/۶۳ $\pm$ ۰/۹۳ ^{lm}	۴۴/۲۵ $\pm$ ۰/۸۹ ^{op}	۳۳/۴۰ $\pm$ ۰/۹۳ ^o	۲۸/۷۶ $\pm$ ۰/۹۱ ^m	۴۳/۳۷ $\pm$ ۰/۹۱ ^{po}	D./۱.۲	
۶۵/۲۷ $\pm$ ۰/۹۰ ^{gih}	۵۰/۰۶ $\pm$ ۰/۹۳ ^{hgikj}	۵۷/۷۲ $\pm$ ۱/۴۱ ^{hi}	۴۶/۳۶ $\pm$ ۱/۳۰ ^{hi}	۶۹/۳۰ $\pm$ ۱/۳۷ ^{ji}	D./۱.۲C	
۷۶/۴۳ $\pm$ ۱/۴۳ ^a	۶۲/۶۴ $\pm$ ۱/۵۹ ^{cd}	۶۲/۲۳ $\pm$ ۱/۹۳ ^{efg}	۵۶/۸۸ $\pm$ ۱/۹۵ ^{ed}	۷۲/۸۰ $\pm$ ۱/۸۰ ^{gfe}	D./۱.۶	
۵۶/۲۹ $\pm$ ۱/۶۴ ^{lmk}	۴۵/۷۸ $\pm$ ۱/۵۶ ^{mnlkj}	۶۹/۰۰ $\pm$ ۲/۶۳ ^{def}	۴۲/۷۹ $\pm$ ۲/۰۸ ^{hig}	۷۹/۷۱ $\pm$ ۲/۶۶ ^{dfe}	D./۱.۶C	
۷۶/۱۸ $\pm$ ۱/۸۷ ^a	۶۱/۲۹ $\pm$ ۲/۰۵ ^{cadb}	۵۰/۷۳ $\pm$ ۲/۴۹ ^{jhi}	۴۵/۳۸ $\pm$ ۲/۵۳ ^{hfig}	۶۱/۷۹ $\pm$ ۲/۴۴ ^{kj}	D./۲.۴	
۷۱/۴۰ $\pm$ ۱/۵۷ ^{abcd}	۶۲/۵۰ $\pm$ ۱/۷۳ ^{abc}	۹۸/۲۹ $\pm$ ۲/۸۶ ^a	۷۸/۸۲ $\pm$ ۲/۷۲ ^b	۱۰۸/۶۷ $\pm$ ۲/۶۹ ^a	D./۲.۴C	
۷۴/۶۷ $\pm$ ۰/۸۵ ^a	۶۱/۰۲ $\pm$ ۰/۹۵ ^{cd}	۶۳/۵۱ $\pm$ ۱/۲۸ ^{efg}	۵۶/۵۹ $\pm$ ۱/۲۷ ^e	۷۳/۳۳ $\pm$ ۱/۲۲ ^{ghf}	D./۰.۶	D
۶۶/۸۶ $\pm$ ۰/۹۵ ^{gfde}	۵۵/۸۸ $\pm$ ۰/۹۹ ^{ed}	۷۶/۷۵ $\pm$ ۱/۷۳ ^c	۶۰/۱۶ $\pm$ ۱/۵۷ ^{ecd}	۸۶/۶۴ $\pm$ ۱/۷۰ ^{dc}	D./۰.۶C	
۶۱/۰۵ $\pm$ ۰/۴۷ ^{ljk}	۴۳/۰۸ $\pm$ ۰/۴۵ ^o	۲۹/۷۸ $\pm$ ۰/۴۶ ^o	۲۴/۵۰ $\pm$ ۰/۴۴ ⁿ	۳۹/۸۲ $\pm$ ۰/۴۶ ^{qp}	D./۱.۲	
۵۸/۲۵ $\pm$ ۰/۴۸ ^{lm}	۳۹/۶۱ $\pm$ ۰/۴۳ ^{qp}	۲۹/۰۲ $\pm$ ۰/۵۳ ^p	۲۱/۴۸ $\pm$ ۰/۴۷ ^o	۳۹/۷۲ $\pm$ ۰/۵۶ ^q	D./۱.۲C	
۵۸/۲۶ $\pm$ ۱/۹۰ ^{nm}	۳۹/۸۸ $\pm$ ۱/۸۲ ^q	۳۵/۴۲ $\pm$ ۲/۰۱ ^{no}	۳۰/۳۱ $\pm$ ۲/۰۱ ^{mn}	۴۷/۵۶ $\pm$ ۱/۹۵ ^{nmo}	D./۱.۶	
۵۵/۸۰ $\pm$ ۱/۵۱ ^{lm}	۴۳/۵۳ $\pm$ ۱/۴۰ ^{mno}	۶۴/۶۷ $\pm$ ۲/۳۲ ^{fg}	۴۱/۹۷ $\pm$ ۱/۹۳ ^{ji}	۷۶/۶۶ $\pm$ ۲/۳۶ ^{ghfe}	D./۱.۶C	
۷۵/۸۵ $\pm$ ۱/۶۸ ^a	۶۰/۹۷ $\pm$ ۱/۹۶ ^{cd}	۵۱/۸۷ $\pm$ ۲/۲۴ ^{jhi}	۴۶/۸۸ $\pm$ ۲/۲۸ ^{hfg}	۶۲/۰۵ $\pm$ ۲/۰۸ ^{kj}	D./۲.۴	
۶۹/۱۶ $\pm$ ۲/۱۶ ^{gcfdb}	۵۶/۳۳ ^{edf} $\pm$ ۲/۳۰	۷۹/۲۰ $\pm$ ۴/۰۲ ^{cd}	۶۳/۵۳ $\pm$ ۳/۶۵ ^{ecd}	۸۷/۲۰ $\pm$ ۳/۸۶ ^{dce}	D./۲.۴C	
۶۶/۹۶ $\pm$ ۱/۷۴ ^{gijh}	۵۱/۷۹ $\pm$ ۱/۷۷ ^{mhlikj}	۵۴/۰۲ $\pm$ ۲/۳۰ ^{jk}	۴۹/۳۱ $\pm$ ۲/۲۶ ^{hig}	۶۳/۱۵ $\pm$ ۲/۲۴ ^k	D./۰.۶	E
۶۶/۱۱ $\pm$ ۰/۹۴ ^{gfe}	۵۴/۱۷ $\pm$ ۰/۹۷ ^{ef}	۷۶/۴۲ $\pm$ ۱/۶۵ ^c	۶۰/۱۱ $\pm$ ۱/۵۳ ^{ced}	۸۸/۳۳ $\pm$ ۱/۶۴ ^c	D./۰.۶C	
۶۲/۲۷ $\pm$ ۰/۳۸ ^{ijk}	۴۱/۰۲ $\pm$ ۰/۳۵ ^o	۲۱/۳۶ $\pm$ ۰/۳۰ ^q	۱۶/۴۸ $\pm$ ۰/۲۸ ^p	۳۱/۹۷ $\pm$ ۰/۳۲ ^r	D./۱.۲	
۶۲/۰۸ $\pm$ ۰/۵۰ ^{ijk}	۴۳/۱۵ $\pm$ ۰/۴۸ ^{no}	۳۲/۷۹ $\pm$ ۰/۶۴ ^o	۲۵/۳۳ $\pm$ ۰/۵۶ ⁿ	۴۳/۳۸ $\pm$ ۰/۶۵ ^p	D./۱.۲C	
۶۴/۹۹ $\pm$ ۱/۰۵ ^{ijh}	۵۱/۰۵ $\pm$ ۱/۰۷ ^{hlikj}	۴۵/۸۰ $\pm$ ۱/۲۰ ^k	۳۹/۶۸ $\pm$ ۱/۱۷ ^j	۵۴/۸۵ $\pm$ ۱/۱۶ ^l	D./۱.۶	

VCL; Curvilinear velocity, VSL; Straight-line velocity, VAP; Average path velocity, LIN; Linearity, STR; Straightness.

جدول ۴- میانگین $\pm$ خطای استاندارد الگوی حرکتی اسپرم در اثر متقابل دز در لایه

صفات مورد اندازه گیری				منبع تغییرات	
WOB	ALH	MAD	BCF		
انتر دز* لایه					
۷۲/۸۷ ± ۱/۳۸ ^{hfg}	۲/۸۲ ± ۰/۰۵ ^{nml}	۱۱/۱۹ ± ۰/۴۲ ^{ijh}	۴/۶۱ ± ۰/۱۷ ^{fhg}	D _{۰/۰۶}	A
۷۲/۵۰ ± ۱/۳۴ ^{hefg}	۳/۳۲ ± ۰/۰۶ ^{ghi}	۱۲/۹۸ ± ۰/۴۶ ^{fed}	۴/۳۶ ± ۰/۱۶ ^{ihg}	D _{۰/۰۶C}	
۶۲/۷۸ ± ۰/۹۹ ^{lm}	۲/۷۴ ± ۰/۰۳ ^{no}	۶/۷۵ ± ۰/۲۷ ^o	۲/۰۶ ± ۰/۰۸ ^p	D _{۰/۱۲}	
۷۲/۲۰ ± ۰/۷۳ ^{efg}	۳/۳۲ ± ۰/۰۳ ^{gghi}	۱۲/۱۶ ± ۰/۲۹ ^{figh}	۳/۷۰ ± ۰/۰۹ ^k	D _{۰/۱۲C}	
۷۴/۶۵ ± ۱/۶۰ ^{cdef}	۳/۳۲ ± ۰/۰۷ ^{gghi}	۱۱/۳۸ ± ۰/۵۹ ^{figh}	۴/۸۵ ± ۰/۲۰ ^{fed}	D _{۰/۱۶}	
۶۸/۵۶ ± ۱/۵۵ ^{ihkj}	۳/۳۷ ± ۰/۰۷ ^{gghi}	۱۳/۸۶ ± ۰/۵۵ ^{ed}	۳/۶۸ ± ۰/۱۶ ^{kj}	D _{۰/۱۶C}	
۶۳/۴۵ ± ۱/۵۸ ^{lk}	۲/۸۰ ± ۰/۰۶ ^{nmo}	۶/۳۲ ± ۰/۴۷ ^{op}	۱/۹۰ ± ۰/۱۳ ^p	D _{۰/۲۴}	
۸۰/۹۳ ± ۱/۸۳ ^{abc}	۴/۰۳ ± ۰/۱۲ ^{ab}	۱۸/۰۰ ± ۰/۷۸ ^{ab}	۵/۵۲ ± ۰/۲۶ ^{cb}	D _{۰/۲۴C}	
۷۷/۶۱ ± ۱/۰۷ ^{edb}	۳/۱۳ ± ۰/۰۵ ^{kji}	۱۲/۰۷ ± ۰/۳۷ ^{fegh}	۵/۱۶ ± ۰/۱۵ ^{ed}	D _{۰/۰۶}	B
۷۲/۲۶ ± ۱/۲۴ ^{hefg}	۳/۱۶ ± ۰/۰۵ ^{kji}	۱۱/۶۴ ± ۰/۴۲ ^{igijh}	۳/۶۳ ± ۰/۱۴ ^k	D _{۰/۰۶C}	
۶۶/۴۴ ± ۰/۶۴ ^{ikj}	۲/۸۴ ± ۰/۰۲ ^{nml}	۷/۴۲ ± ۰/۲۰ ⁿ	۲/۳۷ ± ۰/۰۶ ^o	D _{۰/۱۲}	
۷۲/۸۰ ± ۰/۹۹ ^{hefg}	۳/۲۱ ± ۰/۰۴ ^{kji}	۱۳/۵۳ ± ۰/۳۷ ^{fed}	۴/۲۲ ± ۰/۱۱ ^{ihj}	D _{۰/۱۲C}	
۷۱/۷۵ ± ۱/۷۱ ^{hefg}	۳/۲۵ ± ۰/۰۷ ^{gghi}	۱۲/۴۰ ± ۰/۵۹ ^{fegdh}	۴/۶۳ ± ۰/۱۹ ^{feg}	D _{۰/۱۶}	
۷۴/۱۴ ± ۱/۳۳ ^{defg}	۳/۴۱ ± ۰/۰۶ ^{gfhe}	۱۴/۳۲ ± ۰/۵۳ ^{cd}	۳/۵۰ ± ۰/۱۴ ^k	D _{۰/۱۶C}	
۷۴/۶۳ ± ۲/۰۲ ^{cdefg}	۲/۹۱ ± ۰/۰۸ ^{ml}	۷/۹۹ ± ۰/۶۴ ^{nlm}	۲/۸۷ ± ۰/۲۲ ^{mn}	D _{۰/۲۴}	
۸۶/۲۲ ± ۱/۴۵ ^{ab}	۳/۳۵ ± ۰/۰۷ ^{gfhe}	۱۵/۹۸ ± ۰/۵۳ ^b	۶/۲۹ ± ۰/۲۱ ^a	D _{۰/۲۴C}	
۷۶/۸۳ ± ۱/۲۱ ^{ede}	۲/۹۹ ± ۰/۰۴ ^{kl}	۱۲/۶۶ ± ۰/۴۲ ^{fed}	۵/۴۲ ± ۰/۱۶ ^{ed}	D _{۰/۰۶}	C
۷۷/۶۶ ± ۱/۱۰ ^{edb}	۳/۳۹ ± ۰/۰۶ ^{gfhe}	۱۲/۹۳ ± ۰/۴۵ ^{fed}	۴/۱۱ ± ۰/۱۵ ^{ij}	D _{۰/۰۶C}	
۵۹/۷۷ ± ۰/۸۶ ^{no}	۲/۶۹ ± ۰/۰۳ ^o	۶/۴۸ ± ۰/۲۴ ^o	۲/۰۲ ± ۰/۰۷ ^p	D _{۰/۱۲}	
۶۸/۶۸ ± ۰/۸۵ ^{ihg}	۳/۲۵ ± ۰/۰۴ ^{ghi}	۱۱/۸۶ ± ۰/۳۴ ^{ij}	۳/۳۵ ± ۰/۱۰ ^{ml}	D _{۰/۱۲C}	
۷۳/۷۷ ± ۱/۳۵ ^{cdef}	۳/۴۸ ± ۰/۰۶ ^{dfe}	۱۲/۲۴ ± ۰/۵۱ ^{fegd}	۴/۸۶ ± ۰/۱۷ ^{ed}	D _{۰/۱۶}	
۷۴/۶۷ ± ۱/۵۷ ^{cdef}	۳/۳۸ ± ۰/۰۸ ^{gfhe}	۱۳/۶۴ ± ۰/۶۱ ^{ed}	۳/۷۵ ± ۰/۱۸ ^{ikj}	D _{۰/۱۶C}	
۷۴/۷۳ ± ۱/۵۹ ^{cdeb}	۳/۶۲ ± ۰/۱۰ ^{dce}	۱۰/۶۲ ± ۰/۷۶ ^{kij}	۳/۴۱ ± ۰/۲۲ ^{kl}	D _{۰/۲۴}	
۸۱/۰۵ ± ۱/۴۳ ^{ab}	۳/۶۹ ± ۰/۰۸ ^{dcb}	۱۷/۱۷ ± ۰/۶۰ ^{ab}	۶/۱۰ ± ۰/۲۰ ^{ab}	D _{۰/۲۴C}	
۷۴/۴۶ ± ۰/۸۰ ^{cde}	۳/۲۸ ± ۰/۰۴ ^{ghi}	۱۲/۵۲ ± ۰/۳۱ ^{fegh}	۴/۴۳ ± ۰/۱۱ ^{hg}	D _{۰/۰۶}	D
۷۶/۳۷ ± ۰/۹۱ ^{cde}	۳/۴۳ ± ۰/۰۵ ^{gfe}	۱۳/۲۸ ± ۰/۳۵ ^{ed}	۴/۱۶ ± ۰/۱۷ ^{ihj}	D _{۰/۰۶C}	
۶۰/۲۶ ± ۰/۴۴ ^{nlm}	۲/۸۳ ± ۰/۰۲ ^{nm}	۶/۰۱ ± ۰/۱۳ ^p	۱/۳۹ ± ۰/۰۳ ^r	D _{۰/۱۲}	
۵۹/۶۱ ± ۰/۴۶ ^{nm}	۲/۸۱ ± ۰/۰۲ ^{nmo}	۶/۴۵ ± ۰/۱۵ ^p	۱/۲۷ ± ۰/۰۳ ^s	D _{۰/۱۲C}	
۵۶/۴۸ ± ۱/۷۵ ^o	۲/۸۹ ± ۰/۰۷ ^{nml}	۸/۱۱ ± ۰/۵۶ ^{nm}	۲/۵۳ ± ۰/۱۷ ^{on}	D _{۰/۱۶}	
۷۰/۲۱ ± ۱/۴۲ ^{ihfg}	۳/۴۶ ± ۰/۰۸ ^{gfhe}	۱۴/۰۱ ± ۰/۵۷ ^{ed}	۳/۴۸ ± ۰/۱۵ ^{kl}	D _{۰/۱۶C}	
۷۳/۷۲ ± ۱/۶۶ ^{cdef}	۳/۲۸ ± ۰/۰۷ ^{gghi}	۹/۷۸ ± ۰/۶۰ ^{kj}	۳/۶۸ ± ۰/۲۰ ^{kj}	D _{۰/۲۴}	
۷۵/۰۸ ± ۲/۱۱ ^{cdefg}	۳/۰۳ ± ۰/۰۸ ^{kjl}	۱۱/۴۴ ± ۰/۶۵ ^{figjh}	۴/۳۴ ± ۰/۲۷ ^{ihjg}	D _{۰/۲۴C}	

۶۳/۳۷ ± ۱/۶۹ ^{nlm}	۲/۸۵ ± ۰/۰۷ ^{mno}	۹/۹۷ ± ۰/۵۱ ^{kl}	۳/۸۰ ± ۰/۱۹ ^{kl}	D. _{۰/۰۶}	E
۷۵/۱۲ ± ۰/۸۴ ^{cde}	۳/۷۹ ± ۰/۰۵ ^{cb}	۱۵/۴۷ ± ۰/۳۸ ^c	۴/۲۹ ± ۰/۱۱ ^{ihg}	D. _{۰/۰۶C}	
۵۸/۳۵ ± ۰/۳۶ ^{nm}	۲/۷۵ ± ۰/۰۱ ^{no}	۵/۰۴ ± ۰/۱۱ ^q	۰/۹۴ ± ۰/۰۲ ^t	D. _{۰/۱۲}	
۶۱/۴۰ ± ۰/۴۹ ^l	۲/۸۷ ± ۰/۰۲ ^{ml}	۷/۰۵ ± ۰/۱۷ ^o	۱/۵۹ ± ۰/۰۴ ^q	D. _{۰/۱۲C}	
۶۶/۷۱ ± ۰/۹۷ ^{kj}	۲/۹۳ ± ۰/۰۴ ^{ml}	۸۰/۵۵ ± ۰/۳۰ ^{lm}	۲/۹۵ ± ۰/۱۰ ^m	D. _{۰/۱۶}	
۸۲/۸۲ ± ۰/۹۳ ^a	۳/۷۰ ± ۰/۰۶ ^{cb}	۱۷/۳۱ ± ۰/۴۹ ^{ab}	۵/۰۳ ± ۰/۱۵ ^{cd}	D. _{۰/۱۶C}	
۶۷/۰۹ ± ۰/۸۶ ^{ihj}	۲/۹۱ ± ۰/۰۳ ^l	۶/۴۶ ± ۰/۲۷ ^o	۲/۰۱ ± ۰/۰۸ ^p	D. _{۰/۲۴}	
۸۲/۲۷ ± ۱/۰۷ ^{ab}	۴/۰۰ ± ۰/۰۷ ^a	۱۸/۲۸ ± ۰/۴۸ ^a	۵/۹۹ ± ۰/۱۶ ^{ab}	D. _{۰/۲۴C}	

BCF; Beat cross frequency, MAD; Mean angular displacement, ALH; Amplitude of lateral head displacement, WOB; Wobble

D._{۰/۰۶}: مقدار ۰/۰۶ میکرولیتر از Resiquimod، مقدار ۰/۱۲ میکرولیتر از Resiquimod، مقدار ۰/۱۶ میکرولیتر از Resiquimod، مقدار ۰/۲۴ میکرولیتر از Resiquimod (گروه‌های کنترل به ترتیب D._{۰/۱۲C}، D._{۰/۱۶C}، D._{۰/۲۴C})، (لایه‌ها به ترتیب از بالا به پایین: A، B، C، D، E).

Resiquimod یک آگونیست گیرنده شبه تول شماره ۷ و ۸ به شمار می‌آید. در اسپرم X، فعال شدن گیرنده تول شماره ۸ مستقر در قطعه میانی اسپرم، تولید ATP میتوکندریایی را سرکوب می‌کند. علاوه بر این، فعال شدن گیرنده تول شماره ۷ مستقر در دم اسپرم، موجب فسفریلاسیون نوکلئار فاکتور کاپا بتا (NFκB) و گلیکوژن سنتتاز کیناز ۳ آلفا/ بتا (GSK3α/β) می‌شود و موجب سرکوب فعالیت هگزوکیناز می‌شود. در نتیجه، تولید ATP در اسپرم X کاهش می‌یابد (۱۴). بر این اساس کارایی استفاده از Resiquimod در جداسازی اسپرم‌های X و Y کاملاً وابسته به روش استفاده شده جهت جداسازی اسپرم‌های کم تحرک و پر تحرک است.

در مطالعه حاضر از روش Swim-up برای جداسازی اسپرم‌هایی که از نظر تحرک باهم متفاوت بودند استفاده شد. نتایج مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که روش Swim-up روشی مناسب برای جداسازی اسپرم‌هایی است که از نظر وضعیت متابولیکی و در نتیجه شاخص‌های حرکتی با یکدیگر اختلاف دارند. به طور مثال، مطالعه‌ای به وسیله Magdanz و همکاران (۲۰۱۹) با هدف مقایسه میزان متابولیسم، میزان تحرک و طول دم اسپرم در اسپرم‌های لایه‌های بالایی و پایینی جداسازی شده با روش Swim-up در گاو انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که اسپرم‌های بخش بالایی جداسازی شده به روش Swim-up در گاو، نه تنها تحرک بیشتری نسبت به اسپرم‌های لایه پایینی دارند، بلکه دارای میزان متابولیسم بیشتر و طول دم بلندتری هستند (۷). مطالعه‌ی دیگری توسط Parrish و Foote در سال ۱۹۸۷ به منظور کمی‌سازی اسپرم‌های

در لایه B بیشترین میزان کاهش در شاخص‌های حرکتی اسپرم مربوط به دزهای D._{۰/۱۲} و D._{۰/۲۴} بود و در هر سه شاخص VAP، VSL، VCL و میزان افت در گروه درمان نسبت به گروه کنترل در این دو دز معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در این لایه و در دز D._{۰/۱۶} مقدار شاخص VSL در گروه درمان به طور معنی‌دار بیش از گروه کنترل بود ($P < 0.05$). اگرچه شاخص VAP در گروه درمان نسبت به کنترل دچار افت معنی‌داری شد ($P < 0.05$).

در لایه C دزهای D._{۰/۱۲} و D._{۰/۲۴} بیشترین میزان افت را در شاخص‌های سرعت حرکت اسپرم ایجاد کردند. در این دو دز برای هر سه شاخص VAP، VSL، VCL و VAP کاهش معنی‌دار در گروه درمان نسبت به گروه کنترل رخ داد ($P < 0.05$). در این لایه همانند لایه قبل در دز D._{۰/۱۶} میزان VSL در گروه درمان به طور معنی‌دار بیش از گروه کنترل بود ($P < 0.05$) و شاخص‌های VAP و VCL بین دو گروه درمان و کنترل اختلاف معناداری وجود نداشت ($P > 0.05$). در لایه D بیشترین میزان افت در شاخص‌های سرعت حرکت اسپرم مربوط به دزهای D._{۰/۱۶} و D._{۰/۲۴} بود که برای هر دو شاخص VAP و VSL کاهش در گروه درمان نسبت به کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.05$). این کاهش برای دز D._{۰/۰۶} در شاخص VAP نیز معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

در لایه E بیشترین میزان افت در شاخص‌های سرعت حرکت اسپرم مربوط به دزهای D._{۰/۱۶} و D._{۰/۲۴} بود و برای شاخص‌های VAP، VSL و VCL برای هر ۴ دز، این افت در گروه درمان نسبت به کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

بحث

در پایین‌ترین بخش ظروف Swim-up بودند به طور معنی‌دار کمتر از سه لایه بالایی بود.

Swim-up فرایندی است که میزان کارایی آن تحت تاثیر فرایندهای مختلفی مانند زمان، دما، غلظت اسپرم و شکل ظروف مورد استفاده و ... قرار می‌گیرد (۱۲ و ۱۳). بنابراین با توجه به اینکه هدف از مطالعه حاضر جدا کردن بهینه اسپرم بر اساس میزان تحرک پس از تیمار با Resiquimod بود، اسپرم‌ها در گروه‌های تیمار و کنترل در لایه‌های مختلفی برداشت شدند تا لایه‌های دارای بیشترین اختلاف از نظر میزان تحرک هستند مشخص شوند.

جداسازی اسپرم‌های با کیفیت مناسب در اسب در مطالعات مختلف و با اهداف مختلفی به انجام رسیده است. Gonzalez castro و همکاران (۲۰۱۹) یک تکنیک میکروفلوئیدیک را برای جداسازی اسپرم منجمد-ذوب شده در اسب به کار بردند و از آن برای تولید جنین آزمایشگاهی استفاده کردند. در این مطالعه جداسازی اسپرم با این تکنیک با دو روش single-layer colloidal centrifugation (SLC) و Swim-up مقایسه شد. در این مطالعه پس از جداسازی اسپرم، میزان تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی در ۲ روش میکروفلوئیدیک و SLC مشابه بود و Swim-up نسبت به این دو روش بدتر عمل کرد. میزان تحرک، مورفولوژی و DNA integrity در دو روش SLC و میکروفلوئیدیک اختلاف معنی‌دار نداشتند ولی میزان زنده‌مانی در اسپرم‌های جداسازی شده با روش میکروفلوئیدیک بیشتر بود (۳).

در مطالعه دیگری توسط Hidalgo و همکاران در سال ۲۰۱۷ یک روش تغییر یافته Swim-up برای جداسازی اسپرم مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه نمونه اسپرم از نریان‌های دارای اسپرم با کیفیت بالا که پاسخ به انجماد در آن‌ها نامناسب بود اخذ شد. در این مطالعه این روش جداسازی با روش‌های جداسازی که بر پایه سانتریفیوژ بودند مقایسه شد. در مجموع ۳ روش Swim-up تغییر یافته (SV)، sperm washing (SW) و SLC با هم مقایسه شدند. نتایج نشان داد که sperm recovery rate در دو روش SV و SLC مشابه و بیشتر از روش SW بود. در این مطالعه اسپرم‌ها پس از جداسازی منجمد شدند. پس از یخ‌گشایی، میزان تحرک اسپرم در روش SV کمتر از دو روش SLC و SW بود که این محققین آن را به عدم

جداسازی شده به روش Swim-up در گاو انجام شد. این مطالعه شامل دو بخش بود. در بخش اول، اسپرم تازه از ۶ گاو نر اخذ و فرایند Swim-up روی آن‌ها انجام شد. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که تعداد اسپرم‌های Swim-up شده دارای همبستگی قوی با تعداد اسپرم‌های زنده موجود در نمونه اولیه هستند. در بخش دوم از این مطالعه ۲۹ نمونه از اسپرم‌های منجمد ذوب شده مربوط به ۱۱ گاو نر با وارد فرایند سویم شدند. شاخص‌های مختلفی روی اسپرم‌های Swim-up شده ارزیابی شد و ارتباط آن‌ها با باروری اسپرم‌ها در تلقیح مصنوعی بررسی شد. نتایج نشان داد که از بین شاخص‌های ارزیابی شده، تعداد اسپرم‌های Swim-up شده بیشترین همبستگی را با باروری داشت (۸). مطالعه‌ی دیگر توسط Kim و همکاران در سال ۲۰۱۵ جهت مقایسه تاثیر دو روش جداسازی اسپرم‌های متحرک شامل Density-gradient centrifugation/Swim-up و Swim-up بر نتایج بالینی تولید آزمایشگاهی جنین در انسان صورت گرفت. هر دو روش استفاده شده دارای تاثیرات مشابه و خوبی بر میزان لقاح آزمایشگاهی و میزان بارداری داشتند. از این رو این محققین هر دو روش را برای انتخاب اسپرم‌های با کیفیت بالا به منظور استفاده در برنامه‌های کمک تولیدمثلی پیشنهاد کردند (۶).

در مطالعه حاضر دزهای مختلف Resiquimod استفاده شدند و تاثیر آنها در شاخص‌های مختلف حرکتی اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بهتر مشخص شدن میزان تاثیر Resiquimod و انتخاب بهترین دز این ترکیب که بتوان از آن برای جداسازی اسپرم‌های X و Y در اسب استفاده کرد، با استفاده از تجزیه و تحلیل آماری هم اثر هر کدام از عوامل دز Resiquimod و لایه‌های مختلف نمونه اسپرم پس از Swim-up به صورت مستقل بررسی شد و هم اثر متقابل هر دو عامل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در ارزیابی اثر مستقل دز، استفاده از دز ۰/۱۲ (D۰/۱۲) سبب بیشترین میزان کاهش در شاخص‌های مربوط به سرعت حرکت اسپرم شد. همچنین استفاده از این دز سبب کاهش در برخی دیگر از شاخص‌های حرکتی اسپرم نیز شد. در بررسی اثر مستقل لایه‌ها، برخی از شاخص‌های مربوط به سرعت حرکت اسپرم و همچنین برخی دیگر از شاخص‌های حرکتی اسپرم، در دو لایه‌ای که



از گروه کنترل، و در لایه‌های بالایی بیشتر و یا مشابه با گروه کنترل است. با توجه به اینکه تاثیر Resiquimod بر تولید ATP فقط در اسپرم‌های حاوی کروموزوم X است، دز مناسب، مقداری است که پس از Swim-up سبب کاهش شاخص‌های سرعت حرکت اسپرم در لایه‌های بالایی نشود. به عبارت دیگر، اسپرم‌های حاوی کروموزوم Y که تحت تاثیر Resiquimod قرار نمی‌گیرند، باید قابلیت حرکت به لایه‌های بالایی را داشته باشند و بنابراین شاخص‌های سرعتی حرکت اسپرم در لایه‌های بالایی در دز مناسب Resiquimod نباید کمتر از گروه کنترل باشد. از طرفی چون اسپرم‌های حاوی کروموزوم X، تحت تاثیر Resiquimod قرار گرفته و کم تحرک می‌شوند، بیشتر در لایه‌های پایینی باقی مانده و لذا این لایه‌ها در دز مناسب Resiquimod باید از نظر شاخص‌های سرعتی حرکت اسپرم کمتر از گروه کنترل باشند. در مطالعه حاضر این ویژگی‌ها در $D_{0.16}$ دیده می‌شود.

در مطالعه حاضر اسپرم اسب تحت تیمار با دزهای مختلفی از ترکیب Resiquimod قرار گرفت و با استفاده از روش Swim-up اسپرم‌های کم تحرک و پر تحرک از یکدیگر جداسازی شدند. نتایج مطالعه حاضر تاثیر متفاوت دزهای مختلف Resiquimod را به خوبی نشان داد به طوری که استفاده از دز $D_{0.16}$ ، منطقی‌ترین نتایج را بر اساس تغییر در شاخص‌های مختلف حرکتی اسپرم در لایه‌های مختلف برداشت شده پس از انجام Swim-up نشان داد.

قدردانی و تشکر

بدین‌وسیله، نویسندگان مقاله از دانشگاه شهرکرد که در اجرای این تحقیق یاری‌گر بود کمال قدردانی و تشکر را دارند. همچنین از پرورش‌دهندگان صنعت اسب که در پیشبرد این تحقیق ما را یاری کردند، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Alves NdC, Diniz SdA, Viegas RN, Arigoni AL, Freitas MM, Lana ÂQ, et al. Action of swim-up and caffeine on equine frozen sperm. *Animal Reproduction*. 2022;19(4):e20220056.

جداسازی مناسب پلاسمای منی نسبت دادند. میزان sperm fragmentation در دو روش SV و SLC کمتر بود و سایر شاخص‌های ارزیابی شده بین گروه‌های درمانی مشابه بود. در مجموع در این مطالعه و با هدف انجماد اسپرم، روش بهتری نسبت به روش‌های SW و SV بود (۴).

در مطالعه دیگری alves و همکاران در سال ۲۰۲۲ از روش Swim-up برای جداسازی اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده است که پس از یخ‌گشایی با غلظت‌های مختلف کافئین تیمار شده بودند استفاده شد. در این مطالعه استفاده از روش Swim-up سبب افزایش میزان recovery اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی شد و این افزایش دز هم در گروه‌های تیمار شده با کافئین و هم در گروه کنترل تیمار نشده با کافئین نسبت به گروه Swim-up نشده رخ داد. در این مطالعه اضافه کردن غلظت 5 mM از کافئین به اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده قبل از انجام Swim-up سبب افزایش میزان تحرک و افزایش مقدار recovery اسپرم‌ها شد بدون اینکه میزان اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی تحت تاثیر قرار گیرد (۱).

در مطالعه حاضر به منظور آنالیز بهتر تیمارهای انجام شده و اخذ نتیجه دقیق‌تر در خصوص موثرترین تیمار، اثر متقابل دز و نوع لایه برداشت شده نیز مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج این آنالیز نشان داد که دزهای $D_{0.112}$ ، $D_{0.16}$ و $D_{0.224}$ سبب کاهش معنی‌دار در شاخص‌های مرتبط با سرعت حرکت اسپرم در اغلب لایه‌های برداشت شده شدند. ولی نکته جالب توجه اینکه در زمان استفاده از دز $D_{0.16}$ ، شاخص VCL در لایه‌های B و C در گروه درمان نسبت به گروه کنترل نه تنها کاهش نداشت بلکه افزایش معنی‌دار نیز نشان داد. دز $D_{0.16}$ سبب کاهش در شاخص‌های سرعتی حرکت اسپرم در ۲ لایه پایینی بین D و E شد. در بالاترین لایه میزان VSL در گروه درمان بیش از گروه کنترل بود و در شاخص VCL و VAP اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کنترل و درمان نداشتند. این نتیجه نشان می‌دهد که بهترین دز استفاده شده در این مطالعه که سبب ایجاد منطقی‌ترین تغییرات حرکتی در اسپرم شده است، دز $D_{0.16}$ است. در این دز، در لایه‌های پایینی میزان سرعت حرکت اسپرم به طور معنی‌داری کمتر



- animal science and biotechnology. 2021;12(1):89.
11. Seidel Jr G, DeJarnette J. Applications and world-wide use of sexed semen in cattle. *Animal Reproduction Science*. 2022;246:106841.
12. Tampion D, Gibbons RA. Effect of pH on the swimming rate of bull spermatozoa. *Reproduction*. 1963 Apr 1;5(2):249-58.
13. Tampion D, Gibbons RA. Swimming rate of bull spermatozoa in various media and the effect of dilution. *Reproduction*. 1963 Apr 1;5(2):259-75.
14. Umehara T, Tsujita N, Shimada M. Activation of Toll-like receptor 7/8 encoded by the X chromosome alters sperm motility and provides a novel simple technology for sexing sperm. *PLoS biology*. 2019;17(8):e3000398.
15. Umehara T, Tsujita N, Zhu Z, Ikeda M, Shimada M. A simple sperm-sexing method that activates TLR7/8 on X sperm for the efficient production of sexed mouse or cattle embryos. *Nature Protocols*. 2020:1-23.
16. Yata VK. Sperm Sexing Using Flow Cytometry: Principles and Applications. *Sperm Sexing and its Role in Livestock Production*. 2022:51-64.
2. Gohil VM, Sheth SA, Nilsson R, Wojtovich AP, Lee JH, Perocchi F, et al. Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. *Nature biotechnology*. 2010;28(3):249-55.
3. Gonzalez-Castro RA, Carnevale EM. Use of microfluidics to sort stallion sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Animal reproduction science*. 2019;202:1-9.
4. Hidalgo M, Ortiz I, Dorado J, Morrell J, Gosálvez J, Consuegra C, et al. Stallion sperm selection prior to freezing using a modified colloid swim-up procedure without centrifugation. *Animal reproduction science*. 2017;185:83-8.
5. Kelly G. Breeding with frozen semen: what are the considerations? *UK-Vet Equine*. 2022;6(2):68-71.
6. Kim EK, Kim EH, Kim EA, Lee KA, Shin JE, Kwon H. Comparison of the effect of different media on the clinical outcomes of the density-gradient centrifugation/swim-up and swim-up methods. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 2015 Mar 31;42(1):22.
7. Magdanz V, Boryshpolets S, Ridzewski C, Eckel B, Reinhardt K. The motility-based swim-up technique separates bull sperm based on differences in metabolic rates and tail length. *PLoS One*. 2019;14(10):e0223576.
8. Parrish JJ, Foote RH. Quantification of bovine sperm separation by a Swim-up method relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *Journal of andrology*. 1987 Jul 8;8(4):259-66.
9. Perumal P, Srivastava N, Pande M, Ghosh S. Counting sperm numbers. *Protocols in Semen Biology (Comparing Assays)*. 2017:73-87.
10. Ren F, Xi H, Ren Y, Li Y, Wen F, Xian M, et al. TLR7/8 signalling affects X-sperm motility via the GSK3 α/β -hexokinase pathway for the efficient production of sexed dairy goat embryos. *Journal of*



Using an efficient method to separate sperms with low and high motility in fresh stallion semen treated with Resiquimod (R848), aiming to separate X and Y chromosome-bearing sperms

Seyed Pourya Hosseyni¹; Ali Kadivar^{2*}; Naser Shams Esfandabadi²;
Najmeh Davoodian³; Seyed Abbas Mirzaei⁴

1. DVSc Student of Theriogenology, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
4. Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord- Iran.

Received: 9 June 2025

Accepted: 19 August 2025

Summary

The aim of the present study was to develop and optimize an efficient method to separate sperms with low and high motility in fresh stallion sperm treated with resiquimod (R848), aiming to separate X and Y chromosome-bearing sperms. Fresh semen samples were collected from three different stallions in triplicate. For 30 million sperm, swim-up was conducted in HTF medium for 30 minutes. Finally, five distinct layers were separated from the top to the bottom of the medium. Four doses of 0.06 (D_{0.06}), 0.12 (D_{0.12}), 0.16 (D_{0.16}) and 0.24 (D_{0.24}) µl of resiquimod at a concentration of 3 µM were tested and compared with control groups without resiquimod in terms of sperm motility parameters. Doses D_{0.12}, D_{0.16}, and D_{0.24} induced a significant reduction in sperm velocity-related indices across most harvested layers (P<0.05). For dose D_{0.16}, VSL in the second and third layers (from top to bottom) of the treatment group showed a significant increase compared to the control group (P<0.05). Additionally, dose D_{0.16} caused a significant decrease in sperm motility indices in the two lower layers (P<0.05). At the highest harvested layer of this dose, the VSL in the treatment group was significantly higher than in the control group (P<0.05). However, the indices VCL and VAP showed no significant differences between the treatment and control groups (P>0.05). Overall, the best dose used in this study that produced the most reasonable changes in sperm motility indices in the harvested layers was D_{0.16}.

Keywords: Stallion sperm, Swim-up, Resiquimod, Sperm motility indices.

* Corresponding Author: kadivar.ali@sku.ac.ir

