Archive of SID.ir

مقاله کامل

دوره بیستم ـ شماره ۲ ـ تابستان ۱۴۰۳

DOI: 10.22055/IVJ.2023.391303.2574

مقایسه رقیق کننده حاوی پلاسمای زرده تخم کبوتر، مرغ و ترکیب آن‌ها جهت نگهداری منی قوچ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

علیرضا حمیصی[۱]، محسن اسلامی[۲*]، حامد اسماعیلی[۳]، فرهاد فرخی‌اردبیلی[۴] و سینا بهمنی[۳]

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۲] دانشیار گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۳] دانش‌آموخته دکتری تخصصی مامایی و بیماری‌های تولیدمثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۴] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۱۳

چکیده

مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر پلاسمای زرده تخم کبوتر و مرغ در مقایسه با ترکیب پلاسمای زرده کبوتر+ مرغ در رقیق کننده تریس–اسید سیتریک–فروکتوز جهت حفظ کیفیت منی قوچ به صورت مایع–سرد انجام شد. نمونه‌های منی با استفاده از واژن مصنوعی از چهار قوچ نژاد قزل دوبار در هفته جمع‌آوری شد و در صورتی که معیارهای مورد نظر را داشت با هم مخلوط و در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت. رقیق کننده تریس–سیتریک اسید– فروکتوز با استفاده از پلاسمای زرده تخم کبوتر (۲۸ درصد، حجمی/حجمی)، تخم مرغ (۲۸ درصد) و ترکیب پلاسمای زرده تخم کبوتر (۷، ۱۴ و ۲۱ درصد) و مرغ (۲۱، ۱۴ و ۷ درصد) تهیه و جهت آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. متعاقب رقیق‌سازی نمونه‌ها، شاخص‌های حرکت کلی و پیشرونده رو به جلو اسپرم (توسط سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم)، زنده‌مانی و انسجام غشای اسپرم در ساعات صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مطالعه بعد از سرد کردن (۴ درجه سانتی‌گراد)، ارزیابی شد. همچنین، مقدار مالوندی‌آلدهید، به عنوان شاخص اکسیدانتی در ساعت‌های مذکور اندازه‌گیری شد. نتایج آزمایش نشان داد که حرکت پیشرونده رو به جلو (در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲) و زنده‌مانی (در ساعت ۷۲) در رقیق کننده حاوی ۲۸ درصد پلاسمای زرده تخم کبوتر به طور معنی‌دار بالاتر از گروه‌های دریافت کننده ترکیب پلاسمای زرده تخم کبوتر+مرغ بود. همچنین انسجام غشای پلاسمایی اسپرم در گروه دریافت کننده ۲۸ درصد پلاسمای زرده تخم کبوتر در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ بالاتر از گروه‌های ترکیبی با غلظت ۱۴ و ۲۱ درصد پلاسمای تخم مرغ بود. غلظت مالوندی‌آلدهید بین گروه‌های مطالعه اختلاف معنی‌دار نشان نداد. در نتیجه ترکیب پلاسمای تخم مرغ و کبوتر به اندازه رقیق کننده حاوی پلاسمای زرده تخم کبوتر و پلاسمای زرده تخم مرغ (هر کدام به تنهایی) جهت نگهداری منی قوچ به صورت مایع–سرد کارا نمی‌باشد.

کلمات کلیدی: پلاسمای زرده تخم کبوتر، قوچ، اسپرماتوزوآ، مالوندی‌الدهید

مقدمه

تلقیح مصنوعی تکنیکی مؤثر در موفقیت و افزایش بهره‌وری صنعت دامپروری است (Ongun et al, 1997). موفقیت در برنامه تلقیح مصنوعی بستگی به مدیریت صحیح در جمع‌آوری، نگهداری و استفاده از منی دارد. ذخیره کردن منی مهم‌ترین مرحله در تلقیح مصنوعی است. به دنبال اخذ و نگهداری منی در دمای یخچال، اختلال در

* نویسنده مسئول: محسن اسلامی، دانشیار گروه تریوژنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

E-mail: m.eslami@urmia.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

انسجام غشای اسپرم و کاهش خواص حیاتی مثل تحرک و باروری مشاهده می‌شود (Salamon and Maxwell, 2000; De Lamirande and Gagnon, 1993). از عوامل عمده کاهش باروری اسپرم‌های نگهداری شده در دماهای پایین می‌توان به نقص‌های مورفولوژیک، غیرطبیعی بودن اکروزوم، تولید آنیون سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون‌های لیپیدهای غشای اسپرم اشاره کرد (Alvarez and Storey, 1983; 1995). پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم باعث کاهش باروری و آسیب غیرقابل برگشت در حرکت اسپرم خواهد شد (Maxwell and Watson, 1996; Aitken and Fischer, 1994; De Lamirande and Gagnon, 1992). سیستم‌های آنزیمی آنتی اکسیدانی پلاسمای منی شامل گلوتاتیون (GSH)، گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-PX)، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز بوده که این‌ها در روندهای جلوگیری از پراکسیداسیون نقش مهمی دارند، ولی این مجموعه آنتی-اکسیدانی اغلب کفایت لازم در جلوگیری از بروز پراکسیداسیون لیپید جهت نگهداری منی در محیط خارج از بدن را ندارد (Aurich et al, 1997). مشخص شده است که نگهداری در شرایط سرد، باعث کاهش فعالیت مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در اسپرم گاو و انسان می‌شود (Alvarez and Storey, 1989; Jones et al, 1979). مطالعات مختلفی جهت یافتن رقیق کننده با ترکیب مناسب برای بهبود نگهداری منی در حیوانات انجام گرفته شده است.

زرده تخم‌مرغ یک جزء اصلی رقیق کننده مورد استفاده برای ذخیره سرد–مایع و انجماد منی حیوانات می‌باشد و با تأثیر بر غشای سلولی، اسپرم را در برابر شوک سرما محافظت می‌کند (Bucak et al, 2008; Bergeron and Manjunath, 2006; Purdy, 2006; Wall and Foote, 1999; Holt, 1997). پلاسمای منی دارای پروتئین‌هایی به نام BSP است که سبب خارج شدن فسفولیپیدها و کلسترول از غشاء اسپرم شده در نتیجه باعث افزایش حساسیت اسپرم به شوک سرمایی می‌شود (Bergeron and Manjunath, 2006). تحقیقات نشان داده که لیپوپروتئین با دانسیته پایین موجود در زرده تخم‌مرغ مهم‌ترین فاکتور محافظت کننده از اسپرم در برابر شوک سرمایی می‌باشد. این ترکیب به عنوان یک عامل مداخله‌گر (Vishwanath et al, 1992) با پروتئین‌های منی ترکیب شده و یا مانع اتصال آن‌ها به غشای پلاسمایی اسپرم خواهد شد (Hu et al, 2010; Bucak et al, 2008; Jiang et al, 2007; Bergeron et al, 2005; Amirat et al, 2004; Watson & Martin, 1975). با این حال زرده کامل تخم می‌تواند معایبی همچون اختلال در تنفس اسپرم، خطر آلودگی به پاتوژن‌ها، اختلال در ارزیابی مارکرهای بیوشیمیایی اسپرم، کاهش حرکت اسپرم و اختلال در ارزیابی حرکت اسپرم توسط نرم‌افزار کاسا را داشته باشد (Pillet et al, 2011; Moussa et al, 2002). پلاسما ماده‌ایی شفاف است و بخشی از زرده کامل می‌باشد. با سانتریفیوژ کردن زرده تخم می‌توان پلاسما را از گرانول‌های آن جدا نمود. مطالعات نشان دادند که پلاسمای زرده تخم‌مرغ در نگهداری و باروری منی گاومیش و نریان بهتر از زرده کامل تخم‌مرغ بوده است (Pillet et al, 2011; Hussain Shah et al, 2017). اخیراً مطالعه‌ای بهبود حرکت پیشرونده رو به جلو در نگهداری منی شتر را در پلاسمای زرده تخم کبوتر در مقایسه با پلاسمای زرده تخم مرغ نشان داد (Panahi et al, 2017). علی‌رغم این که زرده تخم پرندگان مختلف من جمله اردک، بلدرچین و مرغ تشابهات زیادی در میزان رطوبت، پروتئین و چربی تام دارند (Bathgate et al, 2006)، منتها از نظر میزان فسفولیپید، کلسترول و اسیدهای چرب با هم‌دیگر متفاوت می‌باشند، که همین تفاوت منجر به تفاوت در توان حفاظتی آن‌ها در برابر شوک سرمایی از اسپرم می‌شود (Bathgate et al, 2006; Trimeche et al, 1997; Graham and Foote, 1987; Bair and Marion, 1978). مشخص شده است که میزان کلسترول به ازای هر گرم زرده تخم در کبوتر بیش‌تر از اردک، بلدرچین و مرغ می‌باشد (Bair and Marion, 1978). میزان بالای کلسترول در تخم کبوتر می‌تواند در نگهداری اسپرم در محیط خارج از بدن مؤثرتر از زرده دیگر پرندگان باشد (Panahi et al,

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

2017). علی‌رغم مؤثرتر بودن پلاسمای زرده تخم کبوتر در مقایسه با زرده تخم مرغ، عدم دسترسی راحت، فصلی بودن تولید آن و مشکل در تهیه تخم کبوتر تازه از عوامل محدود کننده استفاده از آن جهت تهیه رقیق کننده منی می‌باشد. تا به حال مطالعه جامع در مورد اثر مقایسه‌ای پلاسمای زرده تخم مرغ، پلاسمای زرده تخم کبوتر و ترکیب پلاسمای زرده تخم مرغ و کبوتر در رقیق کننده منی قوچ انجام نشده است. بنابراین در مطالعه حاضر اثر مقایسه‌ای پلاسمای زرده تخم مرغ، پلاسمای زرده تخم کبوتر و ترکیب پلاسمای زرده تخم مرغ و کبوتر (در غلظت ۲۸ درصد) در رقیق کننده تریس جهت نگهداری منی قوچ در دمای یخچال مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت. هدف اصلی مطالعه حاضر بررسی اثر استفاده از مقادیر کم‌تر پلاسمای زرده تخم کبوتر و ترکیب آن با پلاسمای زرده تخم مرغ جهت افزایش کیفیت رقیق کننده (در مقایسه با پلاسمای زرده تخم مرغ) در نگهداری منی قوچ به صورت مایع–سرد می‌باشد.

مواد و روش کار

این آزمایش در طی پاییز و زمستان در گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه واقع در ۱۱ کیلومتری شمال‌غرب ارومیه انجام گرفت. در این مطالعه از ۴ راس قوچ نژاد قزل (۳–۲ ساله) جهت اخذ منی و دو راس میش فحل جهت کمک به اخذ منی استفاده شد. در طول انجام مطالعه شرایط تغذیه‌ای حیوانات ثابت و یکسان و شامل یونجه با کیفیت و جو بود.

هفته‌ای دوبار از قوچ‌ها نمونه منی با استفاده از واژن مصنوعی (Paulenz et al, 2002) در حضور میش فحل اخذ شد. برای ایجاد فحلی در میش‌ها از اسفنج داخل واژنی حاوی مدروکسی پروژسترون استات (Sponjavet, Hipra, Spain) به مدت حداقل یک هفته استفاده شد و در هنگام خارج کردن آن ۰/۵ میلی‌لیتر استرادیول بنزوات (ابوریحان، ایران) به همراه آنالوگ پروستاگلاندین اف دو آلفا (دی–کلوپروستنول، ابوریحان، ایران) تزریق شد.

نمونه‌های منی پس از جمع‌آوری بلافاصله به آزمایشگاه فیزیولوژی منتقل و در آب گرم ۳۷°C قرار داده شدند. در آزمایشگاه ابتدا ارزیابی‌های اولیه اعم از حجم، غلظت و حرکت انجام گرفت. نمونه‌هایی که حجم آن‌ها ۲–۰/۷۵ میلی‌لیتر، حداقل غلظت اسپرم $۲/۵\times۱۰^{۹}$ میلی‌لیتر/اسپرماتوزوآ، حرکت توده‌ای ≤۴ و حرکت پیشرونده رو به جلو بیش از ۷۰ درصد را دارا بودند، از هرقوچ انتخاب شده و در حجم مساوی با هم مخلوط شده و جهت انجام مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند (Bucak et al, 2008).

برای ارزیابی حرکت توده‌ای اسپرم، مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌های خام را روی لام قرار داده (بدون لامل) و با استفاده از بزرگ‌نمایی ۱۰ میکروسکوپ سه چشمی فازکنتراست (Labomed, Labomed Inc., Culver City, CA, USA) مجهز به دوربین فیلم برداری متصل به کامپیوتر ارزیابی گردید. برای این تحقیق از نمونه‌هایی استفاده شد که حرکت توده‌ای آن‌ها خوب یا خیلی خوب (درجه ۴ یا ۵) بود. همچنین برای شمارش تعداد اسپرم از لام هموسایتومتر استفاده شد.

در این مطالعه رقیق کننده منی شامل تریس (هیدروکسی متیل آمینومتان) ۳/۶۳ گرم، فروکتوز ۰/۵ گرم، اسید سیتریک ۱/۹۹ گرم، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین جی‌سدیم، ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین به همراه پلاسمای زرده (۲۸ درصد) تخم مرغ/تخم کبوتر بود که با آب مقطر به حجم ۱۰۰ سی‌سی رسانده شد (Salamon and Maxwell, 2000). منی به میزانی با رقیق کننده مخلوط شد که در هر سی‌سی پانصد میلیون اسپرم وجود داشته باشد. رقیق کننده و منی هر دو در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با یکدیگر مخلوط شدند. در آزمایش حاضر گروه‌های مورد مطالعه شامل: ۱– گروه دریافت کننده ترکیب پلاسمای زرده تخم مرغ (۲۱ درصد) با پلاسمای زرده تخم کبوتر (۷ درصد)، ۲– گروه دریافت کننده ترکیب پلاسمای زرده تخم مرغ (۱۴ درصد) با پلاسمای زرده تخم کبوتر (۱۴ درصد)، ۳– گروه دریافت کننده ترکیب پلاسمای زرده تخم مرغ (۷ درصد) با پلاسمای زرده تخم کبوتر (۲۱ درصد)، ۴– گروه

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

دریافت کننده پلاسمای زرده تخم مرغ (۲۸ درصد) و ۵- گروه دریافت کننده پلاسمای زرده تخم کبوتر (۲۸ درصد) بود که این گروه‌های درمانی به مدت ۷۲ ساعت در دمای یخچال نگهداری شده و شاخصه‌های حرکتی اسپرم و دیگر فاکتورهای مد نظر در ساعت‌های ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مطالعه ارزیابی شدند.

پلاسمای زرده تخم مرغ و کبوتر طبق پروتکل پیشنهادی با اندکی تغییر تهیه شد (Pillet et al, 2011). بدین صورت که بعد از جدا کردن و حذف کردن سفیده، زرده تخم با رقیق کننده حاوی تریس، سیتریک اسید، فروکتوز و آنتی-بیوتیک با غلظت ذکر شده در بالا (Mortazavi et al, 2020)، به نسبت یک به یک مخلوط شده (حجمی به حجمی) و به مدت یک ساعت در دمای ۵-۲ درجه سانتی-گراد روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. در ادامه دو مرحله سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی-گراد (Hettich, Germany) انجام شد و مایع رویی به عنوان پلاسمای زرده در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت. پلاسمای زرده تهیه شده، حداکثر تا مدت ۷۲ ساعت در یخچال نگهداری شد و در آزمایشات مطالعه مذکور مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور تعیین حرکت کلی و پیشرونده رو به جلوی اسپرم با استفاده از سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (Computer-Assisted Sperm Analysis; CASA)، ۱۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده روی لام قرار داده شد و یک لامل ۲۲×۲۲ بر روی آن قرار گرفت و سپس با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed, Labomed Inc., Culver City, CA, USA) مجهز به صفحه گرم و دوربین دیجیتال (M-Shot MD50-T) و متصل به کامپیوتر دارای نرم‌افزار کاسا (Test Sperm 3.2; Videotest, St. Petersburg, Russia) مورد ارزیابی قرارگرفت. برای هر نمونه بیش از بیست فیلد آنالیز و تصویر برداری شد و خصوصیات حرکتی حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوآ مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای مورد ارزیابی شامل حرکت کلی (total motility) و حرکت پیشرونده رو به جلو (forward progressive motility) بود.

جهت تعیین درصد اسپرم‌های زنده و مرده، رنگ‌آمیزی ائوزین - نگروزین بر روی نمونه‌ها تحت مطالعه در ساعت‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مطالعه انجام گرفت. محلول ائوزین - نگروزین طبق پروتکل (Evans and Maxwell, 1987) تهیه شد و به منظور انجام رنگ آمیزی، میزان ۴۰ میکرولیتر از رنگ درون یک میکروتیوب قرار داده شد و ۲۰ میکرولیتر از منی رقیق شده به آن اضافه شد، سپس کاملا با هم مخلوط شد. طی ۱۰ ثانیه، یک قطره از مخلوط را روی لام گذاشته و گسترش تهیه کرده و لام را در مجاورت هوا قرار داده تا خشک شود. با بزرگ-نمایی ۱۰۰ تعداد حداقل ۲۰۰ اسپرم (صورتی یا ارغوانی به عنوان مرده و بی‌رنگ به عنوان زنده تلقی شد) در فیلدهای مختلف هر گسترش با میکروسکوپ نوری مورد شمارش قرار گرفت.

برای ارزیابی انسجام غشای پلاسمایی اسپرم (Hypo-osmotic Swelling Test: HOST)، محلول HOS به صورت تازه و روزانه طبق پروتکل (Correa & Zovos, 1994) تهیه شد. جهت انجام آزمایش، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول HOS را در لوله‌های آزمایش ریخته و ۲۰ میکرولیتر از نمونه منی رقیق شده را به محلول HOS افزودیم. بعد از گذشت ۶۰-۳۰ دقیقه انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه در بن ماری)، یک قطره از این مخلوط را روی یک لام میکروسکوپی گرم (۳۷ درجه) ریخته و یک لامل روی آن قرار داده و با میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed, Labomed Inc., Culver City, CA, USA) حداقل تعداد ۲۰۰ اسپرم مورد ارزیابی و شمارش قرار گرفت. اسپرم-هایی که دم صاف داشتند، غشایشان ناسالم و آن‌هایی‌که دم پیچ خورده داشتند، غشای آن‌ها سالم تلقی شد.

بعد از ارزیابی حرکت، زنده مانی و انسجام غشای اسپرم، نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از هموژنایزر برقی مخصوص سلول و با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه هموژن شدند تا غشای پلاسمایی اسپرم شکسته شده و هموژنیت

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

اسپرم-رقیق کننده حاصل شود. سپس نمونه‌های هموژنیت اسپرم-رقیق کننده تا زمان اندازگیری مالون‌دی‌آلدهید در فریزر ۲۲- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت اندازه-گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید در هموژنیت اسپرم- رقیق کننده از استاندارد استفاده شد (Fredrick et al, 2000). ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه با دو میلی‌لیتر از معرف مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه داخل بن ماری جوش قرار داده شد. پس از خنک کردن، لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. در نهایت جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقابل بلانک قرائت گردید. غلظت مالون‌دی‌آلدهید به صورت میکرومول در لیتر در نمونه‌ها گزارش شد.

برای هر زمان در هر گروه آزمایش ۷ بار تکرار در نظر گرفته شد. اثر درمان، زمان و برهم کنش بین درمان و زمان با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه با استفاده از نرم‌افزار SigmaStat مورد ارزیابی آماری قرار گرفت. در مطالعه مذکور تست تعقیبی Holm-Sidak مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها به صورت Least square means ارائه شد. P.value<0.05 معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

درصد حرکت کلی بین گروه‌های مختلف آزمایش در ساعت‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مطالعه تفاوت معنی‌دار نشان نداد (Table 1 ، P>۰/۰۵). آنالیز داخل گروهی نشان داد که درصد حرکت کلی در تمام گروه‌های آزمایش در ساعت ۲۴ کم‌تر از ساعت صفر و در ساعات ۴۸ و۷۲ مطالعه کم‌تر از ساعت ۲۴ بود (Table 1 ، P<۰/۰۵).

درصد حرکت پیشرونده رو به جلو در گروه پلاسمای زرده تخم کبوتر (۲۸ درصد) در ساعت ۲۴ مطالعه بالاتر از بقیه گروه‌های آزمایش بود، همچنین در ساعات ۴۸ و ۷۲ مطالعه در گروه پلاسمای زرده تخم کبوتر (۲۸ درصد) بالاتر از هر سه گروه ترکیبی بود (Table 1 ، P<۰/۰۵). تغییرات داخل گروهی نشان دهنده کاهش معنی‌دار در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ نسبت به ساعت صفر مطالعه بود (Table 1 ، P<۰/۰۵).

درصد زنده‌مانی بین گروه‌های مختلف آزمایش در ساعت‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ مطالعه تفاوت معنی‌دار نشان نداد (Table 2 ، P>۰/۰۵). در ساعت ۷۲ مطالعه در گروه دریافت کننده پلاسمای زرده تخم کبوتر (۲۸ درصد)، درصد زنده‌مانی بالاتر از گروه‌های ترکیبی بود (Table 2 ، P<۰/۰۵). همچنین درصد زنده‌مانی در تمام گروه‌های آزمایش در ساعات ۴۸ و ۷۲ مطالعه کم‌تر از ساعت صفر بود (Table 2 ، P< ۰/۰۵).

درصد اسپرم با غشای پلاسمایی سالم در گروه پلاسمای زرده تخم کبوتر (۲۸ درصد) در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مطالعه بالاتر از گروه‌های پلاسمای زرده تخم مرغ (۱۴ درصد) + پلاسمای زرده تخم کبوتر (۱۴ درصد) و پلاسمای زرده تخم مرغ (۲۱ درصد) + پلاسمای زرده تخم کبوتر (۷ درصد) بود (Table 3 ، P<۰/۰۵). آنالیز داخل گروهی نشان داد که درصد اسپرم با غشای پلاسمایی سالم در ساعات ۴۸ و ۷۲ مطالعه در تمام گروه‌های مطالعه کم‌تر از ساعت صفر مطالعه بود (Table 3 ، P<۰/۰۵).

غلظت مالون دی‌آلدهید بین گروه‌های مختلف آزمایش در ساعات صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مطالعه تفاوت معنی‌دار نشان نداد (Table 4 ، P>۰/۰۵). تغییرات داخل گروهی نشان داد که غلظت مالون دی‌آلدهید در ساعت ۲۴ مطالعه بالاتر از ساعت صفر، و در ساعت ۷۲ بالاتر از ساعات صفر و ۲۴ مطالعه بود (Table 4 ، P>۰/۰۵).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Table 1: Percentage of total and forward progressive motility of ram spermatozoa (least square mean) in the extender containing pigeon plasma egg yolk (PPEY), chicken plasma egg yolk (CPEY), and combinations of the PPEY+CPEY during cold storage up to 72 h at 4°C.

Parameter	Experimental groups	Time of Storage (h)			
		0	24	48	72
Percentage of total motility	PPEY (28%)	88.11^{a}	80.01^{b}	73.21^{c}	63.82^{d}
	CPEY (28%)	86.78^{a}	78.92^{b}	72.45^{c}	64.59^{d}
	CPEY (7%) + PPEY (21%)	86.80^{a}	77.71^{b}	71.91^{c}	66.81^{c}
	CPEY (14%) + PPEY (14%)	88.10^{a}	78.44^{b}	69.33^{c}	64.59^{c}
	CPEY (21%) + PPEY (7%)	84.55^{a}	79.51^{b}	69.70^{c}	65.13^{c}
Percentage of forward progressive motility	PPEY (28%)	80.70^{Aa}	62.34^{Bb}	55.16^{Ac}	50.19^{Ad}
	CPEY (28%)	81.81^{Aa}	54.18^{Ab}	47.82^{ABc}	44.34^{ABd}
	CPEY (7%) + PPEY (21%)	82.52^{Aa}	52.33^{Ab}	44.79^{BCc}	39.15^{BCd}
	CPEY (14%) + PPEY (14%)	81.68^{Aa}	51.36^{Ab}	42.18^{Cc}	35.17^{Cc}
	CPEY (21%) + PPEY (7%)	80.70^{Aa}	51.58^{Ab}	42.67^{BCc}	38.59^{BCd}

^{A,B,C} different superscripts indicates a significant difference among treatment groups at any time points regarding each parameter.
^{a,b,c,d} different superscripts indicate a significant difference among different time points within the experimental group.
The standard error of the mean for the index of total and forward progressive motility is 4.41 and 3.18, respectively.

Table 2: Viability of ram spermatozoa in the extender containing pigeon plasma egg yolk (PPEY), chicken plasma egg yolk (CPEY), and combinations of the PPEY+CPEY during cold storage up to 72 h at 4°C.

Parameter	Experimental groups	Time of Storage (h)			
		0	24	48	72
Viability (%)	PPEY (28%)	90.23^{a}	82.80^{b}	80.12^{b}	76.18^{Ab}
	CPEY (28%)	90.17^{a}	82.09^{b}	79.51^{b}	70.78^{ABb}
	CPEY (7%) + PPEY (21%)	89.13^{a}	78.19^{b}	77.22^{bc}	66.19^{Bc}
	CPEY (14%) + PPEY (14%)	92.10^{a}	77.91^{ab}	78.32^{bc}	66.21^{Bc}
	CPEY (21%) + PPEY (7%)	91.72^{a}	81.73^{ab}	76.90^{b}	67.78^{Bc}

^{A,B} different superscripts indicates a significant difference among treatment groups at any time points regarding each parameter.
^{a,b,c} different superscripts indicate a significant difference among different time points within the experimental group.
The standard error of the mean for the index of viability is 3.55 .

Table 3: Percentage of intact plasma membrane of ram spermatozoa in the extender containing pigeon plasma egg yolk (PPEY), chicken plasma egg yolk (CPEY), and combinations of the PPEY+CPEY during cold storage up to 72 h at 4°C.

Parameter	Experimental groups	Time of Storage (h)			
		0	24	48	72
Percentage of plasma membrane integrity of spermatozoa	PPEY (28%)	81.26^{Aa}	79.26^{Aab}	70.00^{Abc}	67.22^{Ac}
	CPEY (28%)	80.22^{Aa}	70.22^{ABab}	67.05^{ABb}	65.04^{ABb}
	CPEY (7%) + PPEY (21%)	77.25^{Aa}	72.75^{ABab}	66.17^{ABbc}	60.62^{ABc}
	CPEY (14%) + PPEY (14%)	79.48^{Aa}	67.82^{Bb}	61.72^{Bbc}	57.60^{Bc}
	CPEY (21%) + PPEY (7%)	77.75^{Aa}	65.25^{Bb}	60.05^{Bb}	56.82^{Bb}

^{A,B} different superscripts indicates a significant difference among treatment groups at any time points regarding each parameter.
^{a,b,c} different superscripts indicate a significant difference among different time points within the experimental group.
The standard error of the mean for the above-mentioned index is 3.79.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Table 4: Amounts of Malondialdehyde (µmol/lit) in the diluent-sperm homogenate upon preservation in the extender containing pigeon plasma egg yolk (PPEY), chicken plasma egg yolk (CPEY), and combinations of the PPEY+CPEY during cold storage up to 72 h at 4°C.

Parameter	Experimental groups	Time of Storage (h)			
		0	24	48	72
Malondialdehyde (µmol/lit)	PPEY (28%)	3.12^{a}	3.60^{b}	3.90^{bc}	4.33^{c}
	CPEY (28%)	2.88^{a}	3.76^{b}	3.82^{bc}	4.17^{c}
	CPEY (7%) + PPEY (21%)	2.95^{a}	3.53^{b}	4.09^{bc}	4.28^{c}
	CPEY (14%) + PPEY (14%)	3.08^{a}	3.81^{b}	3.94^{bc}	4.44^{c}
	CPEY (21%) + PPEY (7%)	3.17^{a}	3.75^{b}	4.10^{bc}	4.39^{c}

There was no significant difference between the experimental groups in the studied time points.
^{a,b,c} different superscripts indicate a significant difference among different time points within the experimental group.
The standard error of the mean for the malondialdehyde levels is 0.16.

بحث

هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی اثر پلاسمای زرده تخم کبوتر و مرغ و ترکیب پلاسمای تخم کبوتر و مرغ در رقیق کننده تریس–سیتریک اسید–فروکتوز روی حرکت کلی و پیشرونده رو به جلو اسپرم، درصد زنده‌مانی، انسجام غشای پلاسمایی اسپرم و مقدار مالون‌دی‌آلدهید منی قوچ طی نگهداری در دمای یخچال بود.

مطالعه پیشین نشان داد که متغیرهای مختلف اسپرم گاومیش از جمله متغیرهای حرکتی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، میزان آکروزوم سالم و یکپارچگی DNA، با جایگزینی پلاسمای زرده تخم مرغ به جای زرده کامل تخم مرغ بهبود یافت (Hussain Shah et al, 2017). علاوه بر این، نتایج Pillet و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که میزان باروری مادیان‌های تلقیح شده با منی منجمد شده با رقیق کننده پلاسمای زرده تخم مرغ استریل، در مقایسه با زرده کامل تخم مرغ (۶۹ درصد در مقابل ۶۰ درصد) بیش‌تر بود. همچنین مطالعه روی سگ نشان داد که متغیرهای مختلف اسپرم منجمد–ذوب شده مانند تحرک، یکپارچگی غشاء و واکنش آکروزوم در رقیق کننده پلاسمای زرده تخم مرغ در مقایسه با رقیق کننده تهیه شده بر پایه زرده کامل تخم مرغ برتری دارد (Corcine et al, 2016). علاوه بر این، رقیق-سازی منی خروس در رقیق کننده حاوی پلاسمای زرده تخم مرغ (۲۰ درصد)، منجر به افزایش حرکت کلی، حرکت پیشرونده رو به جلو، یکپارچگی غشاء، زنده‌مانی و فعالیت میتوکندری بعد از ذوب در مقایسه با رقیق کننده بر پایه زرده کامل تخم مرغ شد (Mehdipour et al, 2018). مطالعه پیشین نیز نشان داد که رقیق کننده قوچ ساخته شده با پلاسمای زرده تخم مرغ با غلظت ۲۸ درصد، حرکت کلی بالاتری پس از انجماد–ذوب (۳۵/۳۰ درصد) در مقایسه با رقیق کننده حاوی زرده کامل تخم مرغ (۱۹/۲۲ درصد) داشت (Mortazavi et al, 2020). به نظر می‌رسد حذف مواد معدنی، گرانول‌ها و لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا از زرده کامل تخم منجر به بهبود بیشتر کیفیت و نقش حفاظتی پلاسمای زرده به دست آمده، برای نگهداری سرد یا منجمد اسپرم گونه‌های مختلف حیوانی و پرندگان می‌شود. بنابراین در مطالعه حاضر، رقیق کننده پلاسمای زرده با غلظت ۲۸ درصد، به عنوان رقیق کننده استاندارد تهیه شده و جهت نگهداری نمونه منی قوچ در طول آزمایش حاضر مورد استفاده قرار گرفت.

مطالعات در زمینه یافتن رقیق کننده با ترکیب مناسب جهت بهبود نگهداری منی در حیوانات مختلف انجام گرفته است. زرده کامل تخم پرندگان از قدیم به عنوان ماده حفاظت کننده از شوک سرمایی جهت حفظ و نگهداری منی در دمای یخچال مورد استفاده قرار گرفته است (Bucak et al, 2008; Bergeron and Manjunath, 2006; Purdy, 2006; Wall and Foote, 1999; Holt, 1997). زرده کامل تخم پرندگان جدا از این‌که می‌تواند به عنوان یک منشا آلودگی با میکروب‌های مختلف مطرح باشد، مشخص شده است که این ترکیب منجر به اختلال در تنفس

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

اسپرم، اختلال در حرکت اسپرم، اختلال در ارزیابی مارکرهای بیوشیمیایی اسپرم و به دلیل وجود ذرات متعدد منجر به اختلال در ارزیابی حرکت اسپرم با کاسا می‌شود (Wall and Foote, 1999; Moussa et al, 2002; Pillet et al, 2011). بنابراین در سال‌های اخیر تلاش جهت جایگزین نمودن زرده کامل با دیگر ترکیبات مشابه یا قسمتی از زرده که منجر به حفاظت از شوک سرمایی می‌شود انجام شده است (Bahmani et al, 2022; Panahi et al, 2017; Gharibi et al, 2014). مشخص شده است که مهم‌ترین جزء زرده تخم که منجر به حفاظت از شوک سرمایی می‌شود، لیپوپروتئین‌ها با دانسیته پایین می‌باشند (Hu et al, 2010; Jiang et al, 2007; Amirat et al, 2004; Watson and Martin, 1975). در زرده تخم مرغ لیپوپروتئین‌ها حدود دو سوم ماده خشک را به خود اختصاص داده و لیپوپروتئین‌ها با دانسیته پایین یک سری ذرات کروی بوده که حدود سی و پنج نانو متر قطر داشته که در مرکز آن‌ها تری گلسیرید، کلسترول و کلسترل استرها قرار دارند. لیپوپروتئین‌ها با دانسیته پایین از راه‌های مختلف مانند تثبیت غشای پلاسمایی اسپرم، تشکیل لایه روی سطح اسپرم، جایگزین شدن در فسفولیپیدهای غشای اسپرم و کاهش دمای تغییر فاز غشای پلاسمایی اسپرم اثر خود را اعمال می‌کنند (Graham and Foote, 1987; Foulkes et al, 1980; Quinn et al, 1980; Watson, 1975). در چند سال گذشته پلاسمای زرده تخم پرندگان به عنوان جایگزین لیپوپروتئین‌ها با دانسیته پایین مطرح شده است که دلیل آن هم تهیه ساده و راحت پلاسمای زرده در مقایسه با لیپوپروتئین‌ها با دانسیته پایین و اثربخشی مشابه لیپوپروتئین‌ها با دانسیته پایین می‌باشد (Hussain Shah et al, 2017; Panahi et al, 2017; Pillet et al, 2011). زرده تخم پرندگان مختلف در مطالعات سال‌های گذشته جهت حفظ و نگهداری منی گاو نر، شتر و نریان مورد استفاده قرار گرفته است (Su et al, 2008; Clulow et al, 2007). نتایج مطالعات قبلی نشان دادند که به دلیل تفاوت در غلظت فسفولیپیدها، اسیدهای چرب و کلسترول زرده تخم پرندگان مختلف، توان نگهداری و حفاظت آن‌ها در برابر شوک سرمایی از اسپرم متفاوت می‌باشد (Trimeche et al, 1997; Bathgate et al, 2006). در مطالعات اخیر پلاسمای زرده تخم مرغ در نگهداری و باروری منی گاومیش و نریان بهتر از زرده کامل تخم مرغ بوده است (Pillet et al, 2011; Hussain Shah et al, 2017). همچنین مطالعه در شتر نشان داده است که پلاسمای زرده تخم کبوتر اثرات محافظتی بیش‌تری در مقایسه با پلاسمای زرده تخم مرغ دارد (Panahi et al, 2017). در مطالعه حاضر، پلاسمای زرده تخم کبوتر با غلظت ۲۸ درصد منجر به بهبود حرکت پیشرونده رو به جلو اسپرم در مقایسه با گروه‌های ترکیبی پلاسما زرده تخم کبوتر+ مرغ شد. نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا با مطالعات قبلی در این زمینه می‌باشد (Panahi et al, 2017; Gholami et al, 2012; Su et al, 2008). علاوه بر این درصد زنده‌مانی در گروه دریافت کننده ۲۸ درصد پلاسمای زرده تخم کبوتر، به طور معنی‌دار بالاتر از گروه‌های ترکیبی (پلاسما زرده تخم کبوتر+ مرغ) بود. در همین راستا ترکیب پلاسما زرده تخم مرغ با کبوتر نتوانست به اندازه پلاسما زرده تخم کبوتر در حفظ انسجام غشای پلاسمایی مؤثر باشد. در این زمینه، مطالعات نشان دادند که علیرغم این‌که زرده تخم پرندگان مختلف من‌جمله اردک، بلدرچین و مرغ تشابهاتی زیادی در میزان رطوبت و پروتئین و چربی تام دارند (Bathgate et al, 2006)، منتها از نظر میزان فسفولیپید، کلسترول و اسیدهای چرب با هم‌دیگر متفاوت می‌باشند (Bathgate et al, 2006; Trimeche et al, 1997; Graham and Foote, 1987; Bair and Marion, 1978). مشخص شده است که میزان کلسترول به ازای هر گرم زرده تخم در کبوتر بیش‌تر از اردک، بلدرچین و مرغ می‌باشد (Bair and Marion, 1978). میزان بالای کلسترول در تخم کبوتر می‌تواند در نگهداری اسپرم در محیط خارج از بدن مؤثر باشد (Panahi et al, 2017). در تأیید یافته فوق مطالعات مختلف نشان دادند که اضافه نمودن کلسترول به رقیق کننده منی در حیوانات مختلف باعث افزایش کیفیت منی متعاقب نگهداری در دمای

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

یخچال یا پس از فرایند انجماد-ذوب می‌شود (Crichton et al, 2014; Hartwing et al, 2014; Mocé et al, 2010; Moore et al, 2005; Purdy and Graham, 2004). همچنین مشخص شده است که متعاقب فرایند سرد کردن تغییر در ترکیب غشای پلاسمایی اسپرم اتفاق می‌افتد که آن تغییرات منجر به کاهش سیالیت غشای اسپرم می‌شود، و دلیل احتمالی این اتفاق را مرتبط با میزان کلسترول در غشای اسپرم می‌دانند (Buhr et al, 1994). به نظر می‌رسد که بهبود کیفیت متعاقب نگهداری منی در رقیق کننده حاوی پلاسمای زرده تخم کبوتر در مقایسه با گروه‌های ترکیبی (پلاسمای زرده تخم مرغ + کبوتر) مرتبط با میزان بالاتر کلسترول در زرده این گونه باشد.

میزان اسیدهای چرب غیراشباع چند گانه در غشای اسپرم در نشخوارکنندگان کوچک نسبت به سایر گونه‌ها بالاتر است. غشای اسپرم از فسفولیپیدها تشکیل شده که آن‌ها را مستعد واکنش ردوکس با سوپر اکسیدها می‌کند، به این فرایند پراکسیداسیون لیپید می‌گویند. بنابراین اسپرم نشخوارکنندگان کوچک حساسیت بالاتری به استرس اکسیداتیو در طول ذخیره‌سازی دارد، که به دنبال آسیب اکسیداتیو طی ذخیره‌سازی، کیفیت منی کاهش خواهد یافت (Gandini et al, 2000; Aitken and Fischer, 1994). به واسطه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پایین، اسپرم نمی‌تواند آسیب ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدها را در طول ذخیره‌سازی منی به صورت مایع خنثی کند. بنابراین ترکیب رقیق کننده مناسب و مؤثر جهت جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید و کاهش عملکرد اسپرم لازم می‌باشد (Alvarez and Storey, 1989; Jones et al, 1979). مالون‌دی‌آلدئید محصول پایدار و نهایی پراکسیداسیون در زمان وجود استرس اکسیداتیو می‌باشد (Sterbauer et al, 1991). تحقیقات قبلی ارتباط منفی بین غلظت مالون‌دی‌آلدئید و کیفیت منی در طول ذخیره‌سازی را نشان دادند (Eslami et al, 2017; Bucak et al, 2010; Lewis et al, 1995). در مطالعه حاضر مقدار مالون‌دی‌آلدهید در طی ذخیره‌سازی در تمام گروه‌های آزمایش افزایش یافت و همزمان شاخص‌های حرکتی، زنده‌مانی و انسجام غشای پلاسمایی در طول نگهداری کاهش یافت که این یافته هم‌راستا با دیگر مطالعات بود (Moradi et al, 2013; Gundogan et al, 2010; Bucak et al, 2010).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب پلاسمای زرده تخم مرغ+کبوتر، نسبت به پلاسمای زرده تخم کبوتر و مرغ مؤثر نمی‌باشد. همچنین پلاسمای زرده تخم کبوتر به عنوان منبع لیپوپروتئین‌ها با دانسیته پایین جهت نگهداری منی قوچ در دمای یخچال پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از شرکت دانش بنیان دام زیست کارای سبز جهت فراهم نمودن امکانات جهت انجام مطالعه حاضر قدردانی می‌نماید.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این پژوهش توسط شرکت دانش بنیان دام زیست کارای سبز تأمین گردیده است.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

منابع

Aitken, R.J., & Fischer, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa the balance of benefit and risk. *International Journal of Bioassays*, 16, 259–267.

Alvarez, J.G., & Storey, B.T. (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 42, 334-346.

Alvarez, J.G., & Storey, B.T. (1989). Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Research*, 23, 77-90.

Alvarez, J.G., & Storey, B.T. (1983). Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of Reproduction*, 29, 548-555.

Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J. L., & Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61(5), 895-907.

Aurich, J. E., Schönherr, U., Hoppe, H., & Aurich, C. (1997). Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, 48(2), 185-192.

Bahmani, S., Eslami, M., Farrokhi-Ardabili, F., Imani, M., & Batavani, R. A. (2023). Evaluation of chicken egg yolk plasma and low-density lipoprotein alone or enriched with ewe or cow skim milk in tris-citric acid-based diluent for cryostorage of ram semen. *Biopreservation and Biobanking*, 21(4), 346-35.

Bair, C. W., & Marion, W. W. (1978). Yolk cholesterol in eggs from various avian species. *Poultry Science*, 57(5), 1260–1265.

Bathgate, R., Maxwell, W. M., & Evans, G. (2006). Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 68–73.

Bergeron, A., & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 1338-1344.

Bergeron, A., Villemure, M., Lazure, C., & Manjunath, P. (2005). Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*, 71(4), 461–470.

Bucak, M.N., Sariozkan, S., Barbaros Tuncer, P., Sakin, F., Atessahin, A., Kulaksiz, R., & Cevik, M. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircusancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, 89, 24-30.

Bucak, M.N., Atessahin, A., & Yuce, A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*, 75, 128-134.

Buhr, M. M., Curtis, E. F., & Kakuda, N. S. (1994). Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 31(3), 224–238.

Clulow, J. R., Maxwell, W. M., Evans, G., & Morris, L. H. (2007). A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Australian Veterinary Journal*, 85(6), 232–235.

Corcini, C. D., Goularte, K. L., Bongalhardo, D. C., Lucia, T., Jr, Jardim, R. D., & Varela Junior, A. S. (2016). Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. *Andrologia*, 48(1), 114–115.

Correa, J. R., & Zavos, P. M. (1994). The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42(2), 351–360.

Crichton, E.G., Pukazhenthi, B., Billah, M., & Skidmore, J.A. (2014). Cholesterol addition aids the cryopreservation of dromedary camel (Camelus dromedarius) spermatozoa. *Theriogenology*, 83(2), 168-174.

De Lamirande, E., & Gagnon, C. (1993). A positive role for superoxide anions in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 16, 21–25.

De Lamirande, E., & Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *International Journal of Andrology*, 13, 368–378.

Eslami, M., Ghasemiyan, H., & Zadeh Hashem, E. (2017). Semen supplementation with palmitoleic acid promotes kinematics, microscopic and antioxidative parameters of ram spermatozoa during liquid storage. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(1), 49–59.

Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987). Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworth Scientific, Sydney: Sydney.

Frederick, S. (2010). HepG2 Hepatocyte Lipid Peroxidation Assay. Version 1.1. NCL Method GTA- 4.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Foulkes, J. A., Sweasey, D., & Goodey, R. G. (1980). Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60(1), 165–169.

Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C., Dondero, F., & Lenzi, A. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction* (Oxford, England), 15(4), 830–839.

Gharibi, S., Niasari-Naslaji, A., Poursasan, N., & Moosavi-Movahedi, A.A. (2014). Replacement of salamon with shotor diluent and egg yolk with low density lipoprotein for chilled storage of ram semen. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 15, 279-284.

Gholami, M., Faraji, Z., & Zamiri, M.J. (2012). Effect of egg yolk of four avian species on the cryopreserved ram spermatozoa. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 13, 23-27.

Graham, J. K., & Foote, R. H. (1987). Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24(1), 42–52.

Gundogan, M., Yeni, D., Avdatek, F., & Fidan, A. F. (2010). Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), 200–207.

Hartwig, F. P., Lisboa, F. P., Hartwig, F. P., Monteiro, G. A., Maziero, R. R., Freitas-Dell'Aqua, C. P., Alvarenga, M. A., Papa, F. O., & Dell'Aqua, J. A., Jr (2014). Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*, 81(2), 340–346.

Holt W. V. (1997). Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reproduction, Fertility, and Development*, 9(3), 309–319.

Hu, J. H., Li, Q. W., Zan, L. S., Jiang, Z. L., An, J. H., Wang, L. Q., & Jia, Y. H. (2010). The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*, 117(1-2), 11–17.

Hussain Shah, S. A., Hassan Andrabi, S. M., Ahmed, H., & Qureshi, I. Z. (2017). Chicken egg yolk plasma in tris-citric acid extender improves the quality and fertility of cryopreserved water buffalo (Bubalus bubalis) spermatozoa. *Theriogenology*, 89, 32–40.

Jiang, Z. L., Li, Q. W., Hu, J. H., Li, W. Y., Zhao, H. W., & Zhang, S. S. (2007). Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology*, 54(3), 301–304.

Jones, R., Mann, T., & Sherins, R. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 31(5), 531–537.

Lewis, S. E., Boyle, P. M., McKinney, K. A., Young, I. S., & Thompson, W. (1995). Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, 64(4), 868–870.

Maxwell, W.M.C., & Watson, P.F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42, 55–65.

Mehdipour, M., Daghigh Kia, H., Moghaddam, G., & Hamishehkar, H. (2018). Effect of egg yolk plasma and soybean lecithin on rooster frozen-thawed sperm quality and fertility. *Theriogenology*, 116, 89–94.

Mocé, E., Purdy, P. H., & Graham, J. K. (2010). Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 118(2-4), 236–247.

Moore, A. I., Squires, E. L., & Graham, J. K. (2005). Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 51(3), 241–249.

Moradi, A.R., Malekinejad, H., Farrokhi Ardabili, F., & Bernousi, I. (2013). Royal Jelly improves the sperm parameters of ram semen during liquid storage and serves as an antioxidant source. *Small Ruminant Research*, 113, 346-352.

Mortazavi, S. H., Eslami, M., & Farrokhi-Ardabili, F. (2020). Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semen diluent. *Animal Reproduction Science*, 219, 106533.

Moussa, M., Marinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695–1706.

Ongun, U., Kinet, H., Cevik, M., & Cetinkoya, S. (1997). Fertility obtained from frozen ram semen with different extenders containing varied antioxidants. *Theriogenology*, 58, 744-753.

Panahi, F., Niasari-Naslaji, A., Seyedasgari, F.S., Ararooti, A., Razavi, K., & Moosavi-Movaheddi, A.A. (2017). Supplementation of tris-based extender with plasma egg yolk of six avian species and camel skim milk for chilled preservation of dromedary camel semen. *Animal Reproduction Science*, 184, 11-19.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R., & Berg, K. A. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, 57(2), 823–836.

Pillet, E., Duchamp, G., Batellier, F., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., & Magistrini, M. (2011). Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, 75(1), 105–114.

Purdy, P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63(3), 215-225.

Purdy, P. H., & Graham, J. K. (2004). Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biology of Reproduction*, 71(2), 522–527.

Quinn, P. J., Chow, P. Y., & White, I. G. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60(2), 403–407.

Salamon, S., & Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Scienc*e, 62(1), 77-111.

sterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*, 11(1), 81–128.

Su, L., Li, X., Quan, J., Yang, S., Li, Y., He, X., & Tang, X. (2008). A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 104(2-4), 212–219.

Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G., & Tainturier, D. (1997). Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*, 34(4), 385–393.

Vishwanath, R., Shannon, P., & Curson, B. (1992). Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 29, 185-194.

Wall, R.J., & Foote, R.H. (1999). Fertility of bull semen frozen and store in clarified egg yolk–Tris–glycerol extender. *Journal of Dairy Science*, 82, 817–821.

Watson P. F. (1975). The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. *Journal of Reproduction and Fertility*, 42(1), 105–111.

Watson, P. F., & Martin, I. C. (1975). Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*, 28(2), 153–159.

Received: 29.03.2023
Accepted: 05.10.2023

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Vol. 20, No. 2, Summer, 2024 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2023.391303.2574

Comparison of diluents containing pigeon plasma egg yolk, chicken plasma egg yolk and their combinations to preservation of ram semen at 4° C

Alireza Hamisi[1], Mohsen Eslami[2*], Hamed Esmaili[3], Farhad Farrokhi-Ardabili[4] and Sina Bahmani[3]

[1] DVSc Student of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Associate Professor, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Graduated from Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[4] Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 29.03.2023 Accepted: 05.10.2023

Abstract

The current study was conducted to evaluate the effect of pigeon plasma egg yolk (PPEY) and chicken plasma egg yolk (CPEY) compared to combination of PPEY+CPEY in tris-citric acid-fructose diluent to preserve the ram semen quality during liquid-cold storage. Semen samples were collected using the artificial vagina from four Qezel rams twice a week. Then, in case if the samples met the criteria, they were pooled and used for the experiment. Tris-citric acid-fructose based extenders were prepared using PPEY (28%, v/v), CPEY (28%), and the combinations of PPEY (7, 14 and 21%) + CPEY (21, 14 and 7 %), and used for the experiment. Following dilution of samples with extenders, total and forward progressive motility of spermatozoa (evaluated by computer assisted sperm analysis), viability and plasma membrane integrity was assessed at 0, 24, 48 and 72 of after cooling. Furthermore, amounts of malondialdehyde (MDA), as an oxidative indicator, were measured at mentioned time points. Results revealed that forward progressive motility (at 24, 48 and 72 h) and viability (at 72 h) were higher in PPEY (28%) group compared to all combination groups. Moreover, membrane integrity (at 24, 48 and 72 h) was greater in PPEY (28%) relative to combination groups containing 14 and 21% CPEY. Amounts of MDA did not differ among treated groups. In conclusion, combinations of PPEY+CPEY was not effective as PPEY (28%) and CPEY (28%) alone to preservation of ram semen during liquid-cold storage.

Key words: Plasma pigeon egg yolk, Ram, Spermatozoa, Malondialdehyde

[*] **Corresponding Author**: Mohsen Eslami, Associate Professor, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail: m.eslami@urmia.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Archive of SID.ir