Iranian Journal of Animal Science
Vol 49, No 3, Autumn 2018 (361-370)
DOI: 10.22059/ijas.2017.233659.653527

علوم دامی ایران
دورۀ ۴۹، شمارۀ ۳، پاییز ۱۳۹۷ (ص ۳۷۰-۳۶۱)

تعیین سطح بهینه زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده انجماد اسپرم بز با ارزیابی‌های برون تنی

محمد تار[۱]، آرمین توحیدی[۲*]، سعید زین‌الدینی[۳] مهدی ژندی[۳] و محمدحسین مؤذنی‌زاده[۴]
۱، ۲، ۳ و ٤. دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، دانشیار و دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۲/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/٦/۲۵)

چکیده

به منظور مقایسه اثر سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ بر انجمادپذیری اسپرم بز، آزمایشی با استفاده از چهار رأس بز در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار انجام شد. نمونه‌ها دو بار در هفته از حیوانات جمع‌آوری و در رقیق‌کننده بر پایه زرده در دو سطح ۱۵ و ۲۰ درصد رقیق و سپس منجمد شدند. پس از یخ‌گشایی، فراسنجه‌های کیفی ازجمله ویژگی‌های حرکتی اسپرم با کمک CASA، یکپارچگی غشا، درصد سلول‌های اسپرم با غشای فعال، درصد سلول‌های اسپرم با شکل طبیعی، وضعیت آپیتوز، یکپارچگی آکروزوم و قطعه‌قطعه‌شدن DNA مورد ارزیابی قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS آنالیز شدند. جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده، در رقیق‌کننده حاوی ۲۰ درصد زرده (به‌ترتیب ۱/٦۹±٦۹/۰۰ و ۱/۲۹±۵۲/۵۷) در برابر ۱۵ درصد زرده (به‌ترتیب ۱/٦۹±٦۸/۲۱ و ۱/۲۹±۵۲/۳۵) تفاوت معنی‌دار نداشت. همچنین درصد اسپرم زنده، اسپرم با غشای فعال و درصد سلول‌های اسپرم طبیعی در رقیق‌کننده حاوی ۲۰ درصد زرده (به‌ترتیب ۱/۰۸±۸۳/۸۸، ۲/٤۳±۷۲/۸۰ و ۱/۸۵±۸٤/۳۱) و در رقیق‌کننده حاوی ۱۵ درصد زرده (به‌ترتیب ۱/۰۸±۸٦/٦۵، ۲/٤۳±۷۲/۳۷ و ۱/۸۵±۷۹/۲۵) اختلاف معنی‌داری نداشتند. درصد اسپرم با آکروزوم سالم و نرخ قطعه‌قطعه‌شدن DNA بین دو گروه آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشت. اما در آزمون آپیتوزیس، سلول‌های اسپرم زنده بیشتری در گروه حاوی ۲۰ درصد (۰/۱۷±٤٦/۱۸) نسبت به گروه حاوی ۱۵درصد (۰/۱۷±٤۵/۵۲) زرده دیده شد (P<۰/۰۵). داده‌های حاضر نشان‌دهنده بهبود نسبی انجمادپذیری اسپرم بز در رقیق‌کننده حاوی ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ است، اما برای اظهارنظر دقیق‌تر در خصوص سطح مناسب زرده در رقیق‌کننده، به مطالعات باروری درون تنی نیاز است.

واژه‌های کلیدی: بز، رقیق‌کننده، زرده تخم‌مرغ، منی.

Determination of the egg yolk optimum level in the goat sperm freezing extender by *In vitro* evaluations

Mohammad Tar[1], Armin Towhidi[2*], Saeed Zeinoaldini[3], Mahdi Zhandi[3] and Mohammad Hossein Moazeni Zadeh[4]
1, 2, 3, 4. M. Sc. Student, Professor, Associate Professor and Ph.D. Candidate, Department of Animal science, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: May 20, 2017 - Accepted: Sep. 16, 2017)

ABSTRACT

This research aimed to evaluate two concentrations of egg yolk inclusion rate (15% and 20%) in the semen extender of goat semen cryopreserved during breeding season. Thirty ejaculates were collected from five trained Mahabadi goats and diluted in egg yolk based extenders. The semen samples were frozen, and after thawing evaluated for seminal characteristics i.e. sperm motility and morphology, membrane and acrosome integrity, viability, apoptosis status and DNA fragmentation. The data were analyzed using GLM procedure in SAS software. There were not significant differences in total and progressive motility of sperm in 20% egg yolk extender (69.00±1.69 and 52.57±1.29 respectively) and 15% egg yolk extender (68.21±1.69 and 52.35±1.29 respectively). Moreover, sperm viability, membrane integrity, and normal sperm cells percentage in extender with 20% and 15% egg yolk were evaluated to be (83.88±1.08, 72.80±2.43, and 84.31±1.85) and (86.65±1.08, 72.37±2.43, and 79.25±1.85) respectively. Also, in the terms of sperm with intact acrosome and DNA fragmentation rate, no significant differences were observed in the extenders. In the apoptosis test, more live sperms were observed in the group containing 20% egg yolk compared with the one containing 15% egg yolk. To elucidate the effect of diluents used in present study on sperm fertility, further studies should be conducted *in vivo*.

Keywords: Egg yolk, extender, goat, Semen.

* Corresponding author E-mail: atowhidi@ut.ac.ir

مقدمه

مهم‌ترین گام برای استفاده از تلقیح مصنوعی، استفاده از محیط انجماد مناسب منی است که بتواند از سلول‌های اسپرم در برابر آسیب‌های انجماد-یخ‌گشایی محافظت کند و زنده‌مانی و جنبایی اسپرم را پس از انجماد-یخ‌گشایی حفظ کند. هدف از اضافه کردن رقیق‌کننده به مایع منی برای انجماد، تأمین انرژی مورد نیاز سلول‌های اسپرم، حفاظت سلول‌ها از آسیب‌های دمایی، کاهش تنش‌های فیزیکی و شیمیایی ناشی از سرد کردن، انجماد و یخ‌گشایی و درنهایت ایجاد یک محیط مناسب برای زنده ماندن اسپرم‌ها است.

تنش سرمایی و تشکیل کریستال‌های یخ درون سلول، مهم‌ترین مشکلات فرآیند انجماد منی هستند که موجب آسیب‌های ساختاری و بیوشیمیایی در اسپرم می‌شوند، به همین جهت برای حفظ انجمادی اسپرم نیاز به سرما محافظ‌ها، وجود دارد. زرده به‌عنوان یکی از اجزای معمول در رقیق‌کننده اسپرم پستانداران استفاده می‌شود. زرده‌ی تخم‌مرغ، سرما محافظ برون سلولی است و اسپرم را از تنش سرمایی محافظت می‌کند. مهم‌ترین بخش نگهدارنده‌ی زرده‌ی تخم‌مرغ، لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین (LDL) هستند که از یکپارچگی غشا طی انجماد محافظت می‌کنند. زرده تخم‌مرغ علاوه بر دارا بودن بخش سرما محافظتی- یعنی لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین- حاوی ترکیبات دیگری است که در عملکرد رقیق‌کننده‌های بر پایه زرده مؤثر می‌باشند. برای مثال زرده تخم‌مرغ حاوی چندین آنتی‌اکسیدان قوی مانند ویتامین E و فسویتین است که دارای پتانسیل بالایی برای مهار واکنش زنجیره‌ای اکسیداسیون، اکسیداسیون لیپید و پراکسیداسیون غشای اسپرم است (Bencharif *et al*., 2008). بر اساس نتایج تحقیقات مختلف آنزیم فسفولیپاز A مترشحه از غدد کوپر بز، باعث آزاد شدن اسیدهای چرب غیراشباع اولئیک و لینولئیک و اسیدهای چرب اشباع پالمیتیک و استئاریک می‌شود که نتیجه این عمل کاهش pH و اختلال در تنفس سلولی (Amoah & Gelaye, 1997) و محدودیت استفاده از زرده در رقیق‌کننده منی بز می‌شود. با این حال مشخص شده که غلظت این آنزیم تغییرات فصلی داشته و در فصل تولید مثلی شاهد حداقل مقادیر این آنزیم در مایع منی بز هستیم (Nunes, 1982). با استفاده از یک رقیق‌کننده مناسب با ترکیبات محافظت‌کننده، می‌توان بر مشکل افت باروری ناشی از کاهش درصد اسپرماتوزوآی زنده، جنبا و طبیعی در پی انجماد-یخ گشایی، غلبه کرد و گام مؤثری در موفقیت تلقیح مصنوعی برداشت.

گزارش شده است که غلظت ۱۲ درصد زرده تخم‌مرغ نسبت به غلظت ۱/۵ و ۶ درصد، بر جنبایی پیش‌رونده و یکپارچگی غشای پلاسمایی و آکروزوم اسپرم بز اثر مثبتی داشت (Cabrera *et al*., 2005). در مطالعه دیگری در فصل تولیدمثلی تفاوت معنی‌داری در نرخ باروری بین رقیق‌کننده‌های منی بز حاوی ۲/۵ و ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ وجود نداشت (Bispo *et al*., 2011). در مطالعه‌ای که بر روی منی قوچ انجام شد، بیشترین و کمترین درصد تحرک اسپرم به ترتیب مربوط به تیمار حاوی ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ و هشت درصد گلیسرول و تیمار حاوی ۱۰ درصد زرده تخم‌مرغ و ۴ درصد گلیسرول بود (Forouzanfar *et al*., 2010). با توجه به این‌که استفاده از درصدهای مختلف زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده منی منجر به گزارش نتایج متفاوت شده، لذا هدف از انجام این پژوهش، دست‌یابی به سطح بهینه زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده منی بز با استفاده از ارزیابی‌های پیشرفته برون تنی برای انجماد اسپرم بز بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در فصل تولیدمثلی و به‌مدت شش هفته در مزرعه پژوهشی علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در شهرستان کرج انجام شد. مراحل انجماد اسپرم در آزمایشگاه فیزیولوژی گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران اجرا گردید. در این پژوهش، از منی چهار بز نر آموزش دیده نژاد مهابادی استفاده شد. بزهای نر با سن ۴-۳ سال، در شرایط یکسان تغذیه‌ای، محیطی و مدیریتی نگهداری شدند. جمع‌آوری منی با استفاده از واژن مصنوعی دو بار در

هفته، به مدت ۶ هفته از اواخر اردیبهشت تا اواخر تیرماه انجام شد. بلافاصله پس از جمع‌آوری منی و انتقال آن به آزمایشگاه، بررسی‌های ابتدایی بر روی منی انجام گردید. نمونه‌های دارای حجم بین ۲-۰/۷۵ میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از $۲/۵\times۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر، جنبایی بیشتر از ۷۰ درصد و اسپرم طبیعی بالاتر از ۸۵ درصد، در هر انزال به‌عنوان نمونه مناسب در نظر گرفته شد و برای حذف اثرات فردی بین بزهای نر، نمونه‌های مناسب مخلوط شدند. رقیق‌کننده حاوی بافر تریس (تریس: ۳۰/۲ گرم در لیتر، سیتریک اسید: ۱۷ گرم در لیتر، فروکتوز: ۱۲/۵ گرم در لیتر)، زرده تخم‌مرغ (۱۵٪ یا ۲۰٪ حجمی/ حجمی)، گلیسرول (۵٪ حجمی/ حجمی) بود. پس از شکستن تخم‌مرغ، زرده‌ی آن به یک دیش استریل منتقل شد و با استفاده از یک سرنگ ۲۰ میلی‌لیتری محتوای سفیده‌ی دور زرده‌ی تخم‌مرغ خارج شد. پس از جداسازی چندین زرده، زرده‌ها را در لوله کونیکال ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و برای همگن کردن زرده، با یکدیگر مخلوط شدند. غلظت مورد استفاده از زرده‌ی تخم‌مرغ در این آزمایش به‌صورت درصد حجمی-حجمی بود. پس از حل کردن زرده‌ی تخم‌مرغ با غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ درصد در محیط بر پایه‌ی بافر تریس، گلیسرول افزوده شد. محیط انجماد پس از تهیه، در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از رقیق‌سازی (۱ حجم منی، ۲۰ حجم رقیق‌کننده)، نمونه‌ها به مدت دو ساعت در یخچال چهار درجه سانتی‌گراد سردسازی شدند. در آخر، جهت پیشگیری از تنش‌های دمایی، پایوت‌ها پیش از پر شدن، در دمای یخچال نگهداری شدند.

ساختار پایوت‌های انجماد به گونه‌ای است که یک‌سوی آن به‌وسیله پلی‌اتیلن گلایکول پوشیده شده و سوی دیگر آن پس از کشیدن نمونه، با استفاده از خمیرهماتوکریت بسته شد. سپس پایوت‌ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در فاصله پنج سانتی‌متری بالای سطح ازت در بخار ازت قرار گرفتند و سپس درون ازت مایع غوطه‌ور شده و در تانک ازت قرار گرفتند. برای یخ‌گشایی منی، پس از خارج کردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، به مدت ۱۰ ثانیه در دمای اتاق و به مدت ۴۵ ثانیه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قرار گرفتند.

در این مطالعه، فراسنجه‌های حرکتی اسپرم با سیستم CASA (CASA, Video Test-Sperm 2.1, St. Petersburg, Russia)، یکپارچگی غشای اسپرم با روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین، ریخت‌شناختی اسپرم با محلول هانکوک، فعالیت غشای اسپرم به روش HOST، وضعیت آپپتوزیس اسپرم به‌روش PSA-FITC و قطعه قطعه شدن DNA به‌روش SCSA انجام گرفت.

فراسنجه‌های آنالیز شده توسط CASA شامل: جنبایی کل ((%) TM)، جنبایی پیش‌رونده (PM) (%)، میانگین سرعت در مسیر ((µm/s) VAP)، سرعت در مسیر مستقیم ((µm/s) VSL)، سرعت در مسیر منحنی ((µm/s) VCL)، جنبایی عرضی سر ((µm/s) ALH)، درصد خطی بودن جنبایی (Lin) (%) و راستی مسیر طی شده ((µm/s) STR) بود. برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. پایه‌ی این روش این‌گونه است که سلول‌های اسپرم مرده، رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند، ولی سلول‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای ارزیابی نمونه ۱۰ میکرو لیتر اسپرم به‌وسیله سمپلر بر روی یک لام گرم و تمیز قرار داده شد. پس از رنگ‌آمیزی، لام‌ها زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ ارزیابی شدند. از هر لام، ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد سلول‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده)، محاسبه شد. برای ارزیابی فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم ۳۰ میکرو لیتر از نمونه منی با ۳۰۰ میکرو لیتر از محیط هایپواسموتیک با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی‌اسمول بر کیلوگرم، مخلوط و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ میکرو لیتر از مخلوط بر روی لام ریخته و لامل گذاری شد. لام حاصل، زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ ارزیابی شد. از هر لام تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای دم گره‌خورده (اسپرم‌های دارای غشای فعال) محاسبه شد (Revell & Mrode, 1994).

برای ارزیابی ریخت‌شناسی، از محلول هانکوک استفاده شد (Hancock, 1994). محیط هانکوک شامل ۶۲/۵ میلی‌لیتر فرمالین (۳۷ درصد)، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سالین، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر است. برای ارزیابی ناهنجاری‌های اسپرم سه قطره از هر نمونه اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به میکروتیوب حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک افزوده شد. سپس یک قطره از این محلول بر روی لام قرارگرفته و لامل گذاری شد و با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. برای محاسبه درصد کل سلول‌های اسپرم غیرطبیعی (غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) تعداد ۲۰۰ اسپرم از هر نمونه مورد بررسی قرارگرفته و شمارش شد.

برای ارزیابی وضعیت آپپتوز پس از یخ‌گشایی با استفاده از روش آنکسین، از فسفاتیدیل سرین به‌عنوان یک نشانگر برای تشخیص زنده بودن یا آپوپتوتیک شدن اسپرم استفاده شد (Zanganeh *et al*., 2013). حضور نشانگر فوق در سطح غشای پلاسمایی اسپرم، از نشانه‌های اولیه آپپتوز است که در حالت طبیعی یا حالت زنده اسپرم در داخل سیتوپلاسم اسپرم یافت می‌شود. در طول فرآیند آپپتوز، فسفاتیدیل سرین از سطح سیتوپلاسمی غشای پلاسمایی به سطح خارج سلولی تغییر مکان می‌دهد. آنکسین در حضور یون کلسیم تمایل زیادی به اتصال به فسفاتیدیل سرین دارد و به‌همین دلیل می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر در تشخیص آپپتوز مورد استفاده قرار گیرد. اگر آنکسین به یک ماده فلورسنت متصل باشد می‌توان با دستگاه فلوسایتومتر مراحل آپپتوز را تشخیص داد. در این روش، به‌طور معمول از آنکسین کونژوگه شده با FITC همراه رنگ PI استفاده می‌شود تا بتوان با آن سه جمعیت سلولی زنده، در مراحل آغازین آپپتوز یا در مرحله نهایی آپپتوز/ نکروز را تشخیص داد. برای اندازه‌گیری میزان جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین غشای اسپرم از کیت آنکسین (IQP-116F, PSD Kit, Netherland) استفاده شد. در نموداری که دستگاه فلوسایتومتر می‌دهد، نمونه‌های آنکسین منفی و PI منفی (A-/PI-) به‌عنوان اسپرم زنده، آنکسین مثبت و PI منفی (A+/PI-) به‌عنوان نمونه زنده ولی دچار آپپتوز اولیه و آنکسین مثبت و PI مثبت (A+/PI+) به‌عنوان اسپرم مرده و دچار آپپتوز ثانویه در نظر گرفته می‌شوند. آنکسین منفی و PI مثبت (A-/PI+) به‌عنوان اسپرم نکروز شده تلقی می‌شود، که آنکسین منفی، PI مثبت و آنکسین مثبت، PI مثبت باهم کل اسپرم مرده را شامل می‌شوند. در این مطالعه، دو گروه آخر به‌عنوان سلول‌های اسپرم مرده در نظر گرفته شدند. تعداد ۱۰۰۰۰ رخداد توسط دستگاه فلوسایتومتری ثبت شد.

برای اندازه‌گیری یکپارچگی آکروزوم، از رنگ فلورسنت PSA-FITC استفاده شد (Emamverdi *et al*., 2013). با استفاده از لامل ۲۴×۲۴ تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus;51BX) با بزرگنمایی ۴۰۰ در اتاق تاریک ارزیابی شد. سلول‌های اسپرم با سر سبز به‌عنوان آکروزوم دست نخورده و سالم، و سلول‌های اسپرم با کمربند سبز به‌عنوان آکروزوم تخریب شده در نظر گرفته شد.

برای تعیین میزان قطعه قطعه شدن DNA از روش SCSA استفاده شد. اساس این روش، وجود حساسیت ساختار کروماتین و DNA در هنگام مواجهه با اسید و ویژگی‌های متاکروماتیک آکریدین اورنژ است. این فلوروکروم به‌عنوان یک منومر بین دوزنجیره DNA قرار می‌گیرد. زمانی که DNA طبیعی است، رنگ سبز و زمانی که فلوروکروم با تک رشته DNA ترکیب شود، رنگ قرمز-نارنجی، از خود ساطع می‌کند. سلول‌های اسپرم رنگ گرفته توسط دستگاه فلوسایتومتری، مشخص می‌شوند. درنهایت، سلول‌های اسپرم با DNA ناسالم از کل سلول‌های اسپرم زنده مشخص می‌شود.

داده‌ها پس از ارزیابی نرمال بودن با نرم‌افزار SAS و با رویه GLM در قالب طرح کاملاً تصادفی با مدل زیر تجزیه و تحلیل شد.

$$Y_{ij}= \mu + A_i + e_{ij}$$

Y_{ij}: مشاهده مربوط به سطح i ام فاکتور A در تکرار j، μ: میانگین جامعه برای صفت موردنظر، A_i: سطح i ام فاکتور A، e_{ij}: اشتباه باقی‌مانده.

نتایج و بحث

ویژگی‌های اسپرم بز در جدول یک و دو نشان داده‌شده است. رقیق‌کننده حاوی ۱۵ درصد زرده باعث تغییر معنی‌داری در میزان جنبایی، درصد سلول‌های اسپرم پیش‌رونده و سلول‌های اسپرم زنده در مقایسه با رقیق‌کننده حاوی ۲۰ درصد زرده نشد (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از آنالیز کامپیوتری (CASA) مرتبط با جنبایی در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. میانگین (LSMeans) فراسنجه‌های جنبایی اسپرم بز در تیمارهای مختلف پس از یخ گشایی

Table 1. The effect of different extenders on post-thaw sperm motility and motion parameters (Lsmean ± SEM)

Parameters	15% yolk	20% yolk
TM (%)	69.00 ± 1.70	68.21 ± 1.68
PM (%)	52.57 ± 1.24	52.35 ± 1.34
Lin (%)	32.45 ± 0.84	33.77 ± 0.90
VSL (µm/s)	28.79 ± 2.37	31.62 ± 2.22
VCL (µm/s)	72.22 ± 5.30	78.71 ± 4.56
VAP (µm/s)	37.06 ± 2.86	40.67 ± 2.84
ALH (µm/s)	2.10 ± 0.09	2.24 ± 0.16
STR (µm/s)	64.07 ± 1.13	66.03 ± 1.03
BCF(Hz)	11.30 ± 0.4	11.87 ± 0.48

TM (جنبایی کل)، PM (حرکت پیش‌رونده)، VAP (سرعت در مسیر میانگین)، VSL (سرعت در مسیر مستقیم)، VCL (سرعت در مسیر منحنی)، ALH (جنبایی عرضی سر)، LIN (خطی بودن جنبایی) و STR (راستی مسیر طی شده)

یکی از مهم‌ترین عوامل انجماد موفق، جنبایی مناسب اسپرم پس از فرآیند انجماد- ذوب است. ادعا شده است که برخی از مواد موجود در زرده تخم‌مرغ مانع تنفس و کاهش جنبایی اسپرم می‌شود که این عمل با افزایش درصد زرده بیشتر می گردد (Aires *et al*., 2003). اما در پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ مشاهده نشد. زرده تخم‌مرغ ترکیب رایج رقیق کننده‌های منی برای بیشتر گونه‌های اهلی است، که نقش آن محافظت غشای اسپرم مقابل شوک سرمایی است. به هر حال فسفولیپازهای موجود در پلاسمای منی که با لسیتین زرده اثر متقابل می‌دهند، ترکیبات سمی برای اسپرماتوزوآ تولید می‌کنند که استفاده از زرده تخم‌مرغ را به غلظت‌های پایین یا به دوره‌هایی از سال که فعالیت فسفولیپازی کاهش یافته، محدود می‌کند (Ritar & Salamon., 1991). در طول فصل غیرتولیدمثلی در اثر غلظت بالای پرولاکتین فعالیت غدد پیازی- پیشابراهی افزایش یافته و فسفولیپاز A بیشتری تولید می‌شود. از طرفی سطوح فسفولیپاز A در فصل تولیدمثلی در کمترین مقدار خود در پلاسمای منی در مقایسه با منی جمع‌آوری شده در خارج فصل تولید مثل است (Nunes, 1982). تفاوت سطوح تستوسترون سرم در فصل تولیدمثل و غیرتولیدمثل (۳۴۶/۷ ng/dl در برابر ۲۸۸/۵۷ ng/dl) نیز ممکن است در تحریک غدد پیازی- پیشابراهی و تولید آنزیم‌های لخته‌کننده زرده مؤثر باشد (Bispo *et al*., 2011). گزارش شده که آنزیم لیزوفسفولیپاز توسط برخی ترکیبات زرده مهار می‌شود، بر این اساس که نسبت فسفولیپاز A به لیزوفسفولیپاز در منی رقیق نشده (۱ به ۱۰) طی رقیق‌سازی کاهش یافت (۱ به ۱/۵) (Chauchan & Ananed, 1990). چندین پروتئین نظیر بتالاکتوگلوبولین، ترانسفرین و آلبومین اثر مثبت غیراختصاصی بر فعالیت لیپاز غدد پیازی- پیشابراهی دارند و می‌توان گفت که این‌ها یا پروتئین‌های مشابه پلاسمای منی غلظتشان تغییرات فصلی داشته و فعالیت آنزیمی پلاسمای منی را تعدیل می‌کند (Pelicer-Rubio & Combarnous, 1998). از این‌رو استفاده از غلظت‌های بالاتر زرده تخم‌مرغ در رقیق کننده و افزایش فشار اسمزی متعاقب آن، منجر به دهیدراسیون سلولی و کاهش تشکیل یخ درون سلولی طی فرآیند انجماد می‌شود و همچنین با جایگزینی فسفولیپیدهای تخریب شده روی سطح سلول در اثر شوک حرارتی و تثبیت غشا، برای جلوگیری از اختلال در غشا عمل می‌کند (Bispo *et al*., 2011). گزارش شده است که ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده طی فصل تولیدمثلی منجر به افزایش تحرک اسپرم یخ‌گشایی شده بز شد (Daskin & Tekin, 1996). برخی محققان (Ferreia *et al*., 2014; Cabrera *et al*., 2005; Bispo *et al*., 2011) مشاهده کردند که بیشترین غلظت استفاده شده زرده تخم‌مرغ (به‌ترتیب ۱۲، ۱۰ و ۲۰درصد) در رقیق‌کننده منی در فصل تولیدمثل منجر به بهبود خصوصیات حرکتی و باروری اسپرم یخ‌گشایی شده بز شد. تیمار ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ به همراه ۷ درصد گلیسرول دارای بیشترین تحرک اسپرم پس از انجماد-یخ

گشایی بوده و تیمار ۱۵ درصد زرده تخم‌مرغ به‌همراه ۵ درصد گلیسرول کمترین جنبایی اسپرم یخ‌گشایی شده قوچ را داشته است (Forouzanfar *et al*., 2010). در تحقیقی متفاوت که بر روی بز مرخز انجام شد، میزان جنبایی پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده حاوی ۱۵ درصد زرده تخم‌مرغ بیشترین و ۲۰ درصد کمترین بوده است (Naijian *et al*., 1396). همچنین در تحقیقی که بر روی بز سانن انجام شد، نشان داده شد که ۱۸ درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده نسبت به ۱۲ و ۶ درصد تحرک پایین‌تری را ایجاد کرد (Ustuner *et al*., 2009). همچنین Dias (2010) مشاهده کرد که غلظت‌های پایین‌تر زرده (۲/۵ درصد) نتایج بهتری را ایجاد می‌کند. طبق نتایج Bispo *et al*. (2011) غلظت ۲/۵ درصد زرده تخم‌مرغ نسبت به غلظت ۲۰ درصد نرخ آبستنی را در فصل غیر تولیدمثلی افزایش داد. علت مغایرت این گزارشات با تحقیق حاضر را می‌توان به تفاوت در ترکیبات رقیق‌کننده، نسبت رقیق سازی، نوع و گونه حیوان، تفاوت فصل نمونه‌گیری و یا به‌کارگیری سطوحی متفاوت از سطوح زرده تخم مرغ به‌کار رفته در این پژوهش، نسبت داد. با این وجود، به‌نظر می‌رسد اثر منفی زرده تخم‌مرغ بر فعالیت انجمادی اسپرم بز بیشتر برای نژادهای بز کشورهای مناطق معتدله و عرض جغرافیایی بالا طی فصل غیر تولیدمثلی اهمیت داشته و ممکن است این اثر برای نژادهای مناطق گرمتر که فعالیت تولیدمثلی‌شان کمتر تحت تاثیر تغییرات فصلی قرار می‌گیرد، اهمیت نداشته باشد.

همچنین نتایج حاصل از آنالیز داده‌های آزمون یکپارچگی غشا و ریخت‌شناسی نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین سطوح زرده تخم‌مرغ وجود ندارد ($P<۰/۰۵$).

حدود ۶۰ درصد زرده تخم‌مرغ را لیپوپروتئین‌های با چگالی کم تشکیل می‌دهند که ۱۰ تا ۱۵ درصد از این مقدار را منابع فسفولیپیدی ازجمله فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل سرین تشکیل می‌دهد. به نظر می‌رسد که بخش تأثیرگذار لیپوپروتئین‌های با چگالی کم منابع فسفولیپیدی هستند که با تشکیل لایه محافظتی در اطراف غشای اسپرم باعث محافظت اسپرم در برابر آسیب‌های سرمایی می‌شوند. پیشنهادشده است که فسفولیپیدها می‌توانند یک‌لایه محافظتی را در سطح غشای اسپرم بعد از ژلاتینِ شدن لیپوپروتئین‌ها به وجود بیاورند (Phillips *et al*., 2009). همچنین گزارش دادند که فسفولیپیدهای موجود در لیپوپروتئین‌های با چگالی کم می‌توانند مقداری از فسفولیپیدهای غشای اسپرم که در حین آسیب سرمایی از بین می‌روند، جایگزین کنند (Graham *et al*., 1987). زرده تخم مرغ احتمالا از طریق کاهش خسارت‌های ناشی از ترکیبات فعال اکسیژن از غشا پلاسمایی اسپرم محافظت میکند.

جدول ۲. میانگین (LSMeans) برخی صفات مربوط به زنده‌مانی، سلول‌های اسپرم هنجار و DNA سالم در تیمارهای مختلف پس از یخ‌گشایی

Table 2. The effect of different extenders on post-thawed sperm parameters: sperm viability, sperm morphology and intact DNA (LSMean ± SEM)

Parameters	15% yolk	20%yolk
Membrane integrity	83.88±1.11	86.65±105
Sperm viability	72.80±2.46	72.35±2.41
Normal sperm	85.31±1.76	79.25±1.92
Sperm with intact acrosome	64.93±2.76	69.53±2.81
DNA fragmentation rate	1.75±1.77	1.38±1.74

Membrane integrity (یکپارچگی غشای پلاسمایی)، Sperm viability (زنده‌مانی اسپرم)، Normal sperm (اسپرم هنجار)، Sperm with intact acrosome (اسپرم با آکروزوم سالم)، DNA fragmentation rate (نرخ قطعه قطعه شدن DNA).

فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل سرین مؤثرترین بخش فسفولیپیدی برای حفاظت از اسپرماتوزوا هستند (Graham *et al*., 1987). افزودن لیپوزوم‌های تشکیل شده از فسفاتیدیل کولین زرده تخم‌مرغ سبب تغییر دمای فاز انتقال لیپیدهای غشای اسپرم و درنتیجه سبب کاهش حساسیت اسپرم به سرما شده است (Zeron, *et al*., 2002). لیپوپروتئین‌های زرده به غشای پلاسمایی اسپرم می‌چسبند و این می‌تواند به تماس محکم بین غشای پلاسمایی اسپرم و فسفولیپیدها کمک کند و درنتیجه می‌تواند به حفظ غلظت بالای لیپید نزدیک به غشای اسپرم، کمک کند (Watson *et al*., 2000).

همان‌گونه‌که در جدول ۲ مشاهده می‌شود بین دو سطح زرده از نظر درصد آکروزوم سالم تفاوت معنی‌داری

وجود ندارد. عملکرد آکروزوم برای توانایی لقاح سلول‌های اسپرم ضروری است، زیرا آنزیم‌های آکروزوم اجازه می‌دهند تا آن‌ها به غشای پلاسمای تخمک منتقل شوند. حفظ انجمادی موجب تغییراتی در ریخت‌شناسی اسپرم، آسیب به آکروزوم، آسیب میتوکندریایی و آسیب به دم اسپرم می‌شود. آکروزوم، آنزیم‌های ضروری برای نفوذ اسپرم به تخمک را ذخیره می‌کند. آکروزین یکی از پروتئازها است که به شکل غیرفعال (پروآکروزین) در آکروزوم ذخیره می‌شود. بعد از واکنش آکروزومی، پروآکروزین تبدیل به آلفا آکروزین شده و به آکروزوم می‌چسبد. سپس آلفا آکروزین خودبه‌خود تبدیل به بتا آکروزین شده و به داخل محیط داخل سلولی رها می‌شود. فعال شدن پروآکروزین به‌شدت بستگی به pH داخل آکروزومی دارد. طی فرایند انجماد یخ گشایی، آسیب به غشای پلاسمایی ممکن است منجر به افزایش pH داخل سلولی شود که فعال شدن پروآکروزین را تسریع می‌کند و درنتیجه درصد اسپرم با آکروزوم سالم پس از انجماد را کاهش می‌دهد (Bucak, *et al*., 2008). اضافه کردن زرده تخم‌مرغ به رقیق‌کننده می‌تواند در هنگام یخ گشایی، جنبایی و یکپارچگی آکروزوم را افزایش دهد (Dorado *et al*., 2007). آسیب سرمایی به اسپرم، ممکن است ساختاری و یا بیوشیمیایی باشد که بیشتر این آسیب‌ها، در غشای پلاسمایی، غشای آکروزومی و آکروزوم، اتفاق می‌افتد. غشای پلاسمایی و آکروزوم اسپرم، نسبت به بخش‌های هسته‌ای، بیشتر در معرض آسیب قرار می‌گیرند و به‌صورت جزئی‌تر، غشای بیرونی آکروزوم نسبت به غشای درونی آن آسیب‌پذیرتر است (Bousseau *et al*., 1994). یک رابطه مستقیم بین درصد سلول‌های اسپرم با آکروزوم سالم و درصد سلول‌های اسپرم متحرک بعد از انجماد وجود دارد (Stoll *et al*., 2011). از طرف دیگر، باروری اسپرم رابطه مستقیمی با درصد اسپرم با آکروزوم سالم دارد (Dhami *et al*., 1992) گزارش کردند که غلظت‌های بالای زرده تخم‌مرغ، میزان آسیب کروموزومی و درصد سلول‌های اسپرم غیرطبیعی را افزایش می‌دهد.

در این تحقیق، نرخ قطعه‌قطعه شدن DNA ارزیابی (جدول ۲) و مشخص شد اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود ندارد و رقیق‌کننده‌ها توانستند به یک اندازه از سلامت DNA اسپرم، طی فرایند انجماد یخ گشایی محافظت کنند. اسپرم نه‌تنها در فعال‌سازی تخمک مؤثر است، بلکه نیمی از ژنوم نسل آینده توسط اسپرم منتقل می‌شود و سلامت آن جهت تکوین جنینی، اهمیت بالایی دارد. یکپارچگی DNA اسپرم نشانه‌ای واقعی از کارکرد طبیعی اسپرم است. وجود DNA طبیعی در اسپرم، به کاهش مرگ‌ومیر اولیه رویانی، کمک می‌کند. گزارش‌شده است که اسپرم گاوهای با باروری بالا، در طی فرایند انجماد یخ گشایی، به مقدار ۱/۲ تا ۳ درصد، دچار آسیب کروماتینی، شده‌اند. توان باروری اسپرم گاوها با افزایش صدمه به DNA، کاهش می‌یابد. نرخ بالای آسیب به DNA اسپرم، همراه با تضعیف رشد رویان قبل از جایگزینی، نقص در جایگزینی و افزایش مرگ‌ومیر اولیه رویان است. انجماد اسپرم منجر به قطعه‌قطعه شدن DNA و آپپتوز شده است (Hinsch *et al*., 2000). همچنین در یک مطالعه، بین درصد سلول‌های اسپرم با DNA دناتوره شده و آسیب به غشای پلاسمایی اسپرم همراه با آپپتوز، همبستگی معنی‌داری مشاهده شده است (Holt *et al*., 2010). بین آسیب به کروماتین اسپرم و باروری آن نیز یک همبستگی منفی معنی‌داری گزارش شده است (Hu *et al*., 2010). دناتوره شدن کروماتین اسپرم به‌وسیله انجماد، تحت تأثیر نوع رقیق‌کننده قرار می‌گیرد (Kaufmann *et al*., 2001). مشاهده شده است که پراکسیداسیون لیپید بالاتر در اسپرم، نرخ قطعه‌قطعه شدن DNA بالاتر و یکنواختی غشای پلاسمایی پایین‌تری ایجاد می‌کند (Wilhelm *et al*., 1996).

جدول ۳. اثر رقیق‌کننده‌های مختلف بر وضعیت آپپتوزیس اسپرم یخ‌گشایی شده بز (LSMeans)

Table 3. The effect of different extenders on apoptosis status of post thawed goat sperm (LSMeans)

Parameters	15% yolk	20% yolk	SEM	P.value
An-/PI-	45.52[b]	46.18[a]	0.17	0.01
An+/PI-	33.96[b]	35.18[a]	2.94	0.03
An-/PI+	1.5	1.75	0.62	0.69
An+/PI+	25.26	33.42	2.84	0.07

میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک لاتین نیستند، تفاوت معنی‌داری دارند (P <۰/۰۵).

Means with different letters have significantly differences at 5% of probability level.

همان‌گونه‌که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، رقیق‌کننده حاوی ۲۰ درصد زرده، درصد اسپرم‌های زنده (۴۶/۱۸) بیشتری را به خود اختصاص داده است. همچنین کمترین درصد اسپرم با آپپتوز اولیه متعلق به گروه حاوی ٪۱۵ درصد بود. میزان LDL از عواملی است که کیفیت زرده تخم‌مرغ را تحت تأثیر قرار می‌دهد و افزایش آن، سبب می‌شود که در هنگام تجزیه شدن طی تنش سرمایی، فسفولیپیدهای آن آزاد و جایگزین فسفولیپیدهای آسیب‌دیده شود. تنش‌های حرارتی و اکسیداتیو ناشی از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی در اسپرم، حالت‌های مختلفی از آپپتوز را در میتوکندری ایجاد می‌کند که به نوبه خود منجر به تولید پروتئین‌ها و آنزیم‌های آپوپتوتیک و DNase از میتوکندری شده که منجر به کاهش تولید ATP می‌شود. Molinia *et al.* (1994) مشاهده نمودند که درصد بازیابی اسپرماتوزا با اضافه نمودن ۱۸/۵ درصد در مقایسه ۴/۵ درصد بهبود یافت.

طی فرآیند انجماد- یخ گشایی تنش سرمایی به شدت فسفولیپیدها و گلیکوپروتئین‌های موجود در سطح غشا را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث شروع آسیب‌های ساختاری و بیوشیمیایی می‌شود. برای جلوگیری از این آسیب‌ها علاوه بر سرما محافظ‌های درون‌سلولی به سرما محافظ‌های خارج سلولی نیز نیاز است (Martínez-Soto *et al*., 2013; Schiller *et al*., 2000). لیپیدها برای افزایش سیالیت غشای اسپرم، جلوگیری از تشکیل کریستال یخ در اسپرم در طول فرآیند انجماد و افزایش ظرفیت باروری در اسپرم استفاده می‌شود (Maldjian *et al*., 2005). در برخی از مطالعات، گزارش شده است که دلیل کیفیت پایین‌تر اسپرم در گروه‌های حاوی زرده کمتر از ٪۲۰، احتمالاً به‌علت کاهش مقدار LDL است که محافظت از اسپرم در برابر تنش سرمایی، حفظ یکپارچگی غشای پلاسمایی و بهبود غشای اسپرم در برابر آسیب اکسیداتیو را بر عهده دارد (Ferreia *et al*., 2014; Dashkin *et al*., 1996; Hu *et al*., 2011).

نتیجه‌گیری

هدف از آزمایش حاضر تعیین بهترین سطح زرده تخم‌مرغ برای انجماد اسپرم بز بود. نتایج آزمایش تفاوت معنی‌داری بین تیمارها در فراسنجه های CASA، یکپارچگی غشای اسپرم، اسپرم با غشای فعال، یکپارچگی آکروزوم و قطعه قطعه شدن DNA نشان نداد. در ارزیابی آپپتوتیک، بیشترین درصد زنده‌مانی اسپرم مربوط به رقیق‌کننده حاوی زرده ۲۰ درصد بود که نشان می‌دهد استفاده از غلظت۲۰ درصد زرده بهتر از ۱۵ درصد بوده و محافظت بهتری از اسپرم بز طی فرایند انجماد- یخ‌گشایی داشته است. از طرفی چون اغلب آزمون‌های کیفی به کار رفته اختلاف معنی‌داری را در دو سطح زرده نشان نداد، به‌نظر می‌رسد برای اظهارنظر دقیق‌تر نیاز به ارزیابی باروری درون تنی وجود دارد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در قالب طرح تحقیقاتی با شماره ۷۱۰۸۰۱۷/۶/۳۲ انجام شده است.

REFERENCES

1. Aboagla, E. M. E. & Terada, T. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1245-1250.
2. Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S. & Hinsch, E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60(2), 269-279.
3. Aisen, E. G., Medina, V. H. & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. Theriogenology, 57(7), 1801-1808.
4. Aitken, R. J., Lambourne, S. & Gibb, Z. (2014). The John Hughes Memorial Lecture: aspects of sperm physiology-oxidative stress and the functionality of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(1), 17-27.
5. 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.

6. Amoah, E. A. & Gelaye, S. (1997). Biotechnological advances in goat reproduction. *Journal of Animal Science*, 75(2), 578-585.
7. Barbas, J. P. & Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, 10(1), 49-62.
8. Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G. & Tainturier, D. (2008). The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 70(9), 1478-1488.
9. Bispo, C. A. S., Pugliesi, G., Galvão, P., Rodrigues, M. T., Ker, P. G., Filgueiras, B. & Carvalho, G. R. (2011). Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 100(1), 54-58.
10. Bousseau, S. & Brillard, J. P. (1994). In vitro and in vivo results of fertility in cattle, following inseminations performed with semen diluted and frozen in a diluent free of animal origin products (Biociphos Plus). In: *European AI Vets*. Sixth Meeting. Edinburgh, Scotland.
11. Bucak, M. N., Ateşşahin, A. & Yüce, A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Ruminant Research*, 75(2), 128-134.
12. Cabrera, F., Gonzalez, F., Batista, M., Calero, P., Medrano, A. & Gracia, A. (2005). The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reproduction in Domestic Animals*, 40(3), 191-195.
13. Chauhan, M. S. & Anand, S. R. (1990). Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology*, 34(5), 1003-1013.
14. Daskin, A. & Tekin, N. (1996). The effect of egg-yolk on the quality of frozen Angora buck semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 20(5), 395-398.
15. Dhami, A. J., Sahni, K. L. & Mohan, G. (1992). Effect of various cooling rates (from 30° C to 5° C) and thawing temperatures on the deep-freezing of BosTaurus and BosBubalis semen. *Theriogenology*, 38(3), 565-574.
16. Dias, J. C. O. (2010). *Adição de ringer lactato, citrato de sódio 2, 92% e solução tris em sêmen caprino descongelado*. Dissertaçao (M.Sc.). Universidade Federal de Vi çosa, Viçosa, MG.
17. Dorado, J., Rodríguez, I. & Hidalgo, M. (2007). Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, 68(2), 168-177.
18. Emamverdi, M., Zhandi, M., Zare Shahneh, A., Sharafi, M. & Akbari-Sharif, A. (2013). Optimization of Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically Defined Soybean Lecithin-Based Extender. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(6), 899-904
19. Farshad, A., Khalili, B. & Fazeli, P. (2009). The effect of different concentrations of glycerol and DMSO on viability of Markhoz goat spermatozoa during different freezing temperatures steps. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(3), 239.
20. Ferreira, V. D. S., Mello, M. R. B. D., Fonseca, C. E. M. D., Dias, Á. C. F., Cardoso, J. M., Silva, R. B. & Martins Júnior, W. P. (2014). Effect of seminal plasma and egg yolk concentration on freezability of goat semen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(10), 513-518.
21. Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L. & Nasr-Esfahani, M. H. (2010). In vitro comparison of egg yolk–based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 73(4), 480-487.
22. 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.
23. Hancock, J. L. (1956). The morphology of boar spermatozoa. *Journal of Microscopy*, 76(3), 84-97.
24. Hinsch, E., Hinsch, K. D., Boehm, J. G., Schill, W. B. & Mueller-Schloesser, F. (1997). Functional Parameters and Fertilization Success of Bovine Semen Cryopreserved in Egg-yolk Free and Egg-yolk Containing Extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, 32(3), 143-149.
25. Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 3-22.
26. Hu, J. H., Jiang, Z. L., Lv, R. K., Li, Q. W., Zhang, S. S., Zan, L. S., ... & Li, X. (2011). The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*, 62(1), 83-87.
27. 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), 11-17.
28. Kaufmann, S. H. & Hengartner, M. O. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biology*, 11(12), 526-534.
29. Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T., Cerolini, S., Penny, P. & Noble, R. (2005). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*, 63(2), 411-421.
30. Martínez-Soto, J. C., Landeras, J. & Gadea, J. (2013). Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*, 1(3), 365-375.

31. Nunes, J. F., Corteel, J. M., Combarnous, Y., Baril, G. & Leboeuf, B. (1982). Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. *Reproduction Nutrition Développement*, 22(4), 611-620.
32. Phillips, P. H. & Lardy, H. A. (1940). A Yolk-Buffer Pabulum for the Preservation of Bull Semen1. *Journal of Dairy Science*, 23(5), 399-404.
33. Naijian, H. R., Sadeghipanah, H. & Masoudi, R. (1396). Comparison different concentration of egg yolk and soybean lecithin on the function of Marghoz goat spermatozoa. *Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 116, 29-40. (in Farsi)
34. Pellicer-Rubio, M. T. & Combarnous, Y. (1998). Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *Journal of Reproduction and Fertility*, 112(1), 95-105.
35. Purdy, P. H. (2006). The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48h at 5°C prior to cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 93(1), 114-123.
36. Revell, S. G. & Mrode, R. A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2), 77-86.
37. Ritar, A. J. & Salamon, S. (1991). Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Ruminant Research*, 4(1), 29-37.
38. Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M. & Sharafi, M. (2014). In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, 68(2), 276-280.
39. Schiavon, R. S., Gastal, G. D. A., Goulart, K. L., Tonieto, R. A., Lucia Júnior, T. & Deschamps, J. C. (2010). Cryprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram sperm. *Small Ruminant Research*, 93(2), 206-209.
40. Schiller, J., Arnhold, J., Glander, H. J. & Arnold, K. (2000). Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy- effects of freezing and thawing. *Chemistry and Physics of Lipids*, 106(2), 145-156.
41. Stoll, C., Stadnick, H., Kollas, O., Holovati, J. L., Glasmacher, B., Acker, J. P. & Wolkers, W. F. (2011). Liposomes alter thermal phase behavior and composition of red blood cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(1), 474-481.
42. Tarig, A. A., Wahid, H., Rosnina, Y., Yimer, N., Goh, Y. M., Baiee, F. H. & Ebrahimi, M. (2017). Effect of different concentrations of egg yolk and virgin coconut oil in Tris-based extenders on chilled and frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, 182, 21-27.
43. Tonieto, R. A., Goularte, K. L., Gastal, G. D. A., Schiavon, R. S., Deschamps, J. C. & Lucia, T. (2010). Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research*, 93(2), 206-209.
44. Ustuner, B. U. R. C. U., Gunay, U. & Nur, Z. E. K. A. R. I. Y. A. (2009). Effect of seminal plasma, egg yolk, and season on the freezability of Saanen buck semen. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 53, 369-374.
45. Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60, 481-492.
46. Wilhelm, K. M., Graham, J. K. & Squires, E. L. (1996). Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. *Cryobiology*, 33(3), 320-329.
47. Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneh, A., Najafi, A., Nabi, M. M. & Mohammadi-Sangcheshmeh, A. (2013). Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation?. *Small Ruminant Research*, 114(1), 120-125.
48. Zeron, Y., Tomczak, M., Crowe, J. & Arav, A. (2002). The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology*, 45(2), 143-152.