The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http:// ijas.ut.ac.ir/

Evaluation of the effects of crocin addition on canine semen dilution during refrigerated storage

Saeed Salehi[1], Ali Soleimanzadeh[2]✉, Sandra Goericke-Pesch[3], Esmail Ayen[4]

1. Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Email: dvm.saeed@gmail.com
2. Corresponding author, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Email: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir
3. Department of Small Animal Reproductive Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Hanover, Hanover, Germany. Email: sandra.goericke-pesch@tihohannover.de
4. Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Email: ayenesmail@gmail.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 11 October 2022

Received: 12 December 2022

Accepted: 28 December 2022

Published online: 22 June 2023

Keywords:

Antioxidants,

Crocin,

dog sperm,

Oxidative stress.

ABSTRACT

Artificial insemination is one of the most accessible techniques for raising domestic animals. It has been proven that refrigeration significantly reduces the quality of sperm. The aim of this study is to investigate the effects of crocin on the storage of dog semen at 4 ºC during a period of 48 hours. In this study, 25 ejaculates were collected from 5 terrier dogs and diluted in a Tris-based diluent. Then, they were divided into 5 parts in control, control dissolve (Dimethyl sulfoxide 5%, dissolve of crocin) and treated with 0.5, 1 and 1.5 mM crocin groups. Sperm parameters including evaluation of total motility, progressive motility, motility characteristics and sperm viability were evaluated for 48 hours. The obtained results showed that progressive motility and total motility during 48 hours of storage were significantly higher in 1.5, 1, and 0.5 mM crocin concentrations compared to the control group. Also, the examination of motility characteristics, except for STR, showed that the addition of 1.5 mM crocin significantly improved the characteristics compared to the control group. Investigating sperm viability showed that the addition of 1.5, 1 and 0.5 mM crocin significantly improves sperm viability. As a result, the present study determined that the addition of crocin to dog semen can improve the parameters of dog semen after liquid storage.

Cite this article: Salehi, S., Soleimanzadeh, A., Goericke-Pesch, S., & Ayen, E. (2023). Evaluation of the effects of crocin addition on canine semen dilution during refrigerated storage. *Iranian Journal of Animal Science*, 54 (2), 303-315. DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2022.349661.653911

© The Author(s).
Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2022.349661.653911

Extended Abstract

Introduction

Artificial insemination is one of the most accessible techniques for raising domestic animals. It has been proven that refrigeration significantly reduces the quality of sperm. Various studies have shown that sperm cooling and freezing leads to increased oxidative stress and excessive reactive oxygen species production, and this process ultimately leads to membrane lipid peroxidation and sperm damage. In general, the introduction of sperm into a laboratory environment leads to lipid peroxidation and ultimately decreases DNA quality and integrity. During sperm storage, there are insufficient antioxidants to prevent free radical damage and lipid peroxidation in sperm. Sperm freezing leads to problems such as decreased sperm viability and motility after the freeze-thaw process. The aim of this study is to investigate the effects of crocin on the storage of dog semen at 4 ºC during a period of 48 hours.

Materials and Methods

In this study, 25 ejaculates were collected from 5 terrier dogs and diluted in a Tris-based diluent. Then, they were divided into 5 parts in control, control dissolve (Dimethyl sulfoxide 5%, dissolve of crocin) and treated with 0.5, 1 and 1.5 mM crocin groups. Sperm parameters including evaluation of total motility, progressive motility, motility characteristics and sperm viability were evaluated for 48 hours. The obtained results showed that progressive motility and total motility during 48 hours of storage were significantly higher in 1.5, 1, and 0.5 mM crocin concentrations compared to the control group. Also, the examination of motility characteristics, except for STR, showed that the addition of 1.5 mM crocin significantly improved the characteristics compared to the control group. Investigating sperm viability showed that the addition of 1.5, 1 and 0.5 mM crocin significantly improves sperm viability.

Discussion

This study is to investigate the effects of crocin on the storage of dog semen at 4 ºC during a period of 48 hours. The present results showed that sperm samples containing crocin significantly improve the qualitative parameters of dog sperm after storage so that the fertility potential can be increased. The process of freezing-thawing and preserving sperm increases reducing sperm motility and viability and increasing the amount of free radicals. The before studies showed that the quality and integrity of the sperm plasma membrane is positively related to the rate of fertility. In the present study, it has been shown that the viability of sperm decreases during storage in the refrigerator. Also, the present study showed that adding crocin to dog semen increases sperm viability. As a result, the present study determined that the addition of crocin to dog semen can improve the parameters of dog semen after liquid storage. In this study, dose-dependent positive effects of crocin on quality parameters of dog sperm during refrigerated storage were shown. Considering the positive effects of crocin, the present study confirms the use of crocin in canine semen extenders. However, more research on fertility rates with crocin-containing sperms is needed to confirm its protective effects.

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۴، شماره ۲

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

بررسی اثرات افزودن کروسین بر رقیق‌کننده مایع منی سگ در طی نگهداری در یخچال

سعید صالحی [۱] | علی سلیمان‌زاده [۲] ✉ | ساندرا گوریکه-پش [۳] | اسماعیل آین [۴]

۱. گروه مامایی و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: dvm.saeed@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه مامایی و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

۳. گروه تولیدمثل دام های کوچک، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه هانوفر، هانوفر، آلمان. رایانامه: sandra.goericke-pesch@tihohannover.de

۴. گروه مامایی و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران رایانامه: ayenesmail@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۹/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۴/۰۱

کلیدواژه‌ها:

آنتی‌اکسیدان، اسپرم سگ، تنش اکسیداتیو، کروسین.

چکیده

تلقیح مصنوعی با استفاده از منی سرد یکی از تکنیک‌های قابل‌دسترس در پرورش حیوانات اهلی است، اما فرایند سرد کردن به دلیل افزایش تنش اکسیداتیو سبب کاهش چشمگیری در کیفیت اسپرم می‌شود. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات کروسین بر نگهداری مایع منی سگ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در طی دوره ۴۸ ساعته است. در این مطالعه، ۲۵ انزال از ۵ سگ نژاد تریر گرفته شد و در یک رقیق‌کننده بر پایه تریس رقیق شدند. سپس، آن‌ها به ۵ قسمت در گروه‌های شاهد، شاهد حلال (دی‌متیل‌سولفوکساید ۵ درصد حلال کروسین) و تیمار شده با ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار کروسین تقسیم شدند. فراسنجه‌های اسپرم ازجمله، جنبایی کل و پیش‌رونده، شاخص‌های جنبایی و قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها به مدت ۴۸ ساعت ارزیابی شدند. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که جنبایی پیش‌رونده و کلی در طی ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی به ترتیب در غلظت‌های ۱/۵، ۱ و ۰/۵ میلی‌مولار کروسین در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر بودند. همچنین بررسی شاخص‌های جنبایی به‌استثناء راستی مسیر طی شده نشان دادند که افزودن ۱/۵ میلی‌مولار کروسین به‌طور معنی‌داری باعث بهبود شاخص‌ها نسبت به گروه شاهد می‌شود. بررسی قابلیت زنده¬ماندن اسپرم‌ها نشان داد که به‌طور معنی‌داری افزودن به ترتیب ۱/۵، ۱ و ۰/۵ میلی‌مولار کروسین باعث بهبود زنده‌مانی اسپرم‌ها می‌شود. درنتیجه، مطالعه حاضر نشان داد که افزودن کروسین به مایع منی سگ، می‌تواند فراسنجه‌های منی سگ را پس از ذخیره‌سازی به‌صورت مایع بهبود ببخشد.

استناد: صالحی، سعید؛ سلیمان‌زاده، علی؛ گوریکه-پش، ساندرا؛ و آین، اسماعیل (۱۴۰۲). بررسی اثرات افزودن کروسین بر رقیق‌کننده مایع منی سگ در طی نگهداری در یخچال. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۴ (۲)، ۳۱۵-۳۰۳. DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2022.349661.653911

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2022.349661.653911

مقدمه

استفاده از تلقیح مصنوعی فواید متعددی نسبت به جفت‌گیری طبیعی دارد که می‌توان به کاهش نیاز انتقال حیوانات جهت جفت‌گیری، عدم نیاز برای قرنطینه‌سازی، کاهش گسترش بیماری‌های عفونی و از همه مهم‌تر ذخیره‌سازی منی برای استفاده آتی و تبادل بین‌المللی مواد ژنتیکی اشاره کرد. در مواقعی که مشکلات جسمانی مانند آسیب به مهره‌های کمر در سگ‌های کار و نگهبان جفت‌گیری طبیعی را مشکل می‌سازد، تلقیح مصنوعی بسیار کارآمد خواهد بود (O'Hara *et al*., 2010). مطالعات مختلف نشان داده است که سرد کردن و انجماد اسپرم، منجر به افزایش تنش اکسیداتیو و تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال می شود و این روند در نهایت منجر به پراکسیداسیون لیپیدی غشاء و آسیب اسپرم می‌شود (Kim *et al*., 2010). به‌طورکلی قرار گرفتن اسپرم در محیط آزمایشگاهی منجر به پراکسیداسیون لیپیدی شده و درنهایت جنبایی و یکپارچگی DNA را کاهش می‌دهد (Bilodeau *et al*., 2001).

بطور معمول، مایع منی حاوی آنتی‌اکسیدهای آنزیمی و غیرآنزیمی جهت مقابله با گونه‌های اکسیژن فعال است (Griveau *et al*., 1995). منشا سیستم محافظتی آنتی اکسیدانی از سیتوپلاسم سلول است، اما بیشتر حجم سیتوپلاسم اسپرم طی مراحل پایانی تمایز از دست می‌رود، در نتیجه اسپرم میزان کمی از ترکیبات سیتوپلاسمی را به همراه دارد (Oeda *et al*., 1997)، بنابراین در طول نگهداری اسپرم، مقادیر کافی از آنتی اکسیدان‌ها جهت جلوگیری از آسیب رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم وجود ندارد (Shakouri *et al*., 2021). انجامد اسپرم با مشکلاتی از جمله کاهش زنده مانی و جنبایی اسپرم بعد از فرایند انجامد–یخ گشایی مواجه است. زنده مانی و جنبایی اسپرم پس از انجامد–یخ‌گشایی متاثر از عوامل متعددی از قبیل کیفیت منی، نوع و غلظت اجزای موجود در رقیق کننده می‌باشد (Rodriguez-Martinez, 2012). استفاده از آنتی-اکسیدانی که در محیط رقیق کننده منی بتواند از اسپرم در برابر آسیب‌های انجامد–یخ‌گشایی محافظت کند بسیار حائز اهمیت است. نتایج تحقیقات نشان می دهد که افزودن آنتی اکسیدان های مختلف به رقیق کننده مایع منی سگ در طول نگهداری می تواند سبب بهبود قدرت زنده‌مانی و جنبایی اسپرم بعد از فرایند نگهداری شود، که بسته به نوع و غلظت آنتی اکسیدان ها می تواند متفاوت باشد (Michael et al., 2009).

کروسین ، یک کاروتنوئید محلول در آب[1]موجود در زعفران است که به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان با پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و محافظت از سلول‌ها و بافت‌ها در برابر پراکسیداسیون عمل می‌کند (Rahaiee *et al*., 2015). در مطالعه‌ای مشخص‌شده است که کروسین به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی خود قادر است که سلول‌های عضلانی قلب موش‌های صحرایی را در برابر آسیب هیپوکسی محافظت کند (Zhang *et al*., 2009). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، Naghizadeh *et al*., (2010) نشان داده‌اند که کروسین، تنش اکسیداتیو کلیه حاصل از سیس‌پلاتین (داروی ضد سرطان مورداستفاده در تومورهای بیضه و تخمدان و ریه) را در موش ها کاهش می دهد. گزارش‌شده است که افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند باعث بهبود قدرت زنده‌مانی اسپرم سگ طی نگهداری در یخچال شود (Sheikholeslami *et al*., 2020). همچنین در مطالعات متعددی اثرات مفید زعفران و اجزای آن ازجمله کروسین را بر قدرت جنبایی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء در اسپرم انسان، موش صحرایی، خروس و خرگوش گزارش کرده‌اند (Caballero-Ortega *et al*., 2002; Mardani *et al*.,2014; Mehdipour *et al*.,2020; Tsantarliotou *et al*.,2013). بررسی دیگری نشان داده است که افزودن کروسین سبب بهبود قدرت جنبایی اسپرم در گاو می‌شود (Sapanidou *et al*.,2015). در مطالعه‌ای Longobardi *et al*., (2020) بر روی منی بز، نشان دادند که افزودن کروسین اثرات مثبتی بر جنبایی اسپرم بز دارد. طی بررسی دیگری بر روی اسپرم موش صحرایی افزودن کروسین بیشترین افزایش را در جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده داشت (Mehdipour *et al*., 2020). Dominguez *et al*., (2010) نیز گزارش کردند که افزودن کروسین به رقیق‌کننده اسپرم گوزن قرمز باعث افزایش جنبایی در اسپرم می‌شود.

1Crocin

در مطالعه‌ای، Mehdipour *et al*., (2020) گزارش کردند که افزودن کروسین باعث بهبود زنده‌مانی اسپرم خروس می‌گردد. همچنین در بررسی دیگری مشخص‌شده است که استفاده از کروسین سبب کاهش سطح رادیکال‌های آزاد و درنهایت افزایش قدرت زنده‌مانی اسپرم می‌شود (Sapanidou *et al*., 2015). بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی تأثیرات کروسین بر روی منی سگ در طول نگهداری در دمای یخچال است.

مواد و روش ها

جمع‌آوری مایع منی و آماده‌سازی نمونه‌ها: در این مطالعه از ۵ قلاده سگ نر نژاد تریر سن۷-۳ ساله برای جمع‌آوری مایع منی مورداستفاده قرار گرفت. نحوه اخذ منی در این مطالعه به‌صورت دستی بود (Linde-Forsberg, 2001). نمونه‌های بالای ۶۰۰×۱۰^{۶} اسپرم در میلی‌لیتر و دارای جنبایی کل بالای ۶۵ درصد برای انجام آزمایش مورداستفاده قرار گرفت. نمونه‌گیری به مدت ۶ هفته (در هر هفته، دومرتبه) انجام پذیرفت و برای از بین بردن تنوع دام‌ها بین نمونه‌ها، هر بار تمامی مایع منی انزالی سگ‌ها با یکدیگر ادغام گشتند. به‌منظور حذف پلاسما، نمونه ها با دور ۷۰۰ *g* به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ و پلاسمای منی دور ریخته شدند (Linde-Forsberg, 2001).

گروه‌بندی نمونه‌ها: در این مطالعه از رقیق‌کننده بر پایه تریس (۲/۴ گرم تریس هیدروکسی‌متیل، ۱/۴ گرم اسیدسیتریک، ۰/۸ گرم گلوکز، ۱۰۰۰۰۰ IU بنزیل پنی‌سیلین، ۰/۱گرم استرپتومایسین سولفات، ۲۰ میل‌لیتر زرده تخم‌مرغ، ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر) استفاده گردید. سپس نمونه‌ها به‌طور مساوی به پنج گروه مساوی تقسیم گردیدند که شامل گروه شاهد (بدون افزودنی)، غلظت‌های مختلف کروسین (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار کروسین) و گروه شاهد حلال (حلال کروسین؛ دی‌متیل‌سولفوکساید ۵ درصد) بودند. غلظت نهایی[۱] در گروه‌ها بعد از افزدون کروسین و رقیق کننده، ۱۳۴×۱۰^{۶} اسپرم در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری و اضافه کردن رقیق‌کننده‌ها در یخچال نگهداری و در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت موردبررسی قرار گرفتند.

بررسی جنبایی اسپرم : جهت بررسی جنبایی و شاخص‌های جنبایی، از سیستم رایانه‌ای آنالیز اسپرم یا کاسا استفاده شد (Test Sperm 3.2; Videotest, St. Petersburg, Russia). تنظیمات کاسا مورداستفاده در مطالعه حاضر در جدول ۱ ارائه‌شده است. در این بررسی ۵ میکرولیتر از هر گروه بر روی لام قرارگرفته بر روی صفحه گرم میکروسکوپ نوری (Olympus, BX41, Tokyo, Japan) ریخته و در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از نگهداری در دمای یخچال، جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده و شاخصه‌های حرکتی اسپرم شامل: شاخص سرعت واقعی اسپرم در مسیر پیموده شده (VCL[۳])، سرعت اسپرم در خط مستقیم (VSL[۴])، بسامد (فرکانس) حرکت های جانبی (BCF[۵])، معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم (STR[۶]) و میانگین سرعت در مسیر مستقیم (VAP[۷]) مورد ارزیابی (Akbari Kalesar *et al*., 2017) قرار گرفتند (تعداد ۵۰۰ اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت).

بررسی قابلیت زنده‌مانی اسپرم: جهت بررسی میزان قابلیت زنده‌مانی اسپرم‌ها، رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین مورداستفاده قرار گرفت. در این روش رنگ‌آمیزی مبنای تشخیص اسپرم‌های زنده از اسپرم‌های مرده آسیب به غشای پلاسمایی

---

۱ DMSO
۲ Computer-assisted sperm analysis
۳ Curvilinear Velocity
۴ Straight – line Velocity
۵ Beat Cross Frequency
۶ Sperm Track Straightness
۷ Average Path Velocity

است به‌طوری‌که غشای اسپرم‌های مرده در برابر رنگ مذکور نفوذپذیر می‌گردند. بنابراین آن دسته از اسپرم‌هایی که رنگ گرفته بودند به‌عنوان اسپرم‌های مرده در نظر گرفته شدند. در این مطالعه از هر نمونه، تعداد ۲۰۰ اسپرم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل در قالب درصد بیان شدند (Wyrobek *et al*., 1983).

جدول ۱. تنظیمات فراسنجه‌های نرم‌افزار کاسا

شاخص	تنظیمات
تعداد فریم	۵۰ f/s
مدت زمان عکس گرفتن	۱ ثانیه
سطح دما	۳۷ °C
حداقل اندازه سلول	۲۵ μm^2
حداکثر اندازه سلول	۷۰ μm^2
نوع چمبر	اسلاید ۲۲ در ۲۲
حجم در هر اسلاید	۷ µl
عمق چمبر	حدود ۲۰ µm
حداقل تعداد تحلیل در میدان	۷
حداقل تعداد تحلیل در میدان	۴۰۰ سلول
مقدار آستانه	۹۲
غلظت سلول برای کاسا	۱۰ m/mL
نوع تصویر	فازکنتراست

روش ارزیابی آماری: داده‌ها با اســتفاده نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ با در نظر گرفتن زمان‌های ارزیابی، با رویه داده‌های تکرارشونده در زمان (Repeated measurement) و با آزمون تعقیبی Tukey-Kramer test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مدل آماری استفاده‌شده در این مطالعه $Y_{ij} = \mu + T_i + \mathbf{t_j} + e_{ij}$ بود (Ghadimi *et al*., 2014; Najm-Abadi *et al*., 2022) که، Y_{ij}: مقدار فراسنجه اندازه‌گیری شده، µ: میانگین جامعه، T_i: اثر تیمار i ، $\mathbf{t_j}$ اثر زمان ذخیره سازی و e_{ij}: خطای آزمایش بود. سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ بود.

نتایج

جنبایی کل اسپرم: نتایج به‌دست‌آمده از بررسی جنبایی کل اسپرم‌ها مشخص کرد که در ساعت صفر آزمایش هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های درمانی وجود نداشت (جدول ۲). نتایج بررسی در ساعت ۲۴ آزمایش، نشان داد که بیشترین جنبایی کل اسپرم در بین گروه‌های درمانی مربوط به گروه‌های حاوی ۱/۵ و ۱ میلی‌مولار کروسین ($p <۰/۰۵$) بود (جدول ۲). بررسی نتایج در ساعت ۴۸ آزمایش نشان داد که گروه حاوی ۱/۵ میلی‌مولار کروسین دارای بیشترین جنبایی کل ($p <۰/۰۵$) بود (جدول ۲).

جنبایی پیش‌رونده: نتایج حاصل از بررسی جنبایی پیش‌رونده نشان داد که با افزایش زمان نگهداری اسپرم در دمای یخچال، جنبایی پیش‌رونده به‌طور معنی‌داری ($p <۰/۰۵$) کاهش یافت (جدول ۲). در ساعت ۲۴ پس از آزمایش نشان داده شد که جنبایی پیش‌رونده گروه‌های حاوی ۱/۵ و ۱ و ۰/۵ میلی‌مولار کروسین به‌طور معنی‌داری ($p <۰/۰۵$) بیشتر از سایر گروه‌های درمانی بود (جدول ۲). در ساعت ۴۸ پس از آزمایش نشان داده شد که گروه حاوی ۱/۵ میلی‌مولار کروسین به‌طور معنی‌داری ($p <۰/۰۵$) دارای درصد جنبایی پیش‌رونده بالاتری نسبت به سایر گروه‌های درمانی بودند (جدول ۲).

جدول۲: اثر افزودن غلظت‌های مختلف کروسین در رقیق‌کننده منی بر جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم سگ طی نگهداری در دمای سرد

پارامتر	زمان نگهداری (hr)	کنترل	کنترل حلال	کروسین mM۰/۵	کروسین mM۱	کروسین mM۱/۵	*p* value
TM (%)	۰	۱/۸۴aA ۷۶/۱۲ ±	۲/۱۲aA ۷۵/۰۷ ±	۱/۸۵ aA ۷۷/۴۷ ±	aA ۷۶/۳۷±۲/۶۶	۱/۸۴aA ۷۷/۹۳ ±	*p*>0.05
	۲۴	۱/۲۸bC ۶۱/۳۸ ±	۱/۸۳bC ۶۰/۷۶ ±	۲/۱۵ bB ۶۸/۱۴ ±	۲/۰۷aA ± ۷۳/۴۵	۲/۴۹ aA ۷۵/۳۶ ±	*p*<0.05
	۴۸	۱/۵۲cD ۴۸/۸۶ ±	۱/۳۶cD ۴۹/۱۸ ±	۲/۹۰ cC ۵۶/۶۳ ±	۱/۱۵bB ± ۶۱/۳۴	۱/۱۹ bA ۶۵/۴۸ ±	*p*<0.01
p value		*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	
PM (%)	۰	۱/۱۹aA ۴۱/۸۹ ±	۱/۵۷aA ۴۲/۳۳ ±	۱/۲۸ aA ۴۲/۳۷ ±	۱/۳۷ aA ۷۲/۶۳ ±	۱/۳۶ aA ۴۲/۴۹ ±	*p*>0.05
	۲۴	۱/۱۳bB ۳۴/۶۷ ±	۱/۴۶bB ۳۳/۰۵ ±	۱/۱۶ bA ۳۷/۲۴ ±	۱/۲۱ aA ۳۹/۴۷ ±	۱/۱۵ abA ۴۰/۷۵ ±	*p*<0.05
	۴۸	۱/۰۸cC ۲۵/۳۳ ±	۱/۲۴cC ۲۳/۵۸ ±	۱/۹۳ bB ۳۴/۶۷ ±	۱/۷۷ bAB ۳۶/۵۴ ±	۱/۱۰ bA ۳۸/۸۹ ±	*p*<0.01
p value		*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	

- TM: جنبایی کل؛ PM: جنبایی پیش‌رونده. حروف مختلف (a-c) در یک ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری درمان در هر دوره ذخیره‌سازی است. حروف مختلف (A-D) در یک ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری درمان در هر دوره ذخیره‌سازی است.

شاخص‌های جنبایی اسپرم

شاخص سرعت واقعی اسپرم در مسیر پیموده شده (VCL): بررسی شاخص VCL نشان داد که در ساعت صفر آزمایش هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های درمانی وجود نداشت. در ساعت ۲۴ پس از آزمایش مشخص شد که گروه حاوی ۱/۵ میلی‌مولار کروسین به‌طور معنی‌داری (*p* <۰/۰۵) دارای بالاترین میزان این شاخص نسبت به سایر گروه‌های درمانی بود (جدول ۳). همچنین، در بررسی شاخص VCL نشان داد که ۴۸ ساعت پس از آزمایش این شاخص در گروه‌های حاوی ۱/۵ و ۱ میلی‌مولار بطور معنی‌داری (*p* <۰/۰۵) بالاتر از سایر گروه‌های آزمایشی می باشد (جدول ۳).

شاخص سرعت اسپرم در خط مستقیم (VSL): بررسی شاخص VSL نشان داد که در ساعت صفر آزمایش هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های درمانی وجود نداشت. بررسی در ساعت ۲۴ و ۴۸ پس از آزمایش گروه حاوی ۱/۵ و ۱ میلی‌مولار کروسین دارای بالاترین (*p* <۰/۰۵) میزان این شاخص نسبت به سایر گروه‌های درمانی بود (جدول ۳). همچنین بررسی شاخص VSL نشان داد که با افزایش زمان نگهداری اسپرم در داخل یخچال این شاخص به‌طور معنی‌داری (*p* <۰/۰۵) کاهش پیدا کرد (جدول ۳).

شاخص میانگین سرعت در مسیر مستقیم (VAP): بررسی شاخص VAP نشان داد که با افزایش زمان نگهداری اسپرم در داخل یخچال این شاخص به‌طور معنی‌داری (*p* <۰/۰۵) کاهش پیدا می‌کند. در این بررسی مشخص شد که در ساعت صفر آزمایش هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های درمانی وجود ندارد. در ساعت ۲۴ و ۴۸ پس از آزمایش نیز

بررسی‌ها نشان داد که گروه‌های حاوی ۱/۵ و ۱ میلی‌مولار کروسین دارای بالاترین (p <۰/۰۵) میزان این شاخص نسبت به گروه شاهد و شاهد حلال می‌باشند (جدول ۳).

شاخص معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم (STR): بررسی درصد شاخص STR نشان داده شد که با افزایش زمان نگهداری اسپرم در داخل یخچال، این شاخص بین گروه‌های درمانی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری ندارد. همچنین در این بررسی مشخص شد که در ساعت صفر، ۲۴ و ۴۸ پس از آزمایش نیز بین گروه‌های درمانی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری نسبت به هم وجود ندارد (جدول ۳).

شاخص بسامد (فرکانس) حرکت های جانبی (BCF): بررسی شاخص BCF نشان داد که در ساعت صفر آزمایش هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های درمانی وجود ندارد. در ساعت ۲۴ پس از آزمایش گروه حاوی ۱/۵ میلی‌مولار کروسین دارای بالاترین (p <۰/۰۵) میزان این شاخص نسبت به سایر گروه‌های درمانی بود. بررسی در ساعت ۴۸ پس از آزمایش بین گروه‌های ۱/۵، ۱ و ۰/۵ میلی‌مولار کروسین هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری نسبت به هم نداشتند و این گروه‌ها نسبت به سایر گروه‌های درمانی دارای بالاترین (p <۰/۰۵) میزان این شاخص بودند (جدول ۳).

جدول۳. میانگین (± خطای استاندارد) تغییرات شاخص‌های جنبایی اسپرم سگ به مدت ۴۸ ساعت پس از افزودن غلظت‌های مختلف کروسین در رقیق‌کننده منی

پارامتر	زمان نگهداری (hr)	کنترل	کنترل حلال	کروسین ۰/۵ mM	کروسین ۱ mM	کروسین ۱/۵ mM	p value
VCL (µm/S)	۰	± ۳/۹۹ aA ۹۸/۸۵	± ۳/۳۳ aA ۹۷/۰۸	± ۳/۱۸ aA ۹۷/۱۱	± ۳/۸۰ aA ۹۶/۲۸	± ۳/۲۳ aA ۹۸/۰۵	p>0.05
	۲۴	± ۳/۵۴ bC ۸۲/۴۹	± ۲/۶۸ bC ۸۱/۷۶	± ۳/۳۱ bC ۸۳/۲۴	± ۲/۱۸ bB ۸۹/۵۶	± ۳/۷۶ aA ۹۴/۷۵	p<0.05
	۴۸	± ۱/۴۶ bC ۶۹/۰۴	± ۱/۲۲ cC ۷۱/۳۴	± ۲/۴۷ cB ۷۵/۵۶	± ۲/۵۹ cA ۸۰/۹۲	± ۲/۳۴ aA ۸۳/۱۸	p<0.01
p value		p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.05	
VSL (µm/S)	۰	± ۲/۴۳ aA ۷۳/۳۶	± ۱/۵۹ aA ۷۴/۳۴	± ۱/۴۰ aA ۷۴/۸۱	± ۱/۴۲ aA ۷۴/۱۰	± ۲/۲۵ aA ۷۳/۸۲	p>0.05
	۲۴	± ۱/۸۹ bC ۶۱/۲۳	± ۱/۸۱ bC ۶۰/۷۴	± ۱/۰۵ bBC ۶۳/۲۰	± ۱/۵۱ bAB ۶۶/۷۹	± ۱/۸۷ aA ۶۸/۰۵	p<0.05
	۴۸	± ۱/۴۲ cE ۵۲/۸۰	± ۱/۳۲ cE ۵۰/۲۷	± ۱/۷۸ cD ۵۵/۱۲	± ۱/۰۴ cB ۵۹/۴۵	± ۱/۶۳ aA ۶۴/۹۰	p<0.01
p value		p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.05	
VAP (µm/S)	۰	± ۳/۲۱ aA ۸۱/۳۴	± ۲/۵۶ aA ۸۰/۷۳	± ۲/۲۹ aA ۷۹/۴۵	± ۳/۷۲ aA ۸۰/۴۸	± ۳/۰۱ aA ۸۰/۵۴	p>0.05
	۲۴	± ۲/۶۱ bB ۷۲/۹۰	± ۲/۱۲ bB ۷۲/۸۴	± ۲/۱۲ bAB ۷۵/۵۶	± ۲/۵۷ bA ۷۷/۷۱	± ۲/۱۴ aA ۷۸/۲۷	p<0.05
	۴۸	± ۱/۷۱ cB ۵۸/۵۴	± ۱/۶۱ cB ۵۶/۸۸	± ۱/۶۳ cB ۵۹/۰۵	± ۲/۸۹ cA ۶۳/۹۳	± ۱/۲۳ aA ۶۶/۴۳	p<0.05
p value		p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	
STR (%)	۰	± ۱/۳۴ aA ۸۰/۹۳	± ۱/۲۳ aA ۸۱/۷۳	± ۱/۰۳ aA ۸۱/۸۹	± ۱/۱۲ aA ۸۱/۵۸	± ۱/۶۴ aA ۸۲/۶۹	p>0.05

پارامتر	زمان نگهداری (hr)	کنترل	کنترل حلال	کروسین ۰/۵ mM	کروسین ۱ mM	کروسین ۱/۵ mM	*p* value
	۲۴	± ۱/۸۷ aA ۸۰/۶۹	± ۱/۴۷ aA ۸۰/۴۰	± ۱/۹۲ aA ۸۰/۵۲	± ۱/۴۶ aA ۸۱/۳۵	± ۱/۳۰ aA ۸۱/۳۶	*p*>0.05
	۴۸	± ۱/۲۹ aA ۷۹/۴۵	± ۱/۱۹ aA ۸۰/۰۱	± ۱/۰۸ aA ۸۰/۱۴	± ۱/۵۷ aA ۸۰/۴۳	± ۱/۱۵ aA ۸۱/۰۳	*p*>0.05
***p* value**		*p*>0.05	*p*>0.05	*p*>0.05	*p*>0.05	*p*>0.05	
BCF (Hz)	۰	± ۱/۱۷ aA ۲۴/۲۳	± ۱/۸۹ aA ۲۴/۵۹	± ۱/۱۷ aA ۲۵/۴۵	± ۱/۳۱ aA ۲۵/۳۶	± ۱/۹۲ aA ۲۵/۱۱	*p*>0.05
	۲۴	± ۱/۷۶ bAB ۲۱/۳۳	± ۱/۶۷ bB ۲۰/۲۷	± ۱/۴۹ bAB ۲۱/۶۳	± ۱/۶۷ abAB ۲۲/۲۶	± ۱/۷۳ aA ۲۴/۷۹	*p*<0.05
	۴۸	± ۱/۵۸ cB ۱۶/۱۵	± ۱/۲۶ bB ۱۷/۴۵	± ۱/۱۲ bA ۲۰/۸۵	± ۱/۴۳ bA ۲۱/۳۴	± ۱/۶۲ aA ۲۳/۶۷	*p*<0.01
***p* value**		*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.05	*p*<0.05	*p*>0.05	

- VCL: سرعت در مسیر میانگین؛ VSL: سرعت در مسیر مستقیم؛ VAP: سرعت در مسیر منحنی؛ STR: راستی مسیر طی شده؛ BCF: تناوب عرضی زنش. حروف مختلف (a-c) در یک ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری درمان در هر دوره ذخیره‌سازی است. حروف مختلف (A-E) در یک ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری درمان در هر دوره ذخیره‌سازی است.

قابلیت زنده‌مانی: در این مطالعه نشان داده شد که درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها در ساعت صفر آزمایش هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های درمانی وجود ندارد. در ساعت ۲۴ و ۴۸ پس از آزمایش، گروه حاوی ۱/۵ میلی‌مولار کروسین بطور معنی داری (p <۰/۰۵) دارای قدرت زنده مانی بیشتری نسبت به سایر گروه‌های درمانی بود (جدول ۴). همچنین در این مطالعه نشان داده شد با افزایش زمان نگهداری اسپرم در داخل یخچال درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها به‌طور معنی‌داری (p <۰/۰۵) در تمامی گروه‌های تیماری کاهش پیدا می‌کند (جدول ۴).

جدول۴: درصد قابلیت زنده‌مانی اسپرم در مایع منی سگ سرد شده پس از افزودن غلظت‌های مختلف کروسین در رقیق‌کننده مایع منی

پارامتر	زمان نگهداری (hr)	کنترل	کنترل حلال	کروسین ۰/۵ mM	کروسین ۱ mM	کروسین ۱/۵ mM	*p* value
قدرت زنده مانی (%)	۰	± ۲/۲۱ aA ۸۳/۴۶	± ۳/۳۸ aA ۸۲/۱۳	± ۲/۳۴ aA ۸۲/۷۵	± ۲/۷۰ aA ۸۳/۷۳	± ۲/۴۲ aA ۸۳/۲۱	*p*>0.05
	۲۴	± ۱/۵۸ bD ۶۸/۳۴	± ۱/۱۱ bD ۶۶/۸۵	± ۱/۴۶ bC ۷۰/۲۷	± ۱/۶۳ bB ۷۴/۰۴	± ۱/۸۵ bA ۷۹/۶۹	*p*<0.05
	۴۸	± ۱/۹۶ cD ۳۷/۹۷	± ۱/۵۹ cD ۳۶/۰۳	± ۱/۵۶ cC ۴۰/۶۵	± ۱/۲۵ cB ۴۶/۱۱	± ۱/۳۶ cA ۵۱/۳۶	*p*<0.01
***p* value**		*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	

– حروف مختلف (**a-c**) در یک ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری درمان در هر دوره ذخیره‌سازی است. حروف مختلف (**A-D**) در یک ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری ذخیره‌سازی در هر تیمار است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، اثرات افزودن کروسین در رقیق‌کننده اسپرم سگ طی نگهداری در دمای یخچال موردمطالعه قرار گرفت. نتایج حاضر نشان داد که نمونه‌های اسپرم حاوی کروسین به‌طور قابل‌توجهی فراسنجه‌های کیفی اسپرم سگ را بعد از نگهداری در یخچال بهبود می‌بخشد، بنابراین می‌تواند به‌طور بالقوه باروری را نیز به‌احتمال‌زیاد، افزایش دهد. فرآیند انجماد–ذوب کردن

و نگهداری اسپرم در یخچال منجر به اختلالات متعددی از جمله کاهش جنبایی و قدرت زنده مانی اسپرم (Boitrelle *et al*., 2012) و افزایش میزان رادیکال‌های آزاد می‌شود (Martínez & Pardo, 2013). نتایج مطالعه ای نشان داد که کیفیت و پیوستگی غشاء پلاسمایی اسپرم، با میزان باروری ارتباط مثبتی دارد (Ahmed *et al*., 2016).

ارزیابی جنبایی اسپرم اطلاعات مفیدی را جهت موفقیت در لقاح فراهم می کند، زیرا صلاحیت ساختاری و عملکردی اسپرم را نشان می‌دهد (Linde-Forsberg *et al*., 1991). یکی از معیارهای مهم در ارزیابی کیفیت مایع منی میزان جنبایی اسپرم است، که باید در یک نمونه طبیعی اسپرم سگ حدود ۷۰ درصد باشد (Saito *et al*., 1996). گرچه باید توجه داشت که جنبایی و باروری دو فراسنجه مجزا هستند و جنبایی به معنای بارور بودن نیست ولی همچنان جنبایی یکی از ضروری‌ترین ویژگی‌های یک اسپرم بارور است (Martínez, 2004). در این مطالعه نشان داده شد که با افزایش زمان نگهداری اسپرم در یخچال جنبایی کل و پیشرونده اسپرم کاهش پیدا می‌کند. کاهش جنبایی اسپرم پس از سرد شدن و دوباره گرم شدن می‌تواند به علت حساسیت دمایی پمپ پتاسیم–سدیم و پس از آن نشت یون‌ها باشد (Saito *et al*., 1996)، که این موضوع به علت افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی در لایه پلاسما سلولی است، که در نهایت منجر به افزایش نفوذپذیری سلول و کاهش جنبایی و قدرت زنده مانی اسپرم می شود (Bilodeau *et al*., 2000). بنابراین، کاهش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن ممکن است باعث بهبود جنبایی و قدرت زنده مانی اسپرم شود (Asadmobini *et al*., 2017). در نتیجه استفاده از آنتی اکسیدان‌ها در رقیق کننده‌ها می‌تواند مانع از افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی شود (Cassani *et al*., 2005).

جنبایی اسپرم، که یک معیار مهم در ارزیابی کیفیت مایع منی سگ محسوب می‌شود، به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای تحت تاثیر مواد افزودنی به رقیق‌کننده در طی ذخیره‌سازی است (Linde-Forsberg *et al*., 1991). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که افزودن کروسین به مایع منی سگ در طول نگهداری در دمای یخچال باعث بهبود جنبایی کل، پیش‌رونده و شاخص‌های جنبایی نسبت به گروه کنترل می‌گردد. نتایج مطالعه حاضر در راستای نتایج مطالعات گذشته مبنی بر بهبود کیفیت اسپرم نگهداری شده در دمای پایین متعاقب افزودن آنتی اکسیدان‌ها به رقیق کننده ها می باشد(Asadmobini *et al*., 2017; Khaleghi *et al*., 2017; Pour *et al*., 2015). همچنین در مطالعه ای دیگر نشان داده شد که افزودن ویتامین C به رقیق‌کننده اسپرم باعث افزایش جنبایی اسپرم منی سگ می شود (Wittayarat *et al*., 2012). در بررسی که توسط Verstegen *et al*., (2002) انجام گرفته است مشخص کرده‌اند که شاخص‌های جنبایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. گزارش İnanç *et al*., (2018) بر روی شاخص‌های جنبایی اسپرم نشان داد که بین سرعت انحنای خطی، سرعت خط مستقیم، دامنه‌ی جابجایی و فرکانس ضربان متقاطع با نرخ لقاح پس از تلقیح مصنوعی همبستگی مثبت وجود دارد. همچنین در مطالعات مختلفی نشان داده‌شده است که افزودن کروسین و یا زعفران می‌تواند باعث بهبود قدرت جنبایی اسپرم شود (Caballero-Ortega *et al*., 2002; Tsantarliotou *et al*.,2013; Mehdipour *et al*., 2020; Mardani *et al*., 2014). در بررسی دیگری نشان داده‌شده است که افزودن ۱ میلی‌مولار کروسین سبب بهبود قدرت جنبایی اسپرم‌ها در گاو می‌شود (Sapanidou *et al*.,2015). در مطالعه‌ای بر روی منی بز Longobardi *et al*., (2020)، نشان دادند که افزودن کروسین اثرات مثبتی بر جنبایی اسپرم بز دارد. طی بررسی دیگری بر روی اسپرم موش صحرایی مشخص شد که افزودن ۱ میلی‌مولار کروسین بیشترین افزایش را در جنبایی کل و پیش‌رونده دارد ولی تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف در سرعت خط مستقیم و سرعت منحنی و میانگین سرعت مسیر وجود نداشت (Mehdipour et al.,2020). همچنین Dominguez *et al*., (2010) گزارش کردند که افزودن ۱ میلی‌مولار کروسین به رقیق‌کننده اسپرم باعث افزایش جنبایی در اسپرم گوزن قرمز شد.

در مطالعه حاضر نشان داده شد است که قدرت زنده مانی اسپرم در هنگام نگهداری اسپرم در طول نگهداری در یخچال کاهش می یابد. توانایی اسپرم در حفظ تمامیت غشاء، برای زنده ماندن حیاتی است. این نکته، از اهمیت ویژه ای در هنگام نگهداری در یخچال برخوردار است، زیرا تنش های مرتبط با خنک سازی منجر به نوسانات غلظت یون و تغییرات Na^+/K^+

ATPase و در نهایت باعث کاهش قدرت زنده مانی اسپرم می شود (Watson, 2000). مطالعه حاضر نیز نشان داد که افزودن کروسین به منی سگ باعث افزایش قدرت زنده‌مانی اسپرم می‌شود. در راستای مطالعه حاضر، در مطالعه ای نشان داده شده است که افزودن کروسین می تواند باعث بهبود قدرت زنده‌مانی اسپرم خروس گردد (Mehdipour et al.,2020). همچنین Sapanidou *et al*. (2015) در مطالعه‌ای نشان دادند که استفاده از کروسین سبب کاهش سطح رادیکال‌های آزاد و درنهایت افزایش قدرت زنده‌مانی اسپرم گاو می‌شود (Sapanidou *et al*., 2015). در بررسی‌هایی دیگر تأثیر مثبت زعفران و اجزای آن، بر قدرت زنده‌مانی اسپرم در گونه‌های مختلف گزارش‌شده است (Caballero-Ortega *et al*., 2002; Mardani *et al*., 2014; Mehdipour *et al*., 2020; Tsantarliotou *et al*., 2013). در مطالعه دیگری نشان دادند که افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند باعث بهبود قدرت زنده‌مانی اسپرم سگ طی نگهداری در یخچال شود (Sheikholeslami *et al*., 2020).

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه، اثرات مثبت وابسته به دوز کروسین بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم سگ در طول نگهداری در یخچال نشان داده شد. با توجه به اثرات مثبت کروسین، در مطالعه حاضر استفاده از کروسین را در رقیق‌کننده منی سگ را تأیید می‌کند. بااین‌حال، تحقیقات بیشتری در جهت میزان باروری با اسپرم‌های حاوی کروسین برای تأیید اثرات محافظتی آن موردنیاز است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که با تصویب و حمایت مالی از پایان‌نامه به شماره ۵۸۸۹ امکان انجام مطالعه را فراهم آوردند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

Akbari Kalesar, A., Seifi-Jamadi, A., Yadi, J., & Kohram, H. (2017). Effect of Butylated Hydroxy Anisole (BHA) and Butylated Hydroxy Toluene (BHT) on semen quality of Ram semen after freeze thawing Process. *Iranian Journal of animal Science*, 48(2), 287-295.

Ahmed, H., Andrabi, S. M. H., & Jahan, S. (2016). Semen quality parameters as fertility predictors of water buffalo bull spermatozoa during low-breeding season. *Theriogenology*, 86(6), 1516-1522.

Asadmobini, A., Bakhtiari, M., Khaleghi, S., Esmaeili, F., & Mostafaei, A. (2017). The effect of Tribulus terrestris extract on motility and viability of human sperms after cryopreservation. *Cryobiology*, 75, 154–159.

Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C., & Sirard, M. A. (2001). Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2), 275-286.

Boitrelle, F., Albert, M., Theillac, C., Ferfouri, F., Bergere, M., Vialard, F., Wainer, R., Bailly, M., & Selva, J. (2012). Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. *Journal of Andrology*, 33(6), 1371–1378.

Caballero-Ortega, H., Riverón-Negrete, L., Pereda-Miranda, R., Rivera-Luna, R., Hernández, M., Pérez-López, I., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2002). In vitro evaluation of the chemopreventive potential of saffron. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 54(5), 430-436.

Cassani, P., Beconi, M. T., & O'Flaherty, C. (2005). Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. *Animal Reproduction Science*, 86(1–2), 163–173.

Flesch, F. M., & Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in

the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1469(3), 197-235.

Ghadimi, V., Zhandi, M., Towhidi, A., Shehab-El, M. A. M. M., & Nouri, H. (2014). Positive effect of manganese (III) meso-tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin on stallion spermatozoa during storage in cool condition. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(11-12), 1329-1332.

Griveau, J. F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J. P., & Le Lannou, D. (1995). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Reproduction*, 103(1), 17-26.

Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 3-22.

İnanç, M. E., Cil, B., Tekin, K., Alemdar, H., & Daşkin, A. (2018). The combination of CASA kinetic parameters and fluorescein staining as a fertility tool in cryopreserved bull semen. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 42(5), 452-458.

Khaleghi, S., Bakhtiari, M., Asadmobini, A., & Esmaeili, F. (2017). Tribulus terrestris extract improves human sperm parameters in vitro. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(3), 407–412.

Kim, S. H., Yu, D. H., & Kim, Y. J. (2010). Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Animal Reproduction Science*, 119(1-2), 106-114.

Linde-Forsberg, C. (2001). *Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. In Recent advances in small animal reproduction* (Vol. 1209). International Veterinary Information Service (www. ivis. org), Document.

Linde-Forsberg, C. (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21(3), 467-485.

Longobardi, V., Zullo, G., Cotticelli, A., Salzano, A., Albero, G., Navas, L., ... & Neglia, G. (2020). Crocin improves the quality of cryopreserved goat semen in different breeds. *Animals*, 10(6), 1101.

Mardani, M., Vaez, A., & Razavi, S. (2014). Effect of saffron on rat sperm chromatin integrity. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 12(5), 343.

Martínez, A. P. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, 82, 209-224.

Martínez, J. G., & Pardo C, S. (2013). Effect of freezing and thawing rates on sperm motility in Bocachico Prochilodus magdalenae (Pisces, Characiformes). *Revista MVZ Córdoba*, 18(1), 3295–3303.

Mehdipour, M., Daghigh Kia, H., Najafi, A., Mohammadi, H., & Álvarez-Rodriguez, M. (2020). Effect of crocin and naringenin supplementation in cryopreservation medium on post-thaw rooster sperm quality and expression of apoptosis associated genes. *Plos one*, 15(10), e0241105.

Michael, A. J., Alexopoulos, C., Pontiki, E. A., Hadjipavlou-Litina, D. J., Saratsis, P., Ververidis, H. N., & Boscos, C. M. (2009). Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Animal reproduction science*, 112(1-2), 119-135.

Mokhber Maleki, E., Eimani, H., & Bigdeli, M. R. (2016). Golkar Narenji, A.; Abedi, R. Effects of crocin supplementation during in vitro maturation of mouse oocytes on glutathione synthesis and cytoplasmic maturation. *International Journal of Fertility and Sterility*, 10, 53-61.

Naghizadeh, B., Mansouri, S. M. T., & Mashhadian, N. V. (2010). Crocin attenuates cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2650-2655.

Najm-Abadi, Z., Deldar, H., Ansari Pirsaraei, Z., & Dirandeh, E. (2022). Effect of vanillic acid in comparison with vitamin E+ C on short-and long-term preservation of ram semen. *Iranian Journal of Animal Science*, *53*(1), 23-32.

Ochiai, T., Ohno, S., Soeda, S., Tanaka, H., Shoyama, Y., & Shimeno, H. (2004). Crocin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those

of α-tocopherol. *Neuroscience Letters*, 362(1), 61-64.

Oeda, T., Henkel, R., Ohmori, H., & Schill, W. B. (1997). Scavenging effect of N-acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible therapeutic modality for male factor infertility. *Andrologia*, 29(3), 125-131.

O'Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A. C. O., & Lonergan, P. (2010). Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, 73(4), 541-549.

Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16(2), 359-364.

Perez-Llano, B., Lorenzo, J. L., Yenes, P., Trejo, A., & Garcia-Casado, P. (2001). A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, 56(3), 387-398.

Rahaiee, S., Moini, S., Hashemi, M., & Shojaosadati, S. A. (2015). Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (Crocus sativus L.): a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1881-1888.

Retterstol, K., Haugen, T. B., Tran, T. N., & Christophersen, B. O. (2001). Studies on the metabolism of essential fatty acids in isolated human testicular cells. *Reproduction*, 121(6), 881-887.

Rodriguez-Martinez, H. (2012). Cryopreservation of porcine gametes, embryos and genital tissues: state of the art. Current Frontiers in Cryobiology, *InTech*, 231-260.

Sapanidou, V., Taitzoglou, I., Tsakmakidis, I., Kourtzelis, I., Fletouris, D., Theodoridis, A., ... & Tsantarliotou, M. (2015). Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. *Theriogenology*, 84(8), 1273-1282.

Saito, K., Kinoshita, Y., Kanno, H., & Iwasaki, A. (1996). The role of potassium ion and extracellular alkalization in reinitiation of human spermatozoa preserved in electrolyte-free solution at 4 C. *Fertility and Sterility*, 65(6), 1214-1218.

Shakouri, N., Soleimanzadeh, A., Rakhshanpour, A., & Bucak, M. N. (2021). Antioxidant effects of supplementation of 3, 4-dihydroxyphenyl glycol on sperm parameters and oxidative markers following cryopreservation in canine semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(7), 1004-1014.

Sheikholeslami, S. A., Soleimanzadeh, A., Rakhshanpour, A., & Shirani, D. (2020). The evaluation of lycopene and cysteamine supplementation effects on sperm and oxidative stress parameters during chilled storage of canine semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(9), 1229-1239.

Tsantarliotou, M. P., Poutahidis, T., Markala, D., Kazakos, G., Sapanidou, V., Lavrentiadou, S., ... & Sinakos, Z. (2013). Crocetin administration ameliorates endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rabbits. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 24(3), 305-310.

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149-179.

Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, *60*, 481-492.

Wittayarat, M., Kimura, T., Kodama, R., Namula, Z., Chatdarong, K., Techakumphu, M. & Otoi, T. (2012). Long-term preservation of chilled canine semen using vitamin C in combination with green tea polyphenol. *CryoLetters*, 33(4), 318-326.

Wyrobek, A. J., Gordon, L. A., Burkhart, J. G., Francis, M. W., Kapp Jr, R. W., Letz, G., ... & Whorton, M. D. (1983). An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 115(1), 1-72.

Zhang, R., Zhi-Yu, Q., Xiao-Yuan, H., Zhen, C., Jun-Ling, Y., & Hamid, A. (2009). Comparison of the effects of crocetin and crocin on myocardial injury in rats. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 7(3), 223-227.