Animal Production Research

Vol. 13, No. 3, 2024 (47-60)
doi: 10.22124/ar.2024.27413.1829
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Increasing the freezeability of bovine sperm by adding skimmed cow's milk and seminal plasma to the composition of a Tris-based cryoprotective medium

F. Samadian[1*], M. Memar[1], F. Farrokhi Ardabili[2]

1. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: 19-05-2024 – Revised: 07-09-2024 – Accepted: 15-09-2024)

Introduction: The decrease in the sperm number in each dose of artificial insemination (AI) has led to the deterioration of sperm quality in different species. Decreasing sperm quality could be a major obstacle to the commercial application of flow-sorted sperm for gender selection. The reduction in the viability of cryopreserved spermatozoa at high dilution rates (low number of sperm/dose) has been attributed to the lack of useful components of the seminal plasma in the final freezing medium. Although the effect of adding or removing seminal plasma or its proteins on sperm activity has been widely investigated, the results of these studies are contradictory. Factors such as the final dilution rate and the extenders used in each work may influence the results. On the other hand, a milk-based extender was reported to be better than a Tris-citrate-fructose extender for a percentage of uncapacitated and linear motile spermatozoa after freezing-thawing of ovine semen. However, milk-based diluents interfere with the evaluation of sperm kinematics by the computer-assisted sperm analysis (CASA) systems. It is speculated that by adding milk to the composition of Tris diluents while taking advantage of the positive effects of milk, problems related to sperm evaluation disorders by CASA will not occur. Therefore, this study aimed to investigate the impacts of adding bovine skim milk and seminal plasma into the formulation of a Tris-citrate-egg yolk LDL extender on the kinematics and viability of frozen-thawed bull sperm when sub-optimal sperm numbers were packed in straws.

Materials and methods: Semen samples were collected from four bulls once a week for four consecutive weeks. The ejaculates collected on the same day were pooled provided that the semen concentration and progressive motility in each ejaculate were $\geq 2\times10^9$ cells/mL and >70%, respectively. The semen pool was divided into four equal aliquots and diluted with experimental extenders to obtain a final sperm concentration of 15×10^6 spermatozoa per mL. The base extender [made by Tris buffer (80% v/v), liquid ammonium sulfate-insoluble yolk fraction (20%), and glycerol (7% v/v)] was supplemented with 0, 5, and 10% (v/v) milk, and 0, 2 and 5% bovine seminal plasma. Therefore, the experiment was conducted in a completely randomized design with a factorial arrangement of 3×3. Diluted semen samples were frozen and stored in liquid nitrogen after being cooled and packed in 0.5 mL straws. The percentage of live cells in thawed samples was determined after Eosin-nigrosin staining and motility and kinematic parameters were analyzed by CASA. Data were subjected to analysis of variance using the general linear model of SAS software (version 9.2). Significant differences among treatment means were evaluated using the Tukey test. The statistical significance level was set at 0.05.

Results and discussion: The results indicated that the addition of milk at both 5 and 10% led to an increase in progressive motility, straightness, and sperm velocity parameters (Average path velocity, curvilinear velocity, and straight-line velocity). Adding 5% seminal plasma to the basal extender formulation increased the motility indexes (total and progressive motility), velocity indexes, and directional indices of cryopreserved spermatozoa. Among

[*] Corresponding author: fsamadian@yu.ac.ir

the parameters reflecting sperm wobble characteristics, wobble and amplitude of literal head increased; however, beat cross frequency and mean angular displacement decreased in the freeze-thawed spermatozoa diluted in the extenders containing 5% seminal plasma compared to those in the control straws. The average concentrations of both factors (5% milk and 2% seminal plasma), when present together in the base composition of the diluent, have shown a better result in terms of percentage sperm viability than when present alone.
Conclusions: According to the results, adding 5% seminal plasma to the extender formulation increased the kinematic parameters of frozen-thawed sperms. However, it should be noted that these increases do not seem to be desirable in sperm doses for artificial insemination but could be acceptable for *in vitro* fertilization (IVF). However, the 2% level of seminal plasma reduced the mean angular displacement parameter without affecting the velocity indices, which may indicate an improvement in sperm fertility. The addition of 2% semen plus 5% milk in bull semen diluent has resulted in better sperm viability. In addition, the 5% proportion of milk improved many parameters of sperm motility and kinematics, as did the 10% proportion. Therefore, the addition of 2% bovine seminal plasma plus 5% skimmed cow's milk to a Tris-LDL-citrate extender may positively affect the viability of frozen-thawed bull sperm and kinematic values associated with fertility when semen is diluted in small amounts/doses.
Keywords: Dilution effect, Freezing-thawing, Seminal plasma, Sperm quality, Cow
Ethics statement: This study was conducted with the full consideration of animal welfare and the approval of this study was granted by the Ethics Committee of Yasouj University, Iran.
Data availability statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.
Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.
Funding: The authors received no specific funding for this project.

How to cite this article:

Samadian, F., Memar, M., & Farrokhi Ardabili, F. (2024). Increasing the freezeability of bovine sperm by adding skimmed cow's milk and seminal plasma to the composition of a Tris-based cryoprotective medium. *Animal Production Research*, *13*(3), 47-60. doi: 10.22124/ar.2024.27413.1829

تحقیقات تولیدات دامی

سال سیزدهم/شماره سوم/پاییز ۱۴۰۳ (۶۰-۴۷)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

افزایش انجمادپذیری اسپرم گاو با افزودن شیر پس‌چرخ و پلاسمای منی گاو به ترکیب یک رقیق‌کننده محافظ انجمادی بر پایه تریس

فرهاد صمدیان[1*]، مهرداد معمار[1]، فرهاد فرخی اردبیلی[2]

۱- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۳۰ – تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۶/۱۷ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۵)

چکیده

اثر افزودن شیر پس‌چرخ و پلاسمای منی گاو به ترکیب یک رقیق‌کننده تریس-سیترات-LDL بر ویژگی‌های حرکت‌شناسی و زنده‌مانی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاوهای هلشتاین به‌منظور تخفیف اثر رقت بررسی شد. نمونه منی از چهار گاو نر، هفته‌ای یک‌بار و به‌مدت چهار هفته متوالی جمع‌آوری شد. مخلوط منی به چهار قسمت مساوی تقسیم شد و هر قسمت به‌طور جداگانه با رقیق‌کننده‌های آزمایشی تا رسیدن به غلظت ۱۶ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر رقیق‌سازی شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل ۳×۳ شامل سه سطح شیر (۰، ۵ و ۱۰ درصد) و سه سطح پلاسمای منی (۰، ۲ و ۵ درصد) انجام شد. بنا به نتایج، جنبایی پیش‌رونده، راستی حرکت (STR) و فراسنجه‌های سرعت اسپرم‌ها [سرعت در مسیر میانگین (VAP)، سرعت در مسیر منحنیِ طی‌شونده به‌وسیله اسپرم (VCL) و سرعت در مسیر مستقیم (VSL)] در رقیق‌کننده‌های حاوی شیر (در هر دو سطح ۵ و ۱۰ درصد) در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($P<۰/۰۵$). افزودن پلاسمای منی به ترکیب رقیق‌کننده پایه در سطح ۵ درصد، منجر به افزایش شاخص‌های جنبایی (کل و پیش‌رونده)، سرعت، جهت‌داری [راستی مسیر طی شده (STR)، خطی بودن (LIN)، لرزش (WOB) و آمپلیتود جابجایی جانبی سر اسپرم (ALH)] شد ($P<۰/۰۵$). در هنگام نیاز به کاهش تعداد اسپرم‌ها در هر دوز در کارهای برون‌تنی، گنجاندن شیر در سطوح ۵ یا ۱۰ درصد و یا پلاسمای منی در سطح ۵ درصد در ترکیب رقیق‌کننده منی توصیه می‌شود. انتخاب رقیق‌کننده مناسب برای انجماد اسپرم با تعداد اندک در هر دوز تلقیحی، منوط به انجام آزمون‌های بیشتر است.

واژه‌های کلیدی: اثر رقت، انجماد-یخ‌گشایی، پلاسمای منی، کیفیت اسپرم، گاو

* نویسندهٔ مسئول: fsamadian@yu.ac.ir

doi: 10.22124/ar.2024.27413.1829

مقدمه

تصور بر این است که باروری در گاوهای شیری تلقیح شده طی چند دهه اخیر کاهش یافته باشد. اختلافات در روش‌های کار با اسپرم مورد تلقیح و تعداد اسپرم در دوزهای تلقیحی ممکن است در این کاهش باروری دخیل باشد، به‌طوری که گاهی تفاوت باروری در بین گاوهای مختلف را به ترکیبات پلاسمای منی و میزان رقت صورت گرفته و یا میزان پلاسمای منی موجود در هر پایوت نسبت می‌دهند (Nongbua *et al*., 2018). منی دارای دو جزء اصلی است: اسپرم و پلاسمای منی. پلاسمای منی گاوی از ترشحات حاصل از غدد پیوست جنسی همراه با حجم اندکی از مایع حاصل از بیضه‌ها و اپیدیدیم تشکیل یافته است (Maxwell *et al*., 2007). پلاسمای منی حاوی پروتئین‌ها، مواد معدنی، الکترولیت‌ها، هورمون‌ها و آنزیم‌ها است (Poiani, 2006) و نشان داده شده است که ضمن فعال‌سازی اسپرم‌ها از آنها پشتیبانی می‌نماید (Garner *et al*., 2001). علاوه بر این، پلاسمای منی در ظرفیت‌دار نمودن (جلوگیری از فعال شدن بی‌موقع اسپرم) و همچنین، در باروری اسپرم نقش دارد (Rodríguez and Martinez, 2011). تصور می‌شود که باروری جنس نر معمولاً کارکردی از باروری اسپرم باشد و از مشارکت پلاسمای منی معمولاً چشم‌پوشی می‌شود، در حالی که ترکیب پلاسمای منی گاو و به‌ویژه ترکیب پروتئین‌های آن با توانایی باروری اسپرم مرتبط است (Juyena and Stelleta, 2012). اجزای اصلی پلاسمای منی گاو شامل پروتئین‌های پپتیداز، سیتوکین‌ها، آنزیم‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، هورمون‌ها، یون‌ها، قندها و لیپیدها هستند (Juyena and Stelleta, 2012). در مطالعات مختلف گزارش شده است که در ترکیب پلاسمای منی گاوهای با باروری بالا و پایین، از نظر محتوای پروتئین‌های خاص (Morrell *et al.*, 2015) و بیان ژن‌های آن‌ها (D'Amours *et al*., 2010) تفاوت‌هایی وجود دارد.

نمونه‌های منی تجاری حاصل از گاوهای خالص شجره‌دار، حاوی کمابیش ۰/۸ تا ۱۲ درصد (v/v) پلاسمای منی هستند (Bromfield, 2016). بنابراین، نسبت مایع منی داخل شده در هر دوز تلقیحی بین انزال‌ها متفاوت است که به غلظت اسپرم در انزال اصلی، تعداد در نظر گرفته شده از اسپرم در هر پایوت و گاهی اوقات به باروری گاو نر بستگی دارد (Bromfield, 2016). در مطالعه‌ای، مایع منی گاو در غلظت‌های مختلف به پلت اسپرمی رقیق شده (با غلظت ۶۹ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر) افزوده شد و مشخص شد که افزودن سطح ۵ درصد پلاسمای منی نسبت به سطح ۱ درصد آن، درصد اسپرم‌های جنبا در منی نگهداری شده به‌صورت سرد را بهبود می‌بخشد (Nongbua *et al*., 2018). گزینش سه سطح از پلاسمای منی (سطوح افزودن ۰، ۱ و ۵ درصد) و انجماد اسپرمی به‌وسیله این محققین نشان داد که نسبت به شاهد (سطح صفر درصد پلاسمای منی)، فراسنجه‌های سرعت در مسیر میانگین، سرعت در مسیر منحنیِ طی شونده به‌وسیله اسپرم و آمپلیتود جابجایی جانبی سر اسپرم با افزایش سطح پلاسمای منی به ۵ درصد کاهش یافت، ولی فراسنجه‌های LIN و WOB افزایش معنی‌داری داشته‌اند (Nongbua *et al*., 2018). همچنین، هیچ اثر متقابلی بین فراسنجه‌های حرکت‌شناسی بعد از انجماد-یخ‌گشایی و باروری گاو نر که پلاسمای منی آن به محیط رقیق‌کننده افزوده می‌شد، وجود نداشته است (Nongbua *et al*., 2018).

نشان داده شد که افزودن یا حذف پلاسمای منی از مایع منی گاومیش، هیچ اثر معنی‌داری بر جنبایی، فراسنجه‌های حرکت‌شناسی، طول عمر، تولید سوپراکسید میتوکندریایی و پتانسیل غشای میتوکندریایی اسپرم‌ها نداشته است (Arjun *et al*., 2021). علاوه بر این، افزودن پلاسمای منی نتوانست آثار منفی رقت بیش از اندازه اسپرم (دو میلیون در هر میلی‌لیتر) در رقیق‌کننده را (از لحاظ جنبایی، حرکت‌شناسی، یکپارچگی غشایی و پتانسیل غشای میتوکندریایی) جبران نماید (Arjun *et al*., 2021). با این حال، گزارش شده است که پلاسمای منی برگرفته از گاوهایی با باروری مشخص، جنبایی نمونه‌های اسپرم اپیدیدیمی را افزایش می‌دهد، هر چند که کارکرد اسپرم‌های تیمار شده در سامانه باروری درون‌تنی تحت تأثیر قرار نگرفت (Holden *et al.*, 2017). افزودن ۵ درصد پلاسمای منی برگرفته از اسب نر نیز باعث افزایش تحرک در نمونه‌های اسپرمی عاری از پلاسمای منی شده است (Morrell *et al*., 2010). همچنین، گزارش شده است که با رقیق‌سازی منی تا رسیدن به تعداد اندکی از اسپرم‌ها در هر دوز، زنده‌مانی اسپرم‌ها کاهش می‌یابد (اثر رقت) و افزودن پلاسمای منی به این نمونه‌های بیش‌رقیق شده، توانست از بزرگی این اثر منفی بر زنده‌مانی اسپرم‌های گاوی بکاهد (Garner *et al*., 2001). در مورد اسپرم انسانی نیز

نشان داده شده است که رقیق‌سازی اسپرم‌ها با یک نوع رقیق‌کننده بر فراسنجه‌های BCF و STR در هنگام ارزیابی با کاسا، تأثیر منفی داشته است. بنابراین، به‌منظور به حداقل رساندن اثر رقت، استفاده از پلاسمای منی بدون اسپرم از همان فرد پیشنهاد شده است (Larsen *et al*., 2000).

امروزه به‌منظور بهره‌برداری هر چه بیشتر از اسپرم‌های تفکیک جنسیتی شده گاوهای برتر، در هر دوز، تعداد کمتر از حد مطلوبی از اسپرم‌ها را تلقیح می‌کنند که خود منجر به پایین آمدن نرخ آبستنی می‌شود (Christensen *et al*., 2011). بنابراین، محققین در تلاش هستند ضمن کاستن از تعداد اسپرم در هر دوز تلقیحی، حداقل کاهش در کیفیت اسپرمی را در بعد از انجماد-یخ‌گشایی داشته باشند، اما مشکلی که در کاهش تعداد اسپرم به ازای هر دوز تلقیح مصنوعی وجود دارد این است که بنا به گزارش‌ها در چندین گونه حیوانی، رقیق‌سازی منی به کمتر از ۲۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر، کیفیت اسپرم را کاهش می‌دهد (Prathalingam *et al*., 2006; Ballester *et al*., 2007; Hayden *et al*., 2015). در یک مطالعه، رقیق‌کننده LDL بهتر از سایر رقیق‌کننده‌ها (رقیق‌کننده‌های بر پایه زرده تخم‌مرغ و یا لیپووزم) از آثار مخرب رقت بیش اندازه اسپرم جلوگیری نمود (Patil *et al*., 2020). بنابراین در این پژوهش، از یک رقیق‌کننده بر پایه تریس -LDL- اسید سیتریک برای انجماد اسپرم استفاده شد. با این حال، هدف از آزمایش حاضر این بود که با افزودن سطوح مختلفی از شیر و یا پلاسمای منی گاو به ترکیب این رقیق‌کننده پایه، بتوان آثار مخرب رقت بر خصوصیات کیفی اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده گاو را به کمترین میزان رساند.

مواد و روش‌ها

ابتدا نمونه‌های شیر به‌صورت سترون جمع‌آوری شدند و نمونه‌های با امتیاز صفر در آزمون ورم پستان کالیفرنیایی انتخاب و مخلوط شدند و سپس دو بار در ۲۲۰۰×g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز پایینی به‌عنوان شیر پس‌چرخ جمع‌آوری شد و بعد از پاستوریزاسیون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه در شیشه‌های آسپتیک بسته‌بندی و به آزمایشگاه منتقل شد. همچنین، به‌منظور تهیه پلاسمای منی، مایع انزالی از یک گاو نر رجیستر شده (که با توجه به ارزیابی‌های اولیه، کیفیت پس از یخ‌گشایی مطلوبی داشت) جمع‌آوری شد و بعد از دو مرتبه سانتریفوژ (۱۸۰۰×g به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس، مایع رویی جداسازی شد و عاری بودن آن از اسپرم در زیر میکروسکوپ نوری مورد تأیید قرار گرفت. ویال‌های حاوی پلاسمای منی به‌منظور سترون‌سازی به‌مدت ۳۶ ساعت در زیر نور UV قرار گرفت.

تهیه رقیق‌کننده پایه: به‌طور خلاصه، ابتدا ۱۲۰ میلی لیتر از زرده عاری از شالاز و غشای ویتلینی با ۱۲۰ میلی لیتر از محلول بافر (که در آن، ۳/۷۸۵ گرم تریس، ۲/۱۱ گرم اسید سیتریک، ۱/۶ گرم فروکتوز، ۱۰۰/۰۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین با آب دو بار تقطیر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شده بود)(Joint, FAO, 2005) رقیق‌سازی شد و بعد از همگن‌سازی با همزن مغناطیسی، دو مرتبه سانتریفوژ (۹۰۰۰×g به مدت ۴۵ دقیقه در دمای دمای ۴ درجه سلسیوس) شد. مایع رویی به‌عنوان پلاسمای زرده جمع‌آوری شد. این پلاسما برای رسوب دادن لیوتین زرده و استخراج بخش غنی از LDL، با سولفات آمونیوم ۴۰ درصد (وزن بر حجم، مرک، آلمان) مخلوط شده و به‌مدت یک ساعت هم‌زده شد. سپس، دو چرخه متوالی سانتریفوژ (۱۰۰۰۰×g به‌مدت ۴۵ دقیقه) اعمال شد تا مایع رویی جدا شود. در ادامه، مایع رویی به‌منظور حذف سولفات آمونیوم، در داخل کیسه‌های سترون مخصوص دیالیز ریخته شده و هر کیسه به‌مدت ۳۶ ساعت در داخل استوانه‌های مدرج حاوی بافر قرار داده شد. سپس، محتویات کیسه‌ها دوباره سانتریفوژ (۱۰۰۰۰×g به‌مدت ۴۵ دقیقه) شد و حجم حاصل شده به‌طور مساوی در بین شش استوانه مدرج تقسیم شد. به محتویات هر استوانه، هفت میلی لیتر گلیسرول اضافه شده و سپس، بسته به تیمار آزمایشی، سطوح مختلفی از شیر (۰، ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر) و پلاسمای منی (۰، ۲ و ۵ میلی‌لیتر) به محتویات هر استوانه مدرج افزوده شد. در ادامه، حجم هر استوانه با محلول بافر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. رقیق‌کننده‌های آزمایشی در داخل ویال‌های شیشه‌ای کوچک ریخته شدند و بعد از مهر و موم‌سازی به‌مدت ۳۶ ساعت در معرض نور UV قرار گرفتند و سپس، تا روز انجام آزمایش در داخل یخچال نگهداری شدند.

در روزهای انجام آزمایش (چهار تکرار زمانی به‌فاصله یک هفته)، ابتدا مایع منی از چهار گاو نر مشخص و ثابت به‌وسیله مهبل مصنوعی جمع‌آوری شد و بعد از ارزیابی اولیه از نظر جنبایی (حداقل ۷۰ درصد جنبایی، ارزیابی شده به

روش چشمی) و غلظت حداقل ۲×۱۰^{۹} اسپرم در هر میلی لیتر، تعیین شده با دستگاه فتومتر (Accucell photometer, IMV, France)، نمونه‌های منی با یک نسبت مساوی از هر کدام مخلوط شد. در ادامه، نمونه‌ای از مخلوط منی با کمک سمپلر برداشته شد و در داخل شیشه‌های حاوی رقیق‌کننده‌های آزمایشی تخلیه شد، به‌نحوی که غلظت اسپرمی در بعد از رقیق‌سازی در هر رقیق‌کننده آزمایشی، ۱۵ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر باشد. این رقیق‌سازی تعداد هشت میلیون اسپرم در هر پایوت نیم میلی لیتری را فراهم نمود. پایوت‌ها بعد از مهر و موم‌سازی روی رک‌های مخصوص چیده شده و به‌مدت دو ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس، پایوت‌ها در داخل دستگاه نیمه‌اتوماتیک انجماد اسپرم (MT freezr 2.0, Minitube, Germany) با کمک بخار ازت منجمد شدند و تا روز یخ‌گشایی و ارزیابی، در داخل کانتینرهای مخصوص ذخیره پایوت نگهداری شدند. به‌منظور ارزیابی، ابتدا پایوت‌های مربوط به هر تکرار و تیمار آزمایشی، یخ‌گشایی شده (در داخل حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۰ ثانیه) و سپس در داخل یک میکروتیوب تخلیه شدند. بلافاصله به منظور بازگشت آب درون‌سلولی اسپرم‌ها، محتویات میکروتیوب‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در داخل بن‌ماری (۳۷ درجه سلسیوس) انکوبه شدند. سپس، دو قطره ۱۰ میکرولیتری از محتویات هر میکروتیوب روی لام تمیزی قرار داده شد و با لامل پوشانده شد. بعد از گذشت ۱۵ ثانیه، برای استقرار کامل و جلوگیری از نوسانات مایع، حرکات اسپرم‌ها در زیر میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed, , Inc., Culver City, CA, USA) با بزرگنمایی ۱۰ مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، ابتدا به‌کمک دوربین فیلم‌برداری از هر قطره، ۱۰ میدان میکروسکوپی (در مجموع، ۲۰ میدان) ثبت شد و در داخل رایانه با نام آن تیمار و تکرار ذخیره‌سازی انجام گرفت. در نهایت، میانگین تجزیه فراسنجه‌های حرکتی هر ۲۰ میدان میکروسکوپی با کمک نرم افزار کاسا (Test Sperm 3.2; Video Test, St. Petersburg, Russia) برای آن تیمار ثبت شد. فراسنجه‌ها یا متغیرهای کینماتیک ثبت شده عبارتند بودند از: جنبایی کل (TM)، جنبایی پیش‌رونده (PM)، درصد اسپرم‌های کم‌جنبا (LM)، درصد اسپرم‌های با حرکت غیرپیش‌رونده (NPM)، سرعت در مسیر منحنیِ طی‌شونده به‌وسیله اسپرم (VCL)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL؛ نکته: این مسیر مفروض با توجه به موقعیت اولیه سر اسپرم تا موقعیت نهایی آن در یک بازه تعریف شده در نرم افزار کشیده می‌شود)، سرعت در مسیر میانگین (VAP؛ نکته: این مسیر میانگین به‌وسیله نرم‌افزار و با توجه به موقعیت‌های سر اسپرم محاسبه می‌شود و به‌صورت منحنی است)، راستی مسیر طی شده (STR=[VSL/VAP]×100)، خطی بودن جنبایی (LIN=[VSL/VCL]×100)، فرکانس حرکات جانبی سر اسپرم (BCF؛ نکته: این فراسنجه بر حسب هرتز بوده و معرف تعداد دفعاتی است که سر اسپرم در هر ثانیه به‌صورت جانبی حرکت کرده و مسیر میانگین را قطع می‌کند)، آمپلیتود جابجایی جانبی سر اسپرم (ALH؛ نکته: به بیشینه دامنه انحراف سر اسپرم نسبت به مسیر متوسط مفروض گفته می‌شود که بر حسب میکرومتر بیان می‌شود)، لرزش (WOB؛ نکته: این شاخص از رابطه WOB=[VAP/VCL]×100 محاسبه می‌شود و معرف درصد اسپرم‌هایی است که حرکات تند و زیگزاگی را در حول مسیر میانگین نشان می‌دهند)، و متوسط زاویه تغییر جهت سر اسپرم‌ها (MAD؛ نکته: این شاخص بر حسب درجه بیان می‌شود و به میانگین قدرمطلق مقادیر زاویه چرخش آنی سر اسپرم در زمان‌های مختلف در امتداد مسیر منحنی‌وار آن اشاره می‌نماید و تشخیص اسپرم‌های در حال چرخش را ممکن می‌سازد). تعیین زنده‌مانی اسپرم‌ها نیز بعد از رنگ‌آمیزی با ائوزین-نیگروزین (Joint, FAO, 2005) و شمارش حداقل ۲۰۰ سلول اسپرمی در گستره‌های تهیه شده صورت گرفت. اسپرم‌هایی که سر آنها حتی اندکی رنگ قرمز به خود گرفته بودند مرده و اسپرم‌هایی که رنگ نگرفته بودند زنده در نظر گرفته شدند.

این مطالعه در چهار تکرار مختلف و به کمک رویه GLM نرم افزار SAS (نسخه ۹/۲) در قالب یک آزمایش فاکتوریل ۳×۳ (با سه سطح شیر و سه سطح پلاسمای منی) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطوح به کار رفته برای شیر، ۰، ۵ و ۱۰ درصد بود و سطوح پلاسمای منی در ۰، ۲ و ۵ درصد تنظیم شد. درصد سایر اجزای رقیق‌کننده شامل گلیسرول (۷ درصد) و بخش غنی از LDL استخراج شده از زرده در همه رقیق‌کننده‌ها، یکسان و معادل ۲۰ درصد (v/v) زرده اولیه بود. مقادیر به‌صورت حداقل میانگین مربعات±خطای استاندارد گزارش شدند. مقایسه میانگین‌ها

با آزمون توکی صورت گفت و $P<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر متقابل دو عامل مورد بررسی (شیر پس‌چرخ و پلاسمای منی) فقط روی درصد اسپرم‌های زنده معنی‌دار بود ($P<۰/۰۱$) و این اثر متقابل در مورد فراسنجه‌های حرکت‌شناسی، معنی‌دار نبود. مقایسه بین درصد زنده‌مانی تیمارهای مختلف در بعد از انجماد-یخ‌گشایی در شکل ۱ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که درصد زنده‌مانی اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده در رقیق‌کننده «۵ درصد شیر و ۲ درصد پلاسمای منی» بیشتر از درصد مربوطه در رقیق‌کننده‌های حاوی «۵ درصد شیر و فاقد پلاسمای منی» و «۲ درصد پلاسمای منی و فاقد شیر» بود ($P<۰/۰۱$). همچنین، درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها در رقیق‌کننده «۱۰ درصد شیر و ۵ درصد پلاسمای منی» بالاتر از درصد مربوطه در رقیق‌کننده «۵ درصد شیر و فاقد پلاسمای منی» بود ($P<۰/۰۱$).

اثر اصلی افزودن سطوح مختلفی از شیر پس‌چرخ گاوی بر فراسنجه‌های حرکت‌شناسی اسپرم در جدول ۱ نشان داده شده است. ملاحظه می‌شود که افزودن شیر در هر دو سطح ۵ و ۱۰ درصد، منجر به افزایش جنبایی پیش‌رونده اسپرم‌ها، کاهش درصد اسپرم‌های کم‌جنبا، افزایش سرعت حرکت اسپرم‌ها (فراسنجه‌های VCL و VSL و VAP) و همچنین، راستی مسیر طی شده به‌وسیله آنها (STR) شده است ($P<۰/۰۵$). همچنین، افزودن شیر در سطح ۱۰ درصد منجر به افزایش درصد اسپرم‌هایی شد که حرکت خطی داشتند (LIN)، ولی منجر به کاهش درصد اسپرم‌هایی شد که لرزش (حرکات تند و زیگزاگی را حول مسیر میانگین) نشان می‌دادند.

اثر اصلی افزودن سطوح مختلفی از پلاسمای منی بر فراسنجه‌های ارزیابی شده به‌وسیله نرم افزار تجزیه اسپرم در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد افزودن ۵ درصد پلاسمای منی به ترکیب رقیق‌کننده تریس-LDL، منجر به افزایش معنی‌دار جنبایی پیش‌رونده، ALH، VCL، VSL، VAP، STR، LIN و WOB و همچنین، کاهش معنی‌دار فراسنجه‌های MAD و BCF در مقایسه با تیمار شاهد (فاقد پلاسمای منی) شد ($P<۰/۰۵$).

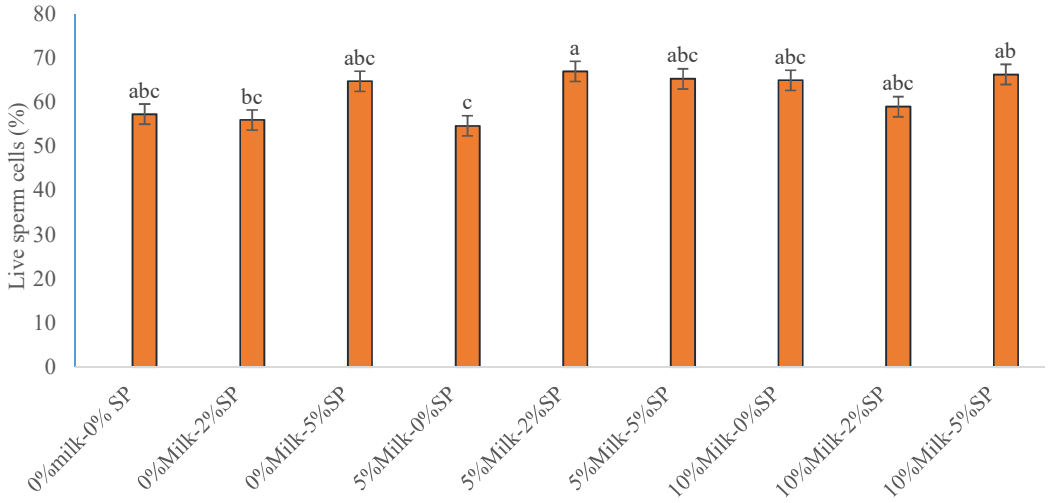

Fig. 1. Effect of different experimental extenders on the percentage of live sperm cells after freezing-thawing (LSMEANS±SE). Means that do not share a common superscript differ significantly from each other ($P<0.01$)

شکل ۱- اثر رقیق‌کننده‌های مختلف آزمایشی بر درصد اسپرم‌های زنده پس از انجماد-یخ‌گشایی (حداقل میانگین مربعات±خطای استاندارد). میانگین‌های با بالانویس‌های غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P<۰/۰۱$)

جدول ۱- فراسنجه‌های حرکت‌شناسی اسپرم گاو نر (میانگین حداقل مربعات± خطای استاندارد) نگهداری شده در رقیق‌کننده Tris-LDL همراه با سطوح مختلفی از شیر پس از یخ‌گشایی

Table 1. Post-thaw kinematic parameters of bull sperm (LSMEANS±SE) cryopreserved in Tris-LDL extender supplemented with different levels of milk

Item	Control (0% milk)	5% milk	10% milk	*P*-value
TM[1] (%)	53.18±2.97[a]	53.92±2.20[a]	53.90±2.72[a]	0.09
PPMS[2] (%)	23.73±2.67[b]	32.73±2.18[a]	31.57±3.21[a]	<0.01
NPM[3] (%)	9.31±0.75[a]	8.74±0.50[a]	9.04±0.39[a]	0.70
LM[4] (%)	20.02±0.91[a]	17.44±0.81[b]	17.30±0.77[b]	0.02
ALH[5] (µm/s)	1.17±0.096[a]	1.40±0.09[a]	1.35±0.10[a]	0.08
VCL[6] (µm/s)	52.78±3.44[b]	64.36±3.18[a]	62.74±4.00[a]	0.02
VSL[7] (µm/s)	13.68±1.49[b]	18.29±1.37[a]	18.75±1.85[a]	<0.01
VAP[8] (µm/s)	16.84±1.80[b]	21.81±1.65[a]	22.28±2.21[a]	0.01
STR[9] (%)	0.70±0.01[b]	0.73±0.003[a]	0.74±0.008[a]	<0.01
LIN[10] (%)	0.21±0.01[b]	0.23±0.01[b]	0.26±0.01[a]	<0.01
WOB[11] (%)	0.26±0.01[b]	0.28±0.01[ab]	0.31±0.01[a]	<0.01
BCF[12] (Hz)	15.51±0.21[a]	15.33±0.14[a]	15.43±0.17[a]	0.64
MAD[13] (º)	56.02±0.36[a]	55.46±0.20[a]	55.51±0.30[a]	0.06

[1] Total motility; [2] Percentage of progressive motile sperm cells; [3] Non-progressive motility; [4] Low motile sperm cells; [5] Amplitude of lateral head displacement; [6] Curvilinear velocity; [7] Straight linear velocity; [8] Average path velocity; [9] Straightness; [10] Linearity; [11] Wobble; [12] Beat cross-frequency; [13] Mean angular displacement

[a-b] Means that do not share a common superscript within the same row differ significantly (P<0.05).

جدول ۲- فراسنجه‌های جنبش‌شناسی اسپرم گاو نر (میانگین حداقل مربعات± خطای استاندارد) نگهداری شده در رقیق‌کننده Tris-LDL همراه با سطوح مختلفی از پلاسمای منی پس از یخ‌گشایی

Table 2. Post-thaw kinematic parameters of bull sperm (LSMEANS±SE) cryopreserved in Tris-LDL extender supplemented with different levels of seminal plasma

Item	0% SP	2% SP	5% SP	*P*-value
TM (%)	51.66±2.03[b]	53.12±2.45[b]	65.22±1.60[a]	<0.01
PM (%)	22.42±2.67[b]	27.83±2.29[b]	37.78±1.77[a]	<0.01
NPM (%)	9.43±0.47[a]	7.77±0.41[b]	9.89±0.61[a]	0.01
LM (%)	19.83±0.79[a]	17.42±0.64[b]	17.51±1.06[ab]	0.04
ALH (µm/s)	1.11±0.08[b]	1.21±0.07[b]	1.59±0.08[a]	<0.01
VCL (µm/s)	52.84±3.44[b]	57.14±3.28[b]	59.90±2.85[a]	<0.01
VSL (µm/s)	13.12±1.36[b]	15.49±1.35[b]	22.11±1.14[a]	<0.01
VAP (µm/s)	15.92±1.50[b]	18.31±1.50[b]	26.72±1.48[a]	<0.01
STR (%)	0.70±0.01[b]	0.72±0.01[b]	0.74±0.01[a]	<0.01
LIN (%)	0.21±0.01[b]	0.22±0.01[b]	0.27±0.01[a]	<0.01
WOB (%)	0.26±0.01[b]	0.27±0.01[b]	0.34±0.01[a]	<0.01
BCF (Hz)	15.76±0.13[a]	15.61±0.14[a]	14.89±0.14[b]	<0.01
MAD (º)	56.57±0.20[a]	55.75±0.24[b]	54.67±0.14[c]	<0.01

SP: Bovine seminal plasma. The definition of the abbreviations can be found in Table 1.

[a-b] Means that do not share a common superscript within the same row differ significantly (P<0.05).

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن شیر به ترکیب رقیق‌کننده تریس-سیترات-لیپوپروتئین‌های کم‌چگالی زرده در هر دو سطح ۵ و ۱۰، منجر به افزایش فراسنجه‌های مرتبط با سرعت اسپرم (VCL، VSL و VAP) شد. در گاو، افزایش VCL و ALH، شاخص‌های بیش‌فعالی اسپرم‌ها هستند که ممکن است در دوزهای اسپرمی به‌کار رفته برای تلقیح مصنوعی مطلوب نباشد (Olivera *et al*., 2012)، ولی در IVF مقبول خواهد بود (Suarez and Ho, 2003). فراسنجه‌های LIN، STR و WOB، تنها با افزودن ۱۰ درصد شیر گاوی به ترکیب رقیق‌کننده پایه، افزایش معنی‌داری یافتند. با این حال، فراسنجه‌های منعکس‌کننده ویژگی‌های تکان‌خوردن یا نوسان سر اسپرمی (ALH، BCF و MAD) تحت تأثیر افزودن شیر به ترکیب رقیق‌کننده قرار نگرفتند (P>۰/۰۵). شایان ذکر است که در سطح ۱۰ درصد شیر،

هیچ‌گونه تداخلی در کارکرد نرم افزار کاسا پیش نیامد و اسپرم‌ها در زیر میکروسکوپ به‌راحتی قابل تشخیص بودند. با توجه به عدم معنی‌دار بودن اثر متقابل دو عامل آزمایشی بر فراسنجه‌های حرکت‌شناسی، نمی‌توان اثر هم‌افزایی ناشی از دو عامل را بر این فراسنجه‌ها انتظار داشت. اثر هم‌افزایی دو عامل آزمایشی روی زنده‌مانی اسپرم‌ها نیز هنگامی بود که به‌جای استفاده از سطح ۲ درصد پلاسمای منی و یا سطح درصد شیر در ترکیب رقیق‌کننده، این دو افزودنی به‌طور توأم در ترکیب رقیق‌کننده گنجانده شده باشند.

از مدت‌ها قبل مشخص بوده است که منی حیوانات مختلف را می‌توان به‌طور مستقیم در شیر به‌عنوان یک بافر، رقیق نمود و در نتیجه، اسپرم‌ها را در دمای چهار درجه سلسیوس در شیر ذخیره‌سازی کرده و یا در حضور گلیسرول، منجمد کرد (Kakar and Ganguli, 1978; Oyewumi *et al*., 2024). از آن‌جایی که شیر پس‌چرخ (که عاری از چربی‌ها است) در حفاظت از سلول‌های اسپرمی طی ذخیره‌سازی در دمای ۴°C یا طی انجماد، همانند شیر کامل به‌طور کارآمد عمل می‌کند (Foote *et al*., 2002)، به‌نظر نمی‌رسد که چربی‌ها شکل‌دهنده محافظتی باشند که به‌وسیله شیر ایجاد می‌شود. بنابراین، به احتمال زیاد، محافظ‌ترین ماده تشکیل‌دهنده شیر، میسل‌های کازئینی (پروتئین اصلی شیر) خواهند بود. در حقیقت، نشان داده شده است که میسل‌های کازئین جدا شده از شیر می‌توانند از اسپرم نریان، بز و قوچ طی نگهداری در دمای ۴ تا ۵°C محافظت نمایند (Lebouf *et al*., 2003). علاوه بر این، میسل‌های کازئینی می‌توانند از اسپرم گاوی طی انجماد در حضور گلیسرول محافظت کنند (Choong and Wales, 1963). با این حال، هنوز ساز و کاری که با آن، کازئین از اسپرم گاوی در طول ذخیره‌سازی محافظت می‌کند، توضیح داده نشده است. علاوه بر این، افزودن لاکتوز به رقیق‌کننده حاوی کازئین، منجر به بهبود کارآیی رقیق‌کننده طی انجماد اسپرم گاوی شده است (Choong and Wales, 1963). بدین ترتیب، به‌نظر می‌رسد که لاکتوز نیز در محافظت از اسپرم به‌وسیله شیر نقش داشته باشد. با این حال، فیلترای شیر که تنها حاوی لاکتوز و مواد معدنی است برای محافظت از اسپرم نریان طی نگهداری کافی نیست (Batellier *et al*., 1997). به‌طور مشابهی، دیالیز نمودن شیر بدون چربی نیز برای محافظت از اسپرم گاو نر در طول انجماد کافی نبود و بنابراین، حضور بخش غیرقابل دیالیز شیرِ پس‌چرخ برای محافظت از اسپرم مورد نیاز است (Garcia and Graham, 1987). همچنین، لاکتوز یک جزء رایج رقیق‌کننده‌های بر پایه زرده تخم‌مرغ است که برای انجماد اسپرم خوک و نریان به‌کار می‌رود (Heitland *et al*., 1996; Yi *et al*., 2002). بنابراین، به‌نظر می‌رسد که لاکتوز باعث بهبود کارآیی رقیق‌کننده می‌شود، ولی به خودی خود برای محافظت از اسپرم کافی نیست. علاوه بر این، تصور بر این است که شیر (هموژن شده یا پس‌چرخ) نیز همچون زرده تخم مرغ، حاوی عواملی باشد که قادر به جدا نمودن پروتئین‌های پلاسمای منی گاوی (BSP) باشند (Brunner, 1969; Foote *et al*., 2002). این پروتئین‌ها که به‌وسیله غدد وزیکولی ترشح می‌شوند با اتصال به غشای اسپرم‌ها پس از انزال، باعث تحریک خروج کلسترول و فسفولیپیدها از غشای اسپرم می‌شوند که به نوبه خود می‌تواند اسپرم‌ها را در هنگام ذخیره‌سازی در حالت‌های مایع یا یخزده بسیار آسیب‌پذیر سازد (Bergeron and Manjunath, 2006). بنابراین، با توجه به این که شیر پس‌چرخ فاقد گلبول‌های چربی شیرِ حاوی فسفولیپیدهای کولینی است که می‌توانند با پروتئین‌های BSP فعل و انفعال داشته باشند (Brunner, 1969)، به نظر می‌رسد که عواملی غیر از لیپیدها یا لیپوپروتئین‌های شیر مسئول محافظت از سلول‌های اسپرم هستند (Foote *et al*., 2002). با توجه به این که لاکتوز به پروتئین‌های BSP متصل نمی‌شود (Manjunath *et al*., 2002)، این احتمال وجود دارد که برخی از پروتئین‌های شیر مانند میسل‌های کازئینی با پروتئین‌های BSP فعل و انفعال داشته باشند (Manjunath *et al*., 2002).

افزودن پلاسمای منی در سطح ۵ درصد به ترکیب رقیق‌کننده پایه، آثار مفیدی روی برخی از فراسنجه‌های حرکت‌شناسی اسپرمی در پس از انجماد-یخ‌گشایی نشان داد (جدول ۲)، به‌طوری که علاوه بر فراسنجه‌های مرتبط با سرعت اسپرم‌ها (VCL، VSL، VAP)، نسبت‌های مرتبط با سرعت سر اسپرم‌ها (LIN، STR و WOB) نیز به‌وسیله این سطح از مکمل‌سازی پلاسمای منی، افزایش معنی‌داری یافت ($P<۰/۰۵$). افزودن پلاسمای منی در سطح ۵ درصد به ترکیب رقیق‌کننده، همچنین منجر به کاهش معنی‌دار برخی از متغیرهای مرتبط با نوسان سر اسپرمی (BCF و MAD) شد (جدول ۲). فراسنجه MAD اطلاعاتی در مورد زاویه متوسط چرخش اسپرم در هنگام حرکت ارائه می‌دهد

و کاهش آن می‌تواند دال بر این باشد که انحراف مسیر حرکت اسپرم‌ها از حالت خطی کمتر بوده یا اسپرم‌ها حالت‌های چرخشی‌وار کمتری نشان داده‌اند (King *et al*., 2000). گزارش شده است که در هنگام تیمار موش‌های نر با یک داروی ضدبارداری، شاخص MAD در موش‌های تیمار شده به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش نشان می‌دهد (Mdhluli and van der Horst, 2002). بنابراین، کاهش یافتن MAD در اثر افزودن پلاسمای منی، اثر مطلوبی تلقی می‌شود. با این حال، کاهش BCF در اثر افزودن پلاسمای منی، مطلوب به‌نظر نمی‌رسد زیرا همبستگی بین مقادیر BCF و باوری اسپرم انسانی (Larsen *et al*., 2000) و همچنین، همبستگی بین فراسنجه BCF و جنبایی اسپرم بوقلمون (King *et al*., 2000) در مطالعات پیشین گزارش شده است. همچنین، افزودن ۵ درصد پلاسمای منی، درصد ALH را در مقایسه با شاهد افزایش داد (جدول ۲). از بین فراسنجه‌های کاسا، ALH تنها فراسنجه‌ای بود که پس از فراوری نمونه‌های اسپرمی یخ‌گشایی شده در چگالی-گرادیان ناپیوسته‌ای از ذرات سیلیس، در باروری موفق در هنگام تلقیح درون‌رحمی، نقش مثبت تعیین‌کننده‌ای را ایفا می‌نمود (Fréour *et al*., 2010). علاوه بر این، اسپرم‌های طبیعی تمایل دارند تا با زنش‌های فلاژلومی متقارنی حرکت کنند و اگر در نمونه‌ای از منی، درصد اسپرم‌های نابه‌هنجار بیشتر باشد، ALH ممکن است کاهش یابد (Stachecki *et al*., 1992).

اثر مایع منی بر جنبایی و یکپارچگی کارکردی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده از دیرباز، توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Maxwell *et al*., 1999). به‌عنوان مثال، گزارش شده است که افزودن مایع منی قوچ به منی منجمد-یخ‌گشایی شده، جنبایی اسپرم‌ها را بهبود بخشیده، تغییرات مشابه کاپاسیتاسیون را به تأخیر می‌اندازد و یکپارچگی آکروزومی و باروری را بهبود می‌بخشد (Maxwell *et al*., 1999). اعتقاد بر این است که پلاسمای منی حاوی عوامل دکاپاسیتاسیون است که می‌توانند با تغییرات کاپاسیتاسیون‌مانند در اسپرم مقابله کنند که به-وسیله فرایندهای انجماد-یخ‌گشایی تحریک می‌شوند (Gillan and Maxwell, 1999). همچنین، کاهش در غلظت و یا غیاب پروتئین‌های خاصی از پلاسمای منی به علت تأثیر فصل، با جنبایی پایین‌تر اسپرم در فصول غیر تولیدمثلی مرتبط دانسته شده است (D'Alessandro and Martemucci, 2003). هر چند، اثر پلاسمای منی یا پروتئین‌های آن بر کنش اسپرم به‌طور وسیعی مطالعه شده است (Muiño-Blanco *et al*., 2008)، با این حال، نتایج حاصل از این مطالعات، ضد و نقیض هستند. به عنوان مثال، گزارش شده است که افزودن پروتئین‌های پلاسمای منی به اسپرم انزالی که از مایع منی جدا شده و در معرض شوک سرمایی قرار گرفته بودند، موجب ترمیم آسیب حاصل از شوک سرمایی روی غشای اسپرم شده است (Barrios *et al*., 2000). گفته شده است که برخی از پروتئین‌های مایع منی ممکن است به‌طور اختصاصی به غشای اسپرم، به‌ویژه در ناحیه آکروزومی، متصل شده و سبب حفاظت از غشای اسپرم از آسیب‌های ساختاری شوند (Bernardini *et al*., 2008). افزودن ۱۰ درصد مایع منی پس از یخ‌گشایی به اسپرم خوک نیز موجب افزایش باروری آن شده است (Okazaki *et al*., 2009). همچنین، اضافه کردن مایع منی به اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ، موجب بهبود جنبایی، یکپارچگی آکروزومی و تنفس میتوکندریایی اسپرم شد (Dominguez Rebolledo *et al*., 2007; Colás *et al*., 2009). محققین، آثار مثبت ناشی از افزودن مایع منی روی اسپرم‌ها را به پروتئین‌های مایع منی و به‌خصوص RSVP-20 و RSVP-14 نسبت داده‌اند (Barrios *et al*., 2000). همچنین، نشان داده شده است که افزودن پروتئین‌های پلاسمای منی (> ۳ kDa) به اسپرماتوزوآ قبل از تیمار سرمایی، اثر مفید فوری بر بقای اسپرم‌ها داشت (Pérez-Pé *et al*., 2001). با این حال، باید توجه داشت که در مورد گونه‌هایی مثل بز (Ustuner *et al*., 2009) و اسب (Pickett and Amann, 1987)، حذف سریع پلاسمای منی، آثار مفیدی بر انجمادپذیری منی قوچ داشت. همچنین، گزارش شده است که پپتیدهای کاتیونی و آنیونی پلاسمای منی گاوی، اثر مخربی بر جنبایی اسپرم داشت و آثار مخرب این پپتیدها در مقایسه با کل پلاسمای منی، بیشتر بوده است (Al-Somai *et al*., 2009). نکته‌ای که باید بدان توجه داشت این است که غلظت اولیه انزال‌ها و رقت نهایی اسپرم‌ها در رقیق‌کننده‌های آزمایش حاضر به‌ترتیب بالا و پایین بوده است و مایع منی افزوده شده به ترکیب رقیق‌کننده‌ها نیز از انزال گاو جدا شده بود که باروری مطلوبی داشته است.

نتایج حاضر در تضاد با یافته‌های یک پژوهش پیشین بود که در آن، افزودن ۵ درصد پلاسمای منی منجر به کاهش فراسنجه‌های VAP، VCL و ALH شده بود (Nongbua *et al*., 2018). ممکن است تفاوت در مقدار رقیق‌سازی اسپرم‌ها در هر پایوت (۶۹×۱۰^{۶} اسپرم در هر میلی لیتر در مطالعه این پژوهشگران در مقابل ۱۵×۱۰^{۶} اسپرم در هر میلی لیتر در پژوهش حاضر) و همچنین حذف کامل پلاسمای منی (با روش سانتریفوژ تک‌لایه) و سپس افزودن سطح معینی از آن، در مقابل عدم حذف پلاسمای منیِ مخلوط اسپرمی در پژوهش حاضر، در اختلاف نتایج دخیل باشد.

سطح ۲ درصد پلاسمای منی بدون اثر بر شاخص‌های سرعت (VCL و ALH که معرف بیش‌فعالی اسپرم‌ها هستند)، فراسنجه MAD را کاهش داد که می‌تواند دال بر بهبود باروری اسپرم‌ها باشد (Mdhluli and van der Horst, 2002). علاوه بر این، درصد زنده‌مانی اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده در رقیق‌کننده حاوی ۲ درصد پلاسمای منی به‌همراه ۵ درصد شیر نسبت به رقیق‌کننده حاوی ۲ درصد پلاسمای منی، به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۱). بنابراین، در هنگام نیاز به کاهش شمار اسپرم در هر دوز تلقیح، از جمله اسپرم‌های تعیین جنسیت شده، رقیق‌سازی و انجماد اسپرم‌ها در رقیق‌کننده حاوی ۲ درصد پلاسمای منی به‌همراه ۵ درصد شیر برای پایوت‌های اسپرم مورد استفاده در تلقیح مصنوعی ممکن است مطلوب باشد. در انطباق با این یافته، گزارش شده است که هنگام گنجاندن پلاسمای منی در ترکیب یک مایع مخصوص جمع‌آوری منی (محیط بافری حاوی ۲ درصد زرده)، درصد اسپرم‌های زنده افزایش می‌یابد (Maxwell *et al*., 1996). همچنین، گزارش شده است که هنگام کاستن از تعداد اسپرم‌ها در هر پایوت تلقیح، اثر افزودن پلاسمای منی روی زنده‌مانی اسپرم‌ها، مثبت بود (Garner *et al*., 2001).

نتیجه‌گیری کلی

افزودن ۵ درصد پلاسمای منی و یا سطوح مختلفی از شیر (۵ و ۱۰ درصد) به ترکیب رقیق‌کننده پایه، فراسنجه‌های مربوط به سرعت اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده را افزایش داد که می‌تواند در هنگام استفاده از اسپرم در پژوهش‌های برون‌تنی (IVF) مفید باشد. هر چند، سطح ۵ درصد شیر، شاخص‌های حرکت‌شناسی/سرعت را بهبود بخشید، ولی شاخص LIN، که شاخص مهمی است که با باروری آتی اسپرم‌ها همبستگی دارد، تنها با افزودن سطح ۱۰ درصد شیر نسبت به شاهد بهبود معنی‌داری یافت. در هنگام مقایسه اثر افزودن دو سطح مختلف پلاسمای منی روی باروری آتی اسپرم‌ها مشاهده شد که افزودن پلاسمای منی در سطح ۵ درصد، با توجه به افزایش جنبایی پیش‌رونده، راستی مسیر طی شده، خطی بودن حرکت و همچنین، کاستن از شاخص MAD در مقایسه با این فراسنجه‌ها در رقیق‌کننده حاوی سطح ۲ درصد پلاسمای منی، از نظر بهبود باروری احتمالی در شرایط IVF، سطح مطلوبی باشد. با این حال، برای تصمیم‌گیری در مورد سطح مطلوب پلاسمای منی و یا شیر پس‌چرخ در ترکیب رقیق‌کننده به‌منظور تهیه پایوت‌های مورد استفاده در تلقیح مصنوعی، باید با آزمون‌های بیشتر، یکپارچگی غشای آکروزوم، درصد اسپرم‌های کاپاسیته شده، ساختار کروماتین و باروری اسپرم‌ها تعیین شود.

فهرست منابع

Al-Somai, N., Molan, P. C., Vishwanath, R., & Shannon, P. (1994). Anionic and cationic components from protein aggregates in bovine seminal plasma and their effects on sperm motility. *Molecular Reproduction Development*, *39*, 328-336. doi: 10.1071/RD9940165

Arjun, V., Kumar, P., Dutt, R., Kumar, A., Bala, R., Verma, N., Jerome, A., Virmani, M., Patil, C. S., Singh, S., & Kumar, D. (2021). Is addition or removal of seminal plasma able to compensate for the dilution effect of buffalo semen? *Andrologia*, *53*(8), e14123. doi: 10.1111/and.14123

Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. A. (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*, *63*, 1531-1537. doi: 10.1095/biolreprod63.5.1531

Batellier, F., Magistrini, M., Fauquant, J., & Palmer, E. (1997). Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, *48*(3), 391-410. doi: 10.1016/S0093-691X(97)00250-1

Bergeron, A., & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, *73*(10), 1338-1344. doi: 10.1002/mrd.20565

Bernardini, A., Hozbor, F., Sanchez, E., Fornes, M. W., Alberio, R. H., & Cesari, A. (2011). Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. *Theriogenology*, *76*(3), 436-447. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.02.020

Bromfield, J. J. (2016). A role for seminal plasma in modulating pregnancy outcomes in domestic species. *Reproduction*, *152*(6), R223-R232. doi: 10.1530/REP-16-0313

Brunner J. R. 1969. Milk lipoproteins. In: Tria, E., Scanu, A.M. (Eds.), Structural and functional aspects of lipoproteins in living system. London and New York: Academic Press. Pp. 545-615.

Colás, C., Junquera, C., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A., & Muiño-Blanco, T. (2009). Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microscopy Research and Technique*, *72*(8), 566-572. doi: 10.1002/jemt.20710

Choong, C. H., & Wales, R. G. (1963). The use of various diluents for deep-freezing bull spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*, *16*(4), 896-904. doi: 10.1071/BI9630896

Christensen, P., Labouriau, R., Birck, A., Boe-Hansen, G. B., Pedersen, J., & Borchersen, S. (2011). Relationship among seminal quality measures and field fertility of young dairy bulls using low-dose inseminations. *Journal of Dairy Science*, *94*(4), 1744-1754. doi: 10.3168/jds.2010-3087

D'Amours, O., Frenette, G., Fortier, M., Leclerc, P., & Sullivan, R. (2010). Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. *Reproduction*, *139*(3), 545-556. doi: 10.1530/REP-09-0375

D'Alessandro, A. G., & Martemucci, G. (2003). Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Animal Reproduction Science*, *79*, 93-102. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00113-1

Dominguez Rebolledo, A., Navarrete Sierra, L., Cruz Tamayo, A., Aguiar Loria, A., Erosa Denis, S., Bolio Oses, R., González Parra, E., Paredes Monsreal, L., & Ramón Ugalde, J. (2007). Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluited with seminal plasma. *Revista Científica*, *17*(1), 73-76.

Foote, R. H., Brockett, C. C., & Kaproth, M. T. (2002). Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, *71*(1-2), 13-23. doi: 10.1016/S0378-4320(02)00018-0

Fréour, T., Jean, M., Mirallié, S., Dubourdieu, S., & Barrière, P. (2010). Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, *149*(2), 186-189. doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.12.029

Garcia, M. A., & Graham, E. F. (1987). Effects of low-molecular-weight fractions (LMWF) from milk, egg yolk, and seminal plasma on freezability of bovine spermatozoa. *Cryobiology*, *24*(5), 429-436. doi: 10.1016/0011-2240(87)90046-0

Garner, D. L., Thomas, C. A., Gravance, C. G., Marshall, C. E., DeJarnette, J. M., & Allen, C. H. (2001). Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, *56*(1), 31-40. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00540-4

Gil, J., Söderquist, L., & Rodriguez-Martinez, H. (2000). Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, *54*(1), 93-108. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00328-9

Gillan, L., & Maxwell, W. M. C. (1999). The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, *54*, 271-283. doi: 10.1530/biosciprocs.4.021

Heitland, A. V., Jasko, D. J., Squires, E. L., Graham, J. K., Pickett, B. W., & Hamilton, C. (1996). Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*, *28*(1), 47-53. doi: 10.1111/j.2042-3306.1996.tb01589.x

Holden, S. A., Fernandez-Fuertes, B., Murphy, E. M., Lonergan, P., & Fair, S. (2017). Effect of seminal plasma from high-and low-fertility bulls on cauda epididymal sperm function. *Reproduction*, *Fertility and Development*, *29*(12), 2457-2465. doi: 10.1071/RD17136

Joint, F. A. O. (2005). Improving artificial breeding of cattle and buffalo in Asia. Guidelines and recommendations. A manual prepared under the framework of an IAEA Technical Cooperation Regional RCA Project on 'Improving Animal Productivity and Reproductive Efficiency', with technical support of the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture (No. IAEA-TECDOC--1480). *Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture*. P. 54.

Juyena, N. S., & Stelletta, C. (2012). Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology*, *33*(4), 536-551. doi: 10.2164/jandrol.110.012583

Kakar, S. S., & Ganguli, N. C. (1978). Milk as an extender for semen: a review. *The Indian Journal of Animal Sciences*, *48*(11), 777-790.

King, L. M., Holsberger, D. R., & Donoghue, A. M. (2000). Correlation of CASA velocity and linearity parameters with sperm mobility phenotype in turkeys. *Journal of Andrology*, *21*(1), 65-71. doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03277.x

Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T. K., Bonde, J. P., Ernst, E., Hjollund, N. H., Zhou, Y., Skakkebaek, N. E., & Giwercman, A. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reproduction*, *15*(7), 1562-1567. doi: 10.1093/humrep/15.7.1562

Leboeuf, B., Guillouet, P., Batellier, F., Bernelas, D., Bonne, J. L., Forgerit, Y., & Magistrini, M. (2003). Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. *Theriogenology*, *60*(5), 867-877. doi: 10.1016/S0093-691X(03)00095-5

Manjunath, P., & Thérien, I. (2002). Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, *53*(1-2), 109-119. doi: 10.1016/S0165-0378(01)00098-5

Maxwell, W. M., Welch, G. R., & Johnson, L. A. (1996). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development*, *8*(8), 1165-1178. doi: 10.1071/RD9961165

Maxwell, W. M. C., Evans, G., Mortimer, S. T., Gillan, L., Gellatly, E. S., & McPhie, C. A. (1999). Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction Fertility Development*, *11*, 123-126. doi: 10.1071/RD99046

Maxwell, W.M.C., De Graaf, S. P., Ghaoui, RE-H., & Evans, G. (2007). Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, *64*, 13-38. doi: 10.5661/RDR-VI-13

Mdhluli, M. C., & Van der Horst, G. (2002). The effect of oleanolic acid on sperm motion characteristics and fertility of male Wistar rats. *Laboratory Animals*, *36*(4), 432-437. doi: 10.1258/002367702320389107

Morrell, J. M., Rodriguez-Martinez, H., & Johannisson, A. (2010). Single-layer centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size. *Equine Veterinary Journal*, *42*(7), 579-585. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00101.x

Morrell, J. M., Madej, M., Madej, A., & Stalhammar, H. (2015). Fast Protein Liquid Chromatography of Swedish Red and Holstein bull seminal plasma proteins in relation to bull fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, *50*, 67-68.

Muiño-Blanco, T., Pérez-Pé, R., & Cebrián-Pérez, J. A. (2008). Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals*, *4*, 18-31. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01228.x

Nongbua, T., Goodla, L., Johannisson, A., & Morrell, J. M. (2014). Relationship between 56-day non-return rate and the quality of frozen-thawed bull semen. *Reproduction in Domestic Animals*, *49*, 84-84.

Nongbua, T., Al-Essawe, E. M., Edman, A., Johannisson, A., & Morrell, J. M. (2018). Adding bovine seminal plasma prior to freezing improves post-thaw bull sperm kinematics but decreases mitochondrial activity. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *64*(3), 183-190. doi: 10.1080/19396368.2018.1455245

Okazaki, T., Abe, S., Yoshida, S., & Shimada, M. (2009). Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology*, *71*(3), 491-498. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.08.014

Oliveira, L. Z., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Celeghini, E. C. C., dos Santos, R. M., Beletti, M. E., & de Lima, V. F. M. H. (2012). Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. *Livestock Science*, *146*(1), 38-46. doi: 10.1016/j.livsci.2012.02.018

Oyewumi, S. O., Akintunde, A. O., Tayo, G. O., Ndubuisi-Ogbonna, L. C., & Abdullah, A. R. (2024). Review of livestock semen extension and cryopreservation of spermatozoa. *Bima Journal of Science and Technology*, *8*(1B), 13-22. doi: 10.56892/bima.v8i1.609

Patil, S., Kumar, P., Singh, G., Bala, R., Jerome, A., Patil, C. S., Kumar, D., Singh, S., & Sharma, R. K. (2020). 'Semen dilution effect' on sperm variables and conception rate in buffalo. *Animal Reproduction Science*, *214*, 106304. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106304

Pickett, B. W., & Amann, R. P. (1987). Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. *Journal of Equine Veterinary Science*, *7*(5), 289-302. doi: 10.1016/S0737-0806(87)80049-7

Poiani, A. (2006). Complexity of seminal fluid: a review. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *60*, 289-310. doi: 10.1007/s00265-006-0178-0

Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A., & Muino- Blanco, T. (2001). Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, *56*, 425-434. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00574-X

Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2011). Seminal plasma proteins: what role do they play? *American Journal of Reproductive Immunology*, *66*, 11-22. doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x

Stachecki, J. J., Ginsburg, K. A., Leach, R. E., & Armant, D. R. (1993). Computer-assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. *Journal of Andrology*, *14*(1), 60-65. doi: 10.1002/j.1939-4640.1993.tb00370.x

Suarez, S. S., & Ho, H. C. (2003). Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, *38*(2), 119-124. doi: 10.1046/j.1439-0531.2003.00397.x

Ustuner, B., Gunay, U., & Nur, Z. (2009). Effect of seminal plasma, egg yolk, and season on the fereezability of Saanen buck semen. *Bulletin of the Veterinary Institute in Puławy*, *53*, 369-374.

Yi, Y. J., Im, G. S., & Park, C. S. (2002). Lactose-egg yolk diluent supplemented with N-acetyl-D-glucosamine affect acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. *Animal Reproduction Science*, *74*(3-4), 187-194. doi: 10.1016/S0378-4320(02)00187-2