دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

اثر شیره نارگیل در رقیق‌کننده بر ماندگاری اسپرم قوچ در شرایط سرد

سمیه میرزاپور[۱]، سید مجتبی موسوی[۲] و مجید خالداری[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، (نویسنده مسوول: Mousavi.sym@lu.ac.ir)
۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۲۳
صفحه: ۱۰۳ تا ۱۱۲

چکیده

ذخیره‌سازی طولانی مدت اسپرم مایع موجب تغییر در ساختارهای ریخت‌شناسی و عملکردی اسپرم می‌شود. این مطالعه جهت تعیین اثر سطوح مختلف شیره نارگیل در رقیق‌کننده اسپرم قوچ بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از نگهداری در شرایط سرد انجام گرفت. از تعداد سه رأس قوچ نژاد لری، با واژن مصنوعی، دو بار در هفته اسپرم‌گیری شد. بعد از جمع‌آوری و ارزیابی اولیه نمونه‌ها، انزال‌های منتخب، با هم مخلوط شده و به شش قسمت مساوی تقسیم شدند و هر قسمت به نسبت یک به ۲۰، با رقیق کننده‌های مختلف، رقیق شدند. شش رقیق کننده با اضافه کردن سطوح مختلف شیره نارگیل (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد (حجم/ حجم) و زرده تخم‌مرغ (۱۵ درصد (حجم/حجم)) به رقیق‌کننده بر پایه تریس، آماده شدند. سپس نمونه‌ها، در دمای پنج درجه سانتی‌گراد برای مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. نمونه‌ها در زمان‌های صفر، ۳، ٦، ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت از لحاظ فراسنجه‌های حرکتی (سامانه آنالیز کامپیوتری)، زنده‌مانی (رنگ‌آمیزی ائوزین نیگروزین)، ریخت‌شناسی (محلول هانکوک)، یکپارچگی غشا (روش هاس)، میزان پراکسیداسیون لیپیدها و نرخ قطعه قطعه شدن DNA اسپرم، مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS، آنالیز شدند. نتایج نشان داد که رقیق‌کننده‌های حاوی شیره نارگیل، از نظر برخی فراسنجه‌های حرکتی شامل VSL، VCL ,VAP ,ALH با رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ، تفاوت معنی‌داری نداشتند (p≥۰/۰۵). اما از نظر جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم، Lin، STR و BCF، نسبت به رقیق‌کننده حاوی زرده، به طور معنی‌داری، کمتر بودند (p<۰/۰۵). فراسنجه‌های زنده‌مانی، فعالیت غشای سلول و درصد اسپرم هنجار در همه تیمارها مشابه بود (p≥۰/۰۵). همچنین، میزان پراکسیداسیون لیپیدها و درصد اسپرم‌های با DNA آسیب دیده، تحت تأثیر نوع رقیق‌کننده قرار نگرفت. در کل، استفاده از شیره نارگیل در رقیق‌کننده اسپرم قوچ، نتوانست فراسنجه‌های حرکتی اسپرم را در حد زرده حفظ نماید و جایگزین مناسبی برای زرده در رقیق‌کننده اسپرم قوچ نبود.

واژه‌های کلیدی: اسپرم‌گیری، تلقیح مصنوعی، فراسنجه‌های حرکتی، نگهداری منی

مقدمه

تلقیح مصنوعی به عنوان یک روش علمی برای پیشرفت اهداف تولیدمثل و افزایش راندمان ژنتیکی در گوسفند به کار می‌رود. تلقیح مصنوعی در گوسفند به چند طریق انجام می‌شود که شامل تلقیح به روش‌های واژینال، ترانس سرویکال، لاپاراسکوپی و تلقیح درون رحمی بدون انجام جراحی می‌باشد. نوع اسپرم استفاده‌شده بر بازده روش‌های تلقیح مصنوعی مؤثر می‌باشد. از اسپرم‌های قابل استفاده در تلقیح مصنوعی می‌توان به اسپرم منجمد، اسپرم تازه رقیق‌شده و اسپرم تازه بدون مواد افزودنی، اشاره کرد. تلقیح مصنوعی در گوسفند به‌طور معمول با اسپرم تازه و از راه واژن انجام می‌شود. درصد باروری در این روش حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد است (۱۴). تلقیح مصنوعی با اسپرم تازه با محدودیت‌هایی از قبیل کمبود قوچ با ویژگی‌های برتر در گله، گرفتن همزمان اسپرم و تلقیح در گله، عدم امکان استفاده مفید از قوچ‌های برتر در سطح وسیع‌تر و محدودیت در وجود رقیق کننده مناسب برای نگهداری و حمل‌ونقل اسپرم، مواجه است.

هدف از اضافه کردن رقیق‌کننده‌ها، تأمین انرژی مورد نیاز سلول‌های اسپرم، حفاظت سلول‌ها از آسیب‌های دمایی، کاهش تنش‌های فیزیکی و شیمیایی ناشی از سرد کردن و انجماد سلول‌های اسپرم و در نهایت ایجاد یک محیط مناسب برای زنده ماندن اسپرم‌ها است (۴). از زمانیکه فیلیپس و همکاران (۲۵) اثرات مثبت زرده تخم‌مرغ را برای ذخیره‌سازی منی پستانداران کشف نمودند، زرده به عنوان یکی از اجزای معمول در محیط انجماد اسپرم پستاندارن مورد استفاده قرار گرفت.

زرده تخم‌مرغ، اسپرم را در برابر شوک سرمایی محافظت می‌کند (۱). علاوه بر اثرات مثبت زرده در طی فرآیند سردسازی از دمای اتاق به دمای صفر درجه سانتی‌گراد، در طی دوره انجماد نیز اسپرم از زرده برای محافظت از خود در برابر شوک سرمایی استفاده می‌کند. جنبایی، زنده‌مانی، سلامت آکروزوم و غشای میتوکندریایی اسپرم در طی تنش‌های فیزیکی و شیمیایی می‌تواند با حضور زرده در رقیق‌کننده تا حد قابل قبولی حفظ شود. زرده به عنوان یک بافر اسمزی با حضور در رقیق‌کننده قادر است تحمل اسپرم را

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.33.13.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.33.103]

به هر دو نوع محیط هایپرتونیک و هایپوتونیک افزایش دهد (۲۸،۲۹).

اما به دلیل مشکلاتی که در زرده تخم‌مرغ وجود دارد، ازجمله وجود پروژسترون که سبب ظرفیت دار شدن زودهنگام اسپرم در طی انجماد می‌شود و انتقال میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مختلف بین گله‌ها و حتی بین کشورها و ناشناخته بودن محیط آن، پژوهشگران درصدد جایگزینی آن با منابع دیگری از جمله منابع گیاهی بوده‌اند. مهم‌ترین بخش نگه‌دارنده‌ی زرده‌ی تخم‌مرغ، لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین (LDL) است که از یکپارچگی غشاء در طی انجماد محافظت می‌کند (۳۵).

آب نارگیل، اندوسپرم مایع نارگیل‌های سبز، شیره نارگیل، عصاره مغز میوه نارگیل‌های بالغ حاوی اسیدهای چرب زیادی ازجمله: اسیدهای چرب با چند پیوند غیراشباع (PUFAs)، اسیدهای آمینه، آنتی‌اکسیدان‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی، نمک‌ها، پروتئین‌ها، قندها و الکترولیت‌های مختلف می‌باشند، که مواد مغذی لازم برای حفظ سلول‌ها را فراهم می‌کند و همچنین به عنوان رقیق‌کننده مایع منی و محیط کشت استفاده می‌شود (۳۹،۳۶،۹) مطالعات نشان داده‌اند که رقیق کننده مبتنی بر شیره نارگیل می‌تواند یک جایگزین مناسب برای نگهداری اسپرم باشد (۳۰). برخی مطالعات که بر روی آب پودر نارگیل انجام شده است، نشان داده‌اند که آب پودر نارگیل جایگزین مناسبی به عنوان محافظت‌کننده اسپرم بز (۲۴)، خوک (۶)، سگ (۸) و اسب (۳۱) است.

تحقیقات زیادی در رابطه با اثر شیره نارگیل بر اسپرم حیوانات مختلف صورت گرفته است اما بر اساس دانش ما، تاکنون تحقیقی در مورد اثر آن بر نگهداری اسپرم قوچ صورت نگرفته است، بنابراین با توجه به مقالات مطالعه شده در مورد شیره نارگیل به نظر می‌رسد استفاده از آن در رقیق‌کننده اسپرم قوچ، بتواند اثرات مفیدی بر زنده‌مانی، تحرک، تحرک پیشرونده و سایر ویژگی‌های اسپرم قوچ پس از نگهداری در شرایط سرد، داشته باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات و جمع‌آوری نمونه منی

این پژوهش در دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان انجام شد. از تعداد سه رأس قوچ بالغ نژاد لری (۳ تا ۵ ساله) با استفاده از واژن مصنوعی، دو بار در هفته اسپرم گیری شد. نمونه‌های منی در درون لوله‌های مدرج ریخته شده و با کمک فلاسک حاوی آب ۳۵ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده کشاورزی منتقل شدند. نمونه‌ها بلافاصله در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. انزال‌هایی که معیارها و شرایط ذیل را داشتند برای انجام آزمایش انتخاب شدند: حجم ۲-۰/۵ میلی‌لیتر؛ غلظت بیشتر از ۳×۱۰^{۹} اسپرم در هر میلی‌لیتر؛ تحرک بالای ۸۰ درصد و کمتر از ۱۰ درصد اسپرم ناهنجار. بلافاصله بعد از جمع‌آوری و ارزیابی اولیه نمونه‌ها، به‌منظور جلوگیری از اثرات و پراکنش فردی قوچ‌ها، انزال‌های منتخب، با هم مخلوط شده و برای ادامه آزمایش استفاده شد. منی مخلوط شده به شش قسمت مساوی تقسیم شده و هر قسمت به نسبت یک به ۲۰، با رقیق‌کننده‌های مختلف، رقیق شدند. شش رقیق‌کننده با اضافه کردن سطوح مختلف شیره نارگیل (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد (حجم/ حجم)) و زرده تخم‌مرغ (۱۵ درصد (حجم/حجم)) به رقیق کننده پایه، آماده شد. سپس فالکون‌های حاوی نمونه‌های مایع منی رقیق‌شده، در ظرف حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته (برای سرد شدن تدریجی) و در یخچال با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. نمونه‌های هر تیمار در زمان‌های صفر، ۳، ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از لحاظ فراسنجه‌های حرکتی و سرعتی اسپرم (سامانه آنالیز کامپیوتری)، زنده‌مانی اسپرم (رنگ‌آمیزی ائوزین نیگروزین)، ریخت‌شناسی (محلول هانکوک)، یکپارچگی غشای اسپرم (روش هاس)، میزان پراکسیداسیون لیپیدها و نرخ قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی‌های کیفیت اسپرم

ارزیابی فراسنجه‌های جنبایی اسپرم

در زمان‌های صفر، ۳، ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از نگهداری، از تیمارهای مختلف، با استفاده از سمپلر، سه قطره پنج میکرو لیتری از هر نمونه روی لام ریخته شده و روی هر کدام، یک لامل تمیز قرار گرفت. لام مورد نظر به زیر میکروسکوپ منتقل شده و با استفاده از سامانه آنالیز کامپیوتری (CASA)[۱]، جنبایی اسپرم ارزیابی شد. فراسنجه‌هایی که توسط این نرم‌افزار آنالیز می‌شود شامل: جنبایی کل (TM، درصد)[۲]، جنبایی پیش‌رونده (PM، درصد)[۳]، میانگین سرعت در مسیر (VAP، میکرومتر در ثانیه)[۴]، سرعت در مسیر مستقیم (VSL، میکرومتر در ثانیه)[۵]، سرعت در مسیر منحنی (VCL، میکرومتر در ثانیه)[۶]، جنبایی عرضی سر (ALH، میکرومتر)[۷]، درصد خطی بودن جنبایی (LIN، درصد)[۸]، تناوب عرضی ضربان سر (BCF، هرتز)[۹] و مستقیم بودن مسیر طی شده (STR، درصد)[۱۰] است.

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم (زنده‌مانی اسپرم)

برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. اساس این روش این‌گونه است که اسپرم‌های مرده، رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند، ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای آماده‌سازی رنگ ۱/۶۷ گرم ائوزین Y به همراه ۲/۹ گرم سیترات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با حرارت ملایم حل می‌شود. سپس، ۱۰ گرم رنگ نیگروزین به محلول قبلی اضافه شده و جوشانده می‌شود. در مرحله پایانی، محلول رنگ تهیه شده در دمای اتاق سرد شده و برای جداسازی ذرات ژله‌ای، با فیلتر ۰/۲ میکرومتر، فیلتر می‌شود. برای ارزیابی نمونه، ۱۰ میکرولیتر اسپرم به وسیله 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 اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده)، محاسبه شد (۲۲).

1- Computer Assisted Sperm Analysis 2- Total Motility 3- Progressive Motility 4- Average Path Velocity
5- Straigh Line Velocity 6- Curvi Linear Velocity 7- Lateral Head Displacement 8- Linearity coefficient
9- Beat Cross Frequency of the sperm head 10- Straightness Coefficient

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.33.13.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.33.103]

ارزیابی فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم

فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم، به وسیله آزمایش تورم هایپواسموتیک (HOS)[1] بررسی شد (۲۷). برای ساخت محیط هاس، ۰/۹ گرم فروکتوز و ۰/۴۹ گرم سدیم سیترات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. فشار اسمزی روی ۱۰۰ میلی‌اسمول و pH روی ۸/۰۲ تنظیم شد. به‌طور خلاصه، ۳۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی‌اسمول بر کیلوگرم، مخلوط و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه می‌شود. سپس، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط روی لام ریخته و گسترش تهیه 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.

ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم

برای ارزیابی ریخت شناسی، از محلول هانکوک استفاده شد (۳۲). 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. محلول سالین شامل ۹/۰۱ گرم کلرید سدیم در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر می‌باشد. محلول بافر خود از دو محیط جداگانه تشکیل شده است. محیط نخست شامل ۲۱/۶۸۲ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبدار در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و محیط دوم، از ۲۲/۲۵۴ گرم فسفات پتاسیم در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر، تشکیل شده است. با مخلوط کردن ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط نخست با ۸۰ میلی‌لیتر از محیط دوم، ۲۸۰ میلی‌لیتر محلول بافر تهیه می‌شود. برای ارزیابی ناهنجاری‌های اسپرم سه قطره از هر نمونه اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به میکروتیوپ حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک افزوده می‌شود. سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و لامل گذاری شد و با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. برای محاسبه درصد کل اسپرم‌های غیرطبیعی (غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) تعداد ۲۰۰ اسپرم از هر نمونه مورد بررسی قرار گرفته و شمارش شد.

تعیین میزان آسیب به DNA اسپرم

به‌منظور ارزیابی سلامت کروماتین و DNA اسپرم از کیت SDFA[2] استفاده شد که روش آن به این صورت است که این آزمایش در یک بستر میکرو ژلی تحت تأثیر یک تیمار اسیدی، کروماتین و DNA اسپرم دناتوره می‌شود. در مرحله بعد با حذف پروتئین‌های کروماتین، رشته‌های DNA تا حد ممکن در اطراف سر اسپرم پخش می شوند که طی رنگ آمیزی به‌صورت هاله‌ای در اطراف سر اسپرم قابل مشاهده هستند. این در حالی است که شکست DNA اسپرم منجر به عدم گسترش رشته‌های DNA و نیز عدم مشاهده هاله یا هاله‌های خیلی کوچک در اطراف سر اسپرم می‌شود.

ارزیابی میزان تغییرات مالون‌دی‌آلدئید (MDA)[3] حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای منی به روش TBARS[4]

اندازه‌گیری غلظت MDA با تیوباربیتوریک اسید (TBA) یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدها است. یک مولکول MDA با دو مولکول TBA واکنش می‌دهد و فرآورده این واکنش، مولکولی صورتی رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد. یک میلی‌لیتر از هر نمونه منی با یک میلی‌لیتر EDTA[5]، یک میلی‌لیتر BHT[6] و دو میلی‌لیتر TCA[7]، با هم مخلوط شده و به داخل لوله‌های مخروطی ریخته می‌شوند. لوله مخروطی در ۱۲۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌شوند. پس از سانتریفیوژ شدن، یک میلی‌لیتر از محلول بالای لوله مخروطی با یک میلی‌لیتر TBA در میکروتیوب، آمیخته می‌شود. لوله مخروطی برای مدت ۲۰ دقیقه در صفحه گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرند. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شده سپس جذب نوری آن‌ها در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر (با اسپکتروفتومتر) اندازه‌گیری می‌شود. جذب نوری نمونه‌های مختلف یادداشت شده و در پایان، غلظت MDA (نانومول در میلی‌لیتر) محاسبه می‌شود (۱۲).

آنالیز داده‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت اندازه‌گیری‌های مکرر[8] انجام شد و بعد از تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماریSAS، میانگین تیمارها با آزمون LSMeans مقایسه شد. هر تیمار شش تکرار داشت. داده‌ها به‌صورت انحراف معیار ± میانگین حداقل مربعات بیان شدند و اختلافات در سطح $p<0/05$، معنی‌دار در نظر گرفته شدند. مدل آماری به‌صورت زیر بود:

$$Y_{ijk} = \mu+T_i+ P_j + (T\times P)_{ij} + e_{ijk}$$

که در این مدل Y_{ijk}: بیانگر مشاهده مربوط به اثر i امین تیمار و j امین زمان، μ: بیانگر میانگین جامعه برای صفت موردنظر، T_i: اثر تیمار، P_j: اثر زمان و $(T\times P)_{ij}$: بیانگر برهمکنش اثر تیمار و زمان و e_{ijk}: اثر تصادفی باقیمانده است.

نتایج و بحث

جنبایی اسپرم قوچ در رقیق‌کننده‌های مختلف

جدول ۱، مقادیر به دست آمده از فراسنجه‌های حرکتی و سرعت اسپرم قوچ، توسط نرم‌افزار کامپیوتری آنالیز اسپرم پس از یخ‌گشایی در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که رقیق‌کننده‌های حاوی شیره نارگیل، ازنظر برخی فراسنجه‌های حرکتی شامل VSL، VCL, VAP, ALH با رقیق‌کننده حاوی زرده تخم مرغ، تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p\geq۰/۰۵$). اما از نظر جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم، Lin، STR و BCF، نسبت به رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ، به طور معنی‌داری، کمتر بودند ($p<۰/۰۵$). در بین رقیق کننده‌های حاوی شیره نارگیل، رقیق‌کننده حاوی ۲۰ درصد شیره نارگیل در صفات LIN و STR از سایر رقیق‌کننده‌ها، بهتر بود.

1- Hypo Osmotic Swelling test
2- Sperm DNA Fragmentation Assay
3- Malondialdehyde
4- Thiobarbituric Acid Reactive Substrances
5- Ethylenediaminetetraacetic Acid
6- Butylated hydroxytoluene
7- Trichloroacetic Acid
8- Repeated Measur

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.33.13.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.33.103]

یکپارچگی غشاء، فعالیت غشایی سلول و ریخت‌شناسی

نتایج مربوط به یکپارچگی غشاء، فعالیت غشای سلول و درصد اسپرم هنجار در تیمارهای مختلف در جدول ۲ آورده شده است. نوع تیمار مورد استفاده، زنده‌مانی، فعالیت غشای سلول و درصد اسپرم هنجار را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار نداد ($p\geq ۰/۰۵$). اما زمان نگهداری اسپرم‌ها در شرایط سرد، زنده‌مانی و فعالیت غشای سلول را به‌طور منفی، تحت تأثیر قرار داد ($p<۰/۰۵$).

میزان آسیب به DNA اسپرم و پراکسیداسیون لیپیدها

میزان پراکسیداسیون لیپیدها و درصد اسپرم‌های با DNA سالم، تحت تأثیر نوع رقیق‌کننده قرار نگرفت (جدول ۳). در شکل ۱، نمونه‌ای از اسپرم‌های با DNA سالم و معیوب مشاهده می‌شود.

یکی از عوامل مؤثر در موفقیت تلقیح مصنوعی، داشتن اسپرم باکیفیت خوب است. استفاده از منی سرد شده هنگام عمل تلقیح مصنوعی در مزرعه، عملی‌تر است درحالی‌که استفاده از منی منجمد به ابزارهای گران و تهاجمی برای تلقیح لاپاراسکوپی و کارکنان آموزش دیده نیاز دارد. با این‌حال، گرچه دمای پایین مورد استفاده برای ذخیره اسپرم مایع، طول عمر اسپرم‌ها را افزایش می‌دهد و باعث کاهش متابولیسم سلول می‌شود، اما با افزایش مدت زمان ذخیره‌سازی، کیفیت اسپرم‌ها کاهش می‌یابد. از طرف دیگر، ذخیره‌سازی طولانی مدت اسپرم باعث تغییرات شدید در ساختارهای مورفولوژیکی و عملکردی می‌شود که پتانسیل باروری را مختل می‌کند (۱۵). امروزه، استفاده از رقیق‌کننده‌های گیاهی به‌جای حیوانی در دهه اخیر گسترش زیادی پیدا کرده است. این مطالعه جهت تعیین اثر سطوح مختلف شیره نارگیل در رقیق‌کننده اسپرم قوچ بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از نگهداری در شرایط سرد انجام گرفت.

یکی از مهم‌ترین عواملی که در مرحله نخست، نشان از نگهداری موفق اسپرم دارد، جنبایی آن است. در تحقیق حاضر، جایگزینی شیره نارگیل با زرده تخم‌مرغ، هرچند در فراسنجه‌های VSL، VCL, VAP, ALH، در حد رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ بود ($p\geq ۰/۰۵$)، اما نتوانست اسپرم‌ها را ازنظر جنبایی کل و پیش‌رونده، Lin، STR و BCF، در حد رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ در شرایط سرد طی ۷۲ ساعت، حفظ کند. این یافته‌ها برخلاف نتایج به دست آمده در زمان استفاده از روغن نارگیل (۳۴) و آب نارگیل (۷) بود. استفاده از هشت درصد روغن نارگیل همراه با ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده مبتنی بر تریس، توانسته است کیفیت اسپرم را طی نگهداری در شرایط سرد و ذوب‌شده پس از انجماد را بهتر حفظ کند (۳۴). همچنین مکمل کردن روغن نارگیل (دو درصد) همراه با غلظت ۱/۵ درصد لسیتین سویا، تمام ویژگی‌های کیفی اسپرم پس از نگهداری در شرایط سرد را بهبود داده است (۳۳). علاوه بر این، استفاده از آب نارگیل همراه با ۲/۵ درصد زرده تخم‌مرغ به عنوان یک رقیق‌کننده برای نگهداری اسپرم اسب در شرایط سرد، نتایج خوبی داشته است (۷). اما در تحقیقی، استفاده از آب نارگیل (۲۰ درصد) و شیره نارگیل (۲۰ درصد) به عنوان جایگزینی برای زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده انجمادی اسپرم کرگدن‌ها منجر به از دست دادن تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها شده است (۳۸).

الگوی حرکتی اسپرم، به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی محیطی که در آن قرار دارد بسیار حساس است. فراورده‌های نارگیل در برخی گونه‌ها اثر مثبت و در تعدادی از آن‌ها، اثر منفی بر کیفیت اسپرم پس از نگهداری در شرایط سرد یا پس از انجماد داشته است. از طرفی سازوکار دقیق اثر فراورده‌های نارگیل در رقیق‌کننده برای حفظ ویژگی‌های اسپرم مشخص نشده است. به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها در نتایج گزارش‌شده ناشی از ترکیبات متفاوت فراورده‌ها و مقدار استفاده از آن‌ها، نوع رقیق‌کننده پایه و گونه حیوان باشد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.33.13.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.33.103]

جدول ۱- مقایسه فراسنجه‌های حرکتی و سرعت اسپرم قوچ در تیمارهای مختلف طی نگهداری در شرایط سرد

Table 1. Comparison of motility and velocity parameters of ram sperm in different treatments during cool storage

		فراسنجه								
		PM (%)	TM (%)	Lin (%)	VSL (µm/s)	STR (%)	VCL (µm/s)	VAP (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)
تیمار	Yolk	۵۵/۸۱^{a}	۹۴/۴۴^{a}	۳۷/۷۹^{a}	۸۱/۵۲	۱۰۰/۶۷^{a}	۱۲۷/۴۱	۱۰۵/۵۲	۸/۴۱	۱۱/۸۳^{a}
	Nar-5	۳۰/۰۲^{b}	۷۷/۲۵^{bc}	۲۵/۸۱^{b}	۶۱/۵۹	۶۷/۷۵^{b}	۹۶/۷۶	۷۹/۷۱	۶/۳۶	۵/۷۰^{b}
	Nar-10	۳۳/۱۹^{b}	۷۵/۰۰^{bc}	۲۷/۰۵^{b}	۵۹/۲۴	۷۱/۰۷^{b}	۹۶/۶۵	۷۶/۶۷	۶/۲۱	۵/۷۵^{b}
	Nar-15	۳۵/۵۴^{b}	۷۶/۳۶^{bc}	۲۷/۹۶^{b}	۶۵/۹۱	۷۳/۷۵^{ab}	۱۰۶/۴۳	۸۵/۳۱	۶/۷۵	۵/۹۰^{b}
	Nar-20	۳۵/۷۹^{b}	۷۹/۰۹^{bc}	۳۰/۰۲^{ab}	۷۳/۴۵	۷۹/۱۴^{ab}	۱۱۳/۸۷	۹۵/۰۷	۷/۰۹	۶/۲۴^{b}
	Nar-25	۳۳/۹۶^{b}	۶۲/۷۳^{c}	۲۱/۱۶^{b}	۵۹/۲۴	۷۱/۰۱^{ab}	۹۴/۳۰	۸۶/۹۲	۶/۰۵	۵/۶۳^{b}
SEM		۲/۸۲	۴/۹۳	۲/۱۲	۸/۱۶	۶/۸۹	۱۲/۸۷	۱۱/۰۲	۰/۷۷	۰/۷۴
زمان (ساعت)	۰/۵	۴۲/۱۰^{a}	۸۱/۸۴^{a}	۳۲/۶۷^{a}	۷۵/۱۹^{a}	۸۰/۴۶	۱۲۳/۸۶^{ab}	۹۷/۶۸^{a}	۷/۰۵	۶/۱۵^{b}
	۳	۴۱/۲۵^{a}	۷۷/۰۵^{ab}	۲۷/۲۶^{abc}	۶۶/۲۰^{ab}	۷۰/۳۲	۱۰۸/۲۲^{ab}	۸۶/۰۰^{ab}	۶/۳۶	۵/۷۰^{b}
	۶	۴۱/۹۷^{a}	۸۰/۲۱^{a}	۳۰/۹۶^{ab}	۷۷/۰۵^{a}	۸۱/۷۴	۱۲۶/۶۵^{a}	۱۰۰/۱۰^{a}	۷/۳۶	۶/۷۹^{ab}
	۲۴	۳۷/۰۷^{ab}	۷۶/۷۸^{ab}	۲۶/۹۳^{bc}	۶۵/۷۳^{ab}	۷۴/۶۶	۱۰۲/۱۸^{ab}	۷۸/۲۰^{ab}	۶/۴۳	۷/۰۴^{ab}
	۴۸	۳۲/۸۱^{bc}	۸۰/۵۹^{a}	۲۷/۱۲^{abc}	۶۰/۲۰^{ab}	۸۲/۲۳	۱۱۴/۹۷^{ab}	۸۵/۳۹^{ab}	۷/۴۷	۸/۶۰^{a}
	۷۲	۳۰/۶۷^{d}	۶۹/۵۰^{b}	۲۴/۸۷^{c}	۵۷/۰۶^{b}	۷۳/۹۷	۹۷/۸۴^{b}	۷۴/۱۳^{b}	۶/۱۹	۶/۷۷^{ab}
SEM		۱/۶۷	۳/۱۴	۱/۵۴	۵/۷۲	۴/۷۵	۸/۹۶	۷/۴۳	۰/۴۸	۰/۵۲
	p-value									
	تیمار	۰<۰.۰۰۱	۰<۰.۰۰۲	۰/۰۰۰۲	۰/۳۷۷	۰/۰۱۴۰	۰/۴۱۳۷	۰/۳۷۷۶	۰/۲۷۵۷	۰<۰.۰۰۱
	زمان	۰<۰.۰۰۱	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۰۸	۰/۰۲۱۰	۰/۲۲۶۱	۰/۰۳۳۷	۰/۰۲۱۰	۰/۱۱۱۹	۰/۰۰۴۷
	تیمار× زمان	۰/۶۳۱۴	۰/۲۶۳۹	۰/۵۲۷۰	۰/۷۲۵۴	۰/۳۰۴۷	۰/۴۶۷۵	۰/۷۲۵۴	۰/۳۵۱۴	۰/۶۳۷۴

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Nar-5، Nar-10، Nar-15، Nar-20 و Nar-25: به ترتیب، مقدار پنج، ده، پانزده، بیست و بیست‌وپنج درصد شیره نارگیل در رقیق‌کننده است. در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های بدون حرف، معنی‌دار نبوده است (p≥۰/۰۵).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.33.13.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.33.103]

جدول ۲- مقایسه فراسنجه‌های زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی و ریخت‌شناسی اسپرم قوچ در تیمارهای مختلف

Table 2. Comparison of viability, membrane integrity and morphology parameters of ram sperm in different treatments

		فراسنجه		
		Hanck (%)	Host (%)	Live (%)
تیمار	Yolk	۸۷/۱۶	۷۲/۳۸	۸۹/۰۷
	Nar-5	۹۳/۳۷	۷۱/۶۳	۸۴/۸۲
	Nar-10	۹۳/۸۰	۶۸/۸۶	۸۴/۴۳
	Nar-15	۹۰/۳۸	۶۸/۰۴	۸۶/۱۲
	Nar-20	۸۳/۳۶	۶۴/۲۹	۸۸/۶۵
	Nar-25	۸۸/۸۷	۶۴/۱۲	۸۶/۹۴
SEM		۳/۴۱	۳/۰۰	۱/۶۶
زمان (ساعت)	۰/۵	۹۱/۹۲	$۷۳/۳۰^{a}$	$۹۲/۶۶^{a}$
	۳	۹۱/۱۲	$۷۱/۸۵^{a}$	$۹۰/۴۱^{a}$
	۶	۸۸/۹۸	$۷۰/۲۲^{a}$	$۸۷/۳۹^{b}$
	۲۴	۸۷/۸۸	$۶۸/۱۹^{ab}$	$۸۳/۲۹^{c}$
	۴۸	۹۱/۳۰	$۶۴/۷۳^{bc}$	$۸۳/۶۸^{c}$
	۷۲	۸۵/۷۳	$۶۱/۰۴^{c}$	$۸۲/۶۱^{c}$
SEM		۱/۹۷	۱/۳۶	۰/۹۵
p-value				
تیمار		۰/۲۸	۰/۳۰	۰/۳۱
زمان		۰/۵۵	۰<.۰۱	۰<.۰۱
تیمار× زمان		۰/۵۳	۰/۲۸	۰/۲۷

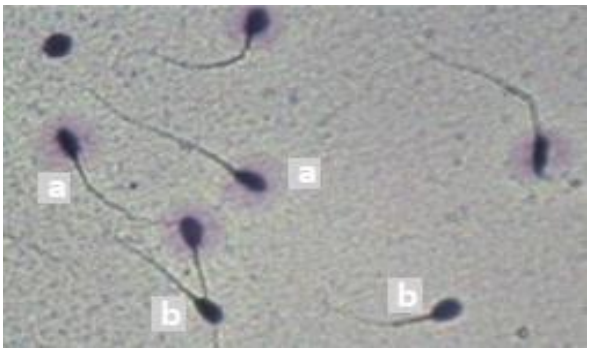
Yolk: زرده تخم‌مرغ، Nar-5، Nar-10، Nar-15، Nar-20 و Nar-25: به ترتیب، مقدار پنج، ده، پانزده، بیست و بیست‌وپنج درصد شیره نارگیل در رقیق‌کننده است. در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های بدون حرف، معنی‌دار نبوده است (p≥۰/۰۵).

جدول ۳- مقایسه میزان پراکسیداسیون لیپید و وضعیت DNA در تیمارهای مختلف طی نگهداری در شرایط سرد

Table 3. Comparison of lipid peroxidation and DNA characteristic in different treatments during cool storage

فراسنجه	تیمار						SEM
	Yolk	Nar-5	Nar-10	Nar-15	Nar-20	Nar-25	
(nMol/ml) MDA	۲/۷۹	۲/۱۰	۱/۹۳	۲/۰۳	۲/۹۲	۲/۰۴	۰/۴۲
اسپرم با DNA سالم (٪)	۸۶/۲۷	۹۱/۷۸	۸۳/۵۲	۹۲/۶۵	۹۴/۵۱	۸۸/۰۴	۴/۶۵

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Nar-5، Nar-10، Nar-15، Nar-20 و Nar-25: به ترتیب، مقدار پنج، ده، پانزده، بیست و بیست‌وپنج درصد شیره نارگیل در رقیق‌کننده است.



شکل ۱- نمونه‌ای از اسپرم‌های با DNA سالم (a) و معیوب (b) در تحقیق حاضر را نشان می‌دهد.

Figure 1. Examples of sperm with healthy (a) and fragmented (b) DNA in the current study

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-20]

[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.33.13.8]

[DOI: 10.52547/rap.12.33.103]

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول مهم است زیرا تبادلات متابولیکی با محیط اطراف را کنترل می‌کند. همچنین، فعال بودن غشای پلاسمایی در فرآیندهای ظرفیت‌دار شدن، واکنش آکروزومی و نفوذ به اووسیت، نیاز است (۱۷). در تحقیق حاضر، نوع رقیق‌کننده مورد استفاده، زنده‌مانی، فعالیت غشای سلول و ریخت‌شناسی اسپرم را تحت تأثیر قرار نداد ($p\geq$۰/۰۵) که نشان‌دهنده آن است که رقیق‌کننده‌های حاوی شیره نارگیل توانسته‌اند همانند زرده تخم‌مرغ، زنده‌مانی، فعالیت غشای سلول و ریخت اسپرم را طی نگهداری در شرایط سرد، حفظ کنند. شیر نارگیل حاوی مواد تشکیل‌دهنده اساسی مورد نیاز برای زنده ماندن اسپرم در طی نگهداری است. شیر نارگیل حاوی کربوهیدرات به عنوان منبع قند است (۲۳). مشخص شده است که قند پتانسیل اسمزی سلول‌ها را افزایش می‌دهد و از غشا در برابر آسیب ناشی از سرما محافظت می‌کند (۲۶). شیره نارگیل حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) شناخته شده است که به سیالیت و انعطاف‌پذیری غشا کمک می‌کند (۳۷). اثر محافظتی شیره نارگیل همچنین می‌تواند به پروتئین‌های اصلی آن ازجمله اسیدهای آمینه ضروری مربوط شود که نقش مهمی در یکپارچگی غشای سلول دارند (۳۹).

در مطالعه‌ای، اثر شیره نارگیل (۱۵ و ۲۰ درصد) به‌تنهایی یا همراه با پیریدوکسین (۸ میلی‌مول) در رقیق‌کننده تریس بر اسپرم بز طی انجماد موجب افزایش معنی‌دار زنده‌مانی اسپرم، کاهش در اسپرم‌های غیرطبیعی و همچنین کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدئید در رقیق‌کننده نسبت به گروه شاهد شد (۱۰). استفاده از رقیق‌کننده حاوی آب پودر نارگیل، ویژگی‌های ریخت‌شناسی و تحرک اسپرم را پس از انجماد، به نحو مطلوبی حفظ کرده است (۸). ولی استفاده از رقیق‌کننده حاوی شیره نارگیل و آب نارگیل نسبت به لسیتین سویا (یک و دو درصد)، پتانسیل کمتری را به عنوان جایگزین زرده تخم‌مرغ برای زنده‌مانی اسپرم، مورفولوژی و سلامت آکروزوم نشان داده‌اند (۳۸). ترکیب غشای اسپرم در گونه‌های مختلف متفاوت است که تا حدی، تحمل اسپرم به سرما را دیکته می‌کند و ممکن است بر پاسخ سلول به رقیق‌کننده‌ها تأثیر بگذارد (۲۱).

سامانه محدود محافظت آنتی‌اکسیدانی ذاتی منی، پس از رقیق‌سازی و سردسازی، تضعیف می‌شود (۵). اسپرم‌ها، به‌ویژه اسپرم قوچ، به دلیل محتوای بالای اسیدهای چرب اشباع‌نشده با چند پیوند دوگانه در غشای پلاسما، در برابر تنش اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر هستند (۳) و عدم تعادل بین تولید و حذف گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) منجر به ضعف فراسنجه‌های حرکتی اسپرم می‌شود (۱۸). همچنین تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد باعث عملکرد معیوب اسپرم مانند تخریب یکپارچگی DNA اسپرم (۲)، پتانسیل غشای میتوکندری، واکنش آکروزوم و توانایی ضعیف در نفوذ به تخمک می‌شود (۴۰). آسیب DNA اسپرم، بر کیفیت رویان و درنتیجه بر نرخ آبستنی تأثیر منفی دارد (۱۳). همچنین غلظت‌های بالاتر MDA، میزان بیشتری از آسیب اکسیداتیو به اسپرم را منعکس می‌کند (۱۱). در این آزمایش، میزان تولید MDA و نرخ قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم‌ها، تحت تأثیر نوع رقیق‌کننده قرار نگرفت. این نشان‌دهنده توان یکسان این شش رقیق‌کننده در حفظ سلامت DNA اسپرم طی نگهداری در شرایط سرد است. این نتایج در توافق با تحقیقات قبلی روی اسپرم قوچ (۱۵،۲۰) است که گزارش کرده‌اند که طی نگهداری اسپرم، برخلاف جنبایی اسپرم، یکنواختی DNA اسپرم تحت تأثیر نوع رقیق‌کننده قرار نگرفته است. برعکس، افزایش تدریجی و قابل توجهی در شاخص قطعه قطعه شدن DNA (DFI٪) هنگامی‌که اسپرم قوچ در ۴ درجه سانتی‌گراد در رقیق‌کننده مبتنی بر لسیتین سویا (۱۹) یا در زرده تخم‌مرغ (۱۶) ذخیره شده، گزارش‌شده است.

در تحقیق حاضر با توجه به اینکه میزان تولید MDA و نرخ قطعه قطعه شدن DNA اسپرم‌ها، در رقیق‌کننده‌های حاوی شیره نارگیل مشابه رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ بود و از طرفی رقیق‌کننده‌های حاوی شیره نارگیل نتوانستند اسپرم‌ها را ازنظر جنبایی کل و پیش‌رونده، Lin، STR و BCF، در حد رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ در شرایط سرد طی ۷۲ ساعت، حفظ کنند، این مؤید آن است که افت فراسنجه‌های حرکتی در رقیق‌کننده‌های حاوی شیره نارگیل، نمی‌تواند به دلیل تنش اکسیداتیو باشد. سازوکارهایی که منجر به افت کیفیت منی مایع ذخیره شده می‌شوند نمی‌توانند فقط به تنش اکسیداتیو مرتبط باشند بلکه عوامل دیگر باید در نظر گرفته و بررسی شوند. شناخت بهتر این سازوکارها به طراحی استراتژی‌های تولیدمثل برای حفظ توانایی باروری منی ذخیره شده، کمک زیادی می‌کند (۱۵).

در کل، نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از شیره نارگیل به جای زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده اسپرم قوچ، جهت نگهداری اسپرم در شرایط سرد، نتوانست فراسنجه‌های حرکتی اسپرم را در حد زرده حفظ نماید و جایگزین مناسبی برای زرده در رقیق‌کننده اسپرم قوچ نبود.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.33.13.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.33.103]

منابع

1. Ahmadi Hamedani, M., Y. Jafari Ahangari and S. Zerehdaran. 2015. The effect of various levels of egg yolk on quality of Zel ram spermatozoa in cooling and freezing conditions. Research On Animal Production, 5: 122-134 (In Persian).
2. Aitken, R.J., G.N. De Iuliis, J.M. Finnie, A. Hedges and R.I. McLachlan. 2010. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. Human Reproduction, 25: 2415-24.
3. Allai, L., X. Druart, M. Öztürk, A. BenMoula, B. Nasser and B. El Amiri. 2016. Protective effects of Opuntia ficus-indica extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. Animal Reproduction Science, 175: 1-9.
4. Barbas, J. and R. Mascarenhas. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell and tissue banking, 10: 49-62.
5. Bilodeau, J.F., S. Chatterjee, M.A. Sirard and C. Gagnon. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 55: 282-288.
6. Bottini-Luzardo, M., F. Centurión-Castro, M. Alfaro-Gamboa, R. Aké-López and J. Herrera-Camacho. 2012. Effect of addition of coconut water (Cocos nucifera) to the freezing media on post-thaw viability of boar sperm. Tropical animal health and production, 45: 101-106.
7. Brasileiro, L.S., L.G.T.M. Segabinazzi, E. Menezes, C.C. Salgueiro, G. Novello, V.F. da Cunha Scheeren, M., A. Alvarenga and J.F. Nunes. 2019. Coconut water as an extender component for cooled equine sperm. Journal of Equine Veterinary Science, 78: 69-73.
8. Cardoso, R., A. Silva and L. Silva. 2005. Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa. Anim Reprod, 2: 257-262.
9. Cordeiro, M., E. Silva, M. Miranda, F. Biondi, S. Santos and O. Ohashi. 2006. The use of coconut water solution (Cocos nucifera) as a holding medium for immature bovine oocytes for in vitro embryo production. Animal Reproduction, 3: 376-379.
10. Daramola, J., E. Adekunle, O. Iyasere, O. Oke, T. Sorongbe, O. Iyanda, A. Kehinde, S. Aluko, I. Olaoye and O. Gbadebo. 2016. Effects of coconut milk alone or supplementation with pyridoxine in tris-extenders on viability of buck spermatozoa during vitrification. Small Ruminant Research, 136: 208-213.
11. Das, P., A. Choudhari, A. Singh and R. Singh. 2009. Correlation among routine semen parameters, sperm viabilty and malondialdehyde levels in human subjects with different fertility potential. *Indian* Journal of Physiology and Pharmacology, 53: 253-258.
12. Esterbauer, H. and K.H. Cheeseman. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in Enzymology, 186: 407-421.
13. Evenson, D.P. 2016. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. Animal Reproduction Science, 169: 56-75.
14. Fair, S., J. Hanrahan, A. Donovan, P. Duffy, C. O'Meara, P. Lonergan and A. Evans. 2007. Hormonal relationships during the periovulatory period among ewe breeds known to differ in fertility after cervical artificial insemination with frozen thawed semen. Animal Reproduction Science, 97: 284-294.
15. Falchi, L., G. Galleri, M. Zedda, S. Pau, L. Bogliolo, F. Ariu and S. Ledda. 2018. Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. Livestock Science, 207: 1-6.
16. Gundogan, M., D. Yeni, F. Avdatek and A. Fidan. 2010. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. Animal Reproduction Science, 122: 200-207.
17. Jeyendran, R., H. Van der Ven, M. Perez-Pelaez, B. Crabo and L. Zaneveld. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. Journal of Reproduction and Fertility, 70: 219-228.
18. Kasimanickam, R., V. Kasimanickam, C. Thatcher, R. Nebel and B. Cassell. 2007. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. Theriogenology, 67: 1004-1012.
19. Kasimanickam, R., V. Kasimanickam, A. Tibary and K. Pelzer. 2011. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 C. Small Ruminant Research, 99: 208-213.
20. Khalifa, T. and A. Lymberopoulos. 2013. Changeability of sperm chromatin structure during liquid storage of ovine semen in milk-egg yolk-and soybean lecithin-based extenders and their relationships to field-fertility. Cell and Tissue Banking, 14: 687-698.
21. Layek, S ,.T. Mohanty, A. Kumaresan and J. Parks. 2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. Animal Reproduction Science, 172: 1-9.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.33.13.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.33.103]

22. Mohammadi, P., S. Tabatabaei Vakili, M. Mamouei, J. Fayazi and M. Zarei. 2016 .Evaluation of the effect of different concentrations of vitamin E and Selenium in Tris extender e on sperm quality of Arabic ram. Research on Animal Production, 7: 99-93 (In Persian).
23. Okolie, P., C. Obi and P. Uaboi-Egbenni. 2011. Fungal spoilage of coconut (Cocos nucifera L.) fruits during storage and the growth differential of isolates on selected amino acids and carbohydrates. Pakistan Journal of Nutrition, 10: 965-973.
24. Oliveira, R., J. Nunes, C. Salgueiro, J. Cavalcante, O. Brasil and A. Moura. 2011. Evaluation of goat spermatozoa frozen in media based on powder coconut water media based (ACP-101®) or TRIS. *Arquivo B*rasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 63: 1295-1302.
25. Phillips, P.H. 1939. Preservation of bull semen. Journal of biological chemistry, 130: 415-415.
26. Purdy, P. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research, 63: 215-225.
27. Revell, S. and R. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science, 36: 77-86.
28. Salamon, S. and W. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Animal Reproduction Science, 37: 185-249.
29. Salamon, S. and W. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science, 62: 77-111.
30. Salgueiro, C., J. Nunes, K. Oliveira, V. Vieira, J. Gondim and E. Mateos-Rex. 2002. Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó, na inseminação artificial programada de cabras. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 1: 96-98.
31. Sampaio Neto, J., C. Salgueiro, E. Mateos-Rex and J. Nunes. 2002. Utilização do diluente ACP-105® na refrigeração do sêmen equino. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 5: 137-139.
32. Schäfer, S. and A. Holzmann. 2000 .The use of transmigration and Spermac™ stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. Animal Reproduction Science, 59: 201-211.
33. Tarig, A., H. Wahid, Y. Rosnina, N. Yimer, Y. Goh, F. Baiee, A. Khumran, H. Salman, M. Assi and M. Ebrahimi. 2017. Effect of different concentrations of soybean lecithin and virgin coconut oil in Tris-based extender on the quality of chilled and frozen-thawed bull semen, Veterinary World, 10(6): 672-678. Abstract.
34. Tarig, A., H. Wahid, Y. Rosnina, N. Yimer, Y. Goh, F. Baiee, A. Khumran, H. Salman and M. Ebrahimi. 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.
35. Tonieto, R., K. Goularte, G.D.A. Gastal, R.S. Schiavon, J.C. Deschamps and T. Lucia. 2010. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. Small Ruminant Research, 93: 206-209.
36. Vasconcelos, A.B., A.M.C. Santos, J.S. Oliveira, M. de Albuquerque Lagares and M.M. Santoro. 2009. Purification and partial characterization of proteinase inhibitors of equine seminal plasma. Reproductive Biology, 9: 151-160.
37. Wassall, S.R. and W. Stillwell. 2009. Polyunsaturated fatty acid–cholesterol interactions: domain formation in membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1788: 24-32.
38. Wojtusik, J., M. A. Stoops and T.L. Roth. 2018. Comparison of soy lecithin, coconut water, and coconut milk as substitutes for egg-yolk in semen cryodiluent for black rhinoceros (Diceros bicornis) and Indian rhinoceros (Rhinoceros unicornis). Theriogenology, 121: 72-77.
39. Yong, J.W., L. Ge, Y.F. Ng and S.N. Tan. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. Molecules, 14: 5144-5164.
40. Zabludovsky, N., F. Eltes, E. Geva, E. Berkovitz, A. Amit, Y. Barak, D. Har-Even and B. Bartoov. 1999. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. Andrologia, 31: 91-98.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.33.13.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.33.103]

The Effect of Coconut Milk in Extender on the Durability of Ram Sperm in Cool Conditions

Somayeh Mirzapour[1], Seyed Mojtaba Mousavi[2] and Majid Khaldari[3]

1- Graduated M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University
2- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, (Corresponding author: mousavi.sym@lu.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University
Received: February 24, 2021 Accepted: August 14, 2021

Abstract

Long-term storage of liquid sperm causes changes in the morphological structures and sperm function. This study was performed to determine the effect of different levels of coconut milk in ram sperm extender on sperm quality parameters after storage in cool conditions. Sperm were collected twice a week from three adult Lori rams using an artificial vagina. After collection and initial evaluation of the samples, the selected ejaculates were mixed and the mixed semen was divided into six equal parts and each part was diluted in a ratio of one to 20, with different diluents. Six extenders were prepared by adding different levels of coconut milk (5, 10, 15 and 20% (volume/volume) and egg yolk (15% (volume/volume)) to the Tris base extender. Diluted semen was stored at 5 ° C for 72 h. The samples at 0, 3, 6, 24, 48, and 72 h were evaluated for sperm motility parameters (computer analysis system) viability (Eosin nigrosin staining), morphology (Hancock), membrane integrity (HOST), lipid peroxidation rate, and sperm DNA fragmentation rate. The experiment was performed in a completely randomized design and the data analysis was performed using SAS statistical software. The results showed that extenders containing coconut milk in terms of some motility parameters including VSL, ALH, VAP, VCL were not significantly different from extender containing egg yolk ($p\geq0.05$). But in terms of total and progressive sperm, Lin, STR, and BCF were significantly lower than extender containing egg yolk ($p<0.05$). Survival, cell membrane activity, and normal sperm percentage were similar in all treatments ($p\geq0.05$). Also, the rate of lipid peroxidation and the percentage of sperm with damaged DNA were not affected by the type of extender. In general, the results of this study showed that the use of coconut milk in ram sperm extender to preserve sperm in cold conditions, could not maintain sperm motility parameters as much as the yolk and it was not a suitable substitute for yolk in ram sperm extender.

Keywords: Artificial insemination, Motility parameters, Semen preservation, Sperm collection

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.33.13.8]
[DOI: 10.52547/rap.12.33.103]