



Effect of ultracentrifuge and ultrasonic treatment of egg yolk before extender supplementation on ram semen quality and fertility outcome after storage at 4°C

A. Molaiy¹, A. Farahavar^{1*}, M. Yavari²

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

(Received: 11-03-2025 – Revised: 23-04-2025 – Accepted: 26-04-2025 – Available online: 08-05-2025)

Abstract

Introduction: Egg yolk is an economical option for farm animal semen extenders. However, there are some potential disadvantages and concerns associated with whole egg yolk use as a component in extender media. Preparation of clarified egg yolk by high-speed centrifugation or probe ultrasonic treatment of egg yolk are novel, low-cost, fast, safe, and effective method in providing high-quality extenders for semen preservation. Ultracentrifuge and ultrasonic technology are mechanical methods used for separating and dispersing low-density lipoproteins (LDL), the primary protective component of egg yolk. Each method has its advantages and disadvantages, and as with any novel technique, it is essential to thoroughly evaluate and optimize the ultrasonic technology before using it for extender treatment. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of ultracentrifuge and ultrasonic treatment of egg yolk before extender supplementation on the ram semen quality and fertility outcome after storage at 4°C for 72 hours.

Materials and methods: This study was conducted in a completely randomized block design with three treatments and six replicates. The treatments included: 1) Whole egg yolk (WEY as control), 2) Clarified egg yolk (CEY) prepared by high-speed centrifuge at 25000 g for 60 minutes, and 3) Ultrasonicated egg yolk (SEY) with 50% power (500 W) for 10 minutes. In the breeding season, semen samples of three fertility-proven Mehraban rams (live body weight of 76.37 kg, age of 3-4 years, and BCS of 3.5-4) were collected by artificial vagina once a week, over six consecutive weeks (as an experimental block). Collected ejaculates were passed the minimum quality requirements before dilution. Ejaculates of rams in each week were mixed and divided equally into three parts and diluted up to the concentration of 200×10^6 spermatozoa/mL and stored at 4°C for 72 hours. Semen qualitative parameters were evaluated every 24 hours. Sperm viability, membrane integrity, and motility parameters were determined by eosin-nigrosin staining, the hypo-osmotic swelling test (HOST), and computer-assisted sperm analysis (CASA), respectively. In addition, a total of 42 non-pregnant Mehraban ewes, aged 2-4 years, with almost the same body weight and score, were used for the detection of fertility performance. The ewes' estrous cycle was synchronized by flurogestone acetate-loaded sponges and eCG (500 IU), and they were subjected to laparoscopic artificial insemination (LAI) 54 h after sponge removal, and the semen sample of each treatment was deposited into the uterine horns bilaterally. The pregnancy rate was detected by ultrasound scanning on d-45 after LAI.

Results and discussion: Semen storage for 72 hours in extenders containing ultrasonic and ultracentrifuged egg yolk (CEY and SEY treatments) significantly showed higher sperm membrane integrity compared to the WEY ($P < 0.05$). Total motility in the CEY treatment ($P = 0.0807$) and progressively motile spermatozoa in the SEY treatment ($P = 0.0897$) tended to increase. Stored semen in the SEY extender showed significantly higher progressively motile spermatozoa compared to the WEY (control), 24 hours after storage ($P < 0.05$). In addition,

* Corresponding author: A.farahavar@basu.ac.ir



the amplitude of lateral head displacement ($P=0.07$) and linearity ($P=0.09$) tended to increase 24 hours after storage. The highest level of sperm membrane integrity, 48 hours after storage, and the highest viability and total motility, 72 hours after storage, were related to the SEY treatment ($P<0.05$). The progressive motility ($P=0.10$) and linear velocity ($P=0.07$) tended to increase 72 hours after sperm storage in the CEY treatment. Other parameters, as well as the fertility outcome after laparoscopic artificial insemination, were not affected by the treatments. Very few studies have been conducted on the storage of ram semen with a diluent containing ultrasonicated or ultracentrifuged egg yolk at 4°C. Most of the studies reported the effect of a diluent containing ultrasonicated or ultracentrifuged egg yolk after the freeze-thaw process. Consistent with the findings of this study, a study showed that total motility, progressive motility, and membrane integrity of sperm after freeze-thawing of dog sperm in a diluent containing ultrasonicated egg yolk were better preserved than in a diluent containing ultracentrifuged egg yolk. In contrast, another study showed that sperm motility parameters and membrane integrity of pig sperm after freeze-thawing were improved only in a diluent containing centrifuged egg yolk, which is contrary to this finding of this study. Consistent with the findings of this study, it has been shown that freezing of donkey semen in diluents containing ultrasonicated egg yolk with different ultrasonic intensities and durations increased total and progressive motility, curvilinear line velocity, average path velocity, and straight-line velocity after thawing. It could be deduced from our results that during the centrifugation process, some constituents of egg yolk that could be detrimental to sperm cells were pelleted, leaving only LDL molecules in the extender, which had good results in the kinematic parameters. Ultrasonic treatment of egg yolk improves the dispersion of egg yolk components in the extender media, and can improve the extender's ability to protect sperm during chilled semen storage, resulting in increased sperm survival and viability. The sperm plasma membrane is the structure that is mainly injured during semen preservation. The storage temperature at 4°C causes the membrane to move into a gel phase, increasing the loss of lipids that are part of the cell structure, causing a loss in membrane integrity. The results of the present study revealed that ultrasonic and ultracentrifuge treatment of egg yolk were more efficient in maintaining the sperm plasma membrane integrity than the whole egg yolk, probably due to higher surface reactivity and a probable increase in the interaction capacity of egg yolk components due to ultrasonic and ultracentrifuge treatment. In this study, the fertility outcome was not affected by treatments. The reason for this could be related to the artificial insemination method and the time of storage of the inseminated semen. The quality of stored semen decreases over time of storage, but the insemination technique used in this study could compensate for this decline in sperm quality.

Conclusions: Ultrasonic and ultracentrifugation processing of egg yolk with a change in its functional characteristics exert a positive effect on membrane integrity and some sperm motility characteristics, and can be used as a suitable approach to improve sperm preservation for artificial insemination.

Keywords: Ultracentrifuge, Ultrasonification, Fertility, Egg yolk, Ram

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 Bu-Ali Sina 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 work.

How to cite this article:

Molaiy, A., Farahavar, A., & Yavari, M. (2025). Effect of ultracentrifuge and ultrasonic treatment of egg yolk before extender supplementation on ram semen quality and fertility outcome after storage at 4°C. *Animal Production Research*, 14(4), 33-45. doi: 10.22124/ar.2025.30074.1888



اثر اولتراسونیک و یا اولتراسانتریفیوژ نمودن زرده تخم مرغ قبل از اضافه نمودن آن به رقیق کننده، بر کیفیت و قابلیت باروری منی قوچ پس از ذخیره سازی در دمای ۴°C

علی مولایی^۱، عباس فرح آوری^{۱*}، مرتضی یآوری^۲

۱- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۱ - تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۰۶ - تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۴/۰۲/۱۸)

چکیده

هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر اولتراسونیک و یا اولتراسانتریفیوژ نمودن زرده تخم مرغ قبل از اضافه نمودن آن به رقیق کننده بر کیفیت و قابلیت باروری منی قوچ پس از ذخیره سازی در دمای ۴°C بود. تیمارهای آزمایشی شامل زرده کامل تخم مرغ (WEY)، زرده اولتراسونیک شده (SEY) و زرده اولتراسانتریفیوژ شده (CEY) بود که در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تیمار و شش تکرار انجام شد. در فصل تولیدمثلی، منی اخذ شده از سه رأس قوچ نژاد مهربان با هم مخلوط شده و پس از رقیق سازی با رقیق کننده ها، نمونه ها در دمای ۴°C تا ۷۲ ساعت نگهداری شد. زنده ماننی با رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین، یکپارچگی غشاء با آزمون تورم هیپواسمتیک و فراسنجه های جنبایی به وسیله کاسا در هر ۲۴ ساعت ارزیابی شد. همچنین، میش های همزمان سازی شده با منی تیمارهای مربوطه به روش لاپاراسکوپیی تلقیح شده و میزان آبستنی در ۴۵ روزگی تعیین شد. سلامت غشاء اسپرم در تیمار CEY و SEY به طور معنی داری نسبت به WEY بیشتر بود ($P < 0.05$). جنبایی کل در تیمار CEY ($P = 0.0807$) و جنبایی پیش رونده در تیمار SEY ($P = 0.0897$) گرایش به افزایش داشت. پس از ۲۴ ساعت، جنبایی پیش رونده در تیمار SEY به طور معنی داری بیشتر از WEY بود ($P < 0.05$) و دامنه نوسانات حرکت اسپرم ها (ALH) و خطی بودن حرکت اسپرم ها (LIN) نیز گرایش به افزایش داشت. بیشترین میزان سلامت غشاء اسپرم پس از ۴۸ ساعت و بیشترین میزان زنده ماننی و جنبایی کل پس از ۷۲ ساعت، مربوط به تیمار SEY بود ($P < 0.05$). همچنین، پس از ۷۲ ساعت، جنبایی پیش رونده و سرعت حرکت اسپرم روی خط مستقیم (VSL) در تیمار CEY نسبت به تیمار شاهد گرایش به افزایش داشت. میزان باروری تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت. به طور کلی، عمل آوری اولتراسونیک و اولتراسانتریفیوژ زرده تخم مرغ با تأثیر مثبت بر سلامت غشاء و برخی ویژگی های جنبایی اسپرم می تواند به عنوان راهکاری مناسب جهت بهبود نگهداری اسپرم برای تلقیح مصنوعی گوسفند باشد.

واژه های کلیدی: اولتراسانتریفیوژ، اولتراسونیکاسیون، باروری، زرده تخم مرغ، قوچ

* نویسنده مسئول: A.farahavar@basu.ac.ir

مقدمه

امروزه، ذخیره‌سازی سرد و منجمد مایع منی در حیوانات مزرعه‌ای و به دنبال آن تلقیح مصنوعی، اهمیت زیادی برای بهبود عملکرد تولیدمثلی و پیشرفت ژنتیکی دارد، اما آسیبی که طی فرآیند ذخیره‌سازی به ساختمان اسپرم وارد می‌شود منجر به کاهش باروری اسپرم می‌شود. نوع رقیق‌کننده نقش مهمی در جلوگیری از وارد آمدن آسیب به سلول‌های اسپرم دارد (Bustani & Baiee, 2021). غیر از رقیق‌کننده‌های تجاری که فرمولاسیون ترکیبات برخی از آنها نامشخص است، در بیشتر رقیق‌کننده‌های با فرمول باز، از زرده تخم‌مرغ (۵ تا ۲۰ درصد) به‌عنوان محافظت‌کننده در برابر شوک سرمایی استفاده می‌شود. لیبیوپروتئین با چگالی کم (LDL) جزء بسیار موثر زرده تخم‌مرغ در حفاظت از اسپرم هنگام ذخیره‌سازی است (Watson & Martin, 1975; Amirat et al., 2004a). با این وجود، فراهمی LDL موجود در زرده کامل تخم‌مرغ برای سلول‌های اسپرم پائین بوده و علاوه بر آن، ذرات درشت زرده تخم‌مرغ، قابلیت انحلال پایین آن و وجود ذراتی غیر از زرده که باعث آسیب به تنفس سلولی و کاهش باروری می‌شود، از جمله مشکلات استفاده از زرده تخم‌مرغ کامل در رقیق‌کننده‌های بر پایه زرده تخم‌مرغ است (Watson & Martin, 1975).

فناوری اولتراسونیک در صنایع مختلف به‌عنوان یک روش امولسیون‌سازی کم هزینه، سریع، ایمن و قابل اعتماد برای محصولات گیاهی و حیوانی مورد استفاده قرار گرفته است. این فناوری از نیروهای ضربه‌ای با شکستن حباب‌ها در نزدیکی سطح مایع استفاده می‌کند که منجر به ترکیب کامل مواد نامحلول می‌شود (Xie et al., 2020). گزارش شده است که بعد از اولتراسونیک نمودن زرده تخم‌مرغ، خواص ژلی و امولسیونی زرده، پتانسیل زتا (بار الکتریکی سطح) ذرات و سولفیدریل آزاد پروتئین‌های زرده افزایش پیدا می‌کند و باعث تغییر ویژگی‌های محلول نهایی زرده می‌شود که در نهایت می‌تواند بر خواص عملکردی زرده تخم‌مرغ موثر باشد (Xie et al., 2020). اولتراسونیک کردن پلاسماهای زرده تخم‌مرغ و کوچک کردن اندازه ذرات آن، یک راه آسان برای دستیابی به LDL برای استفاده از آن در رقیق‌کننده مایع منی حیوانات مزرعه‌ای است (da Silva et al., 2022). نتایج مطالعه Zhang et al. (2018) نشان داد

که تهیه رقیق‌کننده با غلظت یک درصد زرده تخم‌مرغ و شدت اولتراسونیک ۴۰۰ وات به‌مدت ۲۰ دقیقه، فراسنجه-های حرکتی اسپرم‌های منی نریان را پس از ۹۶ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس و همچنین، پس از فرآیند انجماد-ذوب بهبود می‌بخشد. همچنین، نشان داده شده است که اولتراسونیک کردن پلاسماهای زرده تخم‌مرغ، تشکیل نانوذرات LDL را افزایش می‌دهد و به‌طور موثری می‌تواند از سلول اسپرم هنگام انجماد محافظت کند (Silva et al., 2022).

در مطالعات پیشین از اولتراسانتریفیوژ برای جداسازی موفقیت‌آمیز LDL زرده تخم‌مرغ و حذف برخی از ترکیبات مضر زرده برای حفاظت اسپرم گونه‌های مختلف حیوانی استفاده شده است (de Brito et al., 2021; Samadian et al., 2024). برخی از مطالعات نشان داده‌اند که اولتراسانتریفیوژ کردن زرده تخم‌مرغ نسبت به اولتراسونیکاسیون بهتر می‌تواند منجر به حفظ سلامت غشاء سلول اسپرم و غشاء میتوکندری اسپرم پس از فرآیند انجماد شود (de Brito et al., 2021). مروری بر مطالعات پیشین نشان داد که نتایج تاثیر اولتراسانتریفیوژ و یا اولتراسونیک نمودن زرده تخم‌مرغ افزوده شده به رقیق‌کننده ضد و نقیض است و به‌نظر می‌رسد که نوع رقیق‌کننده پایه، گونه حیوانی، مدت زمان و شدت اولتراسونیک باعث ایجاد این تناقض می‌شود و نیازمند تحقیقات بیشتری است. علاوه بر آن، بیشتر مطالعات قبلی تاثیر عمل‌آوری زرده تخم‌مرغ افزوده شده به رقیق‌کننده را در شرایط آزمایشگاهی بررسی نموده‌اند و داده‌های باروری در دام زنده بسیار اندک است. بنابراین، هدف از این تحقیق، بررسی اثر اولتراسونیکاسیون و اولتراسانتریفیوژ کردن زرده تخم‌مرغ و بررسی اثر آن بر کیفیت اسپرم قوچ پس از ذخیره‌سازی به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس بود.

مواد و روش‌ها

زمان و محل آزمایش و تیمارهای آزمایشی: این پژوهش از شهریور تا دی ماه در مزرعه آموزشی-تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان انجام شد. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تیمار و شش تکرار بود. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- زرده کامل (WEY)، ۲- زرده اولتراسانتریفیوژ شده با سرعت ۲۵۰۰۰ g

لوله فالکون ریخته شد و در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شد.

تهیه رقیق‌کننده حاوی زرده *اولتراسونیک* شده (SEY): برای این منظور، ابتدا میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر زرده کامل تخم‌مرغ با ۷۵۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر استریل مخلوط شد. پس از ۲۰ دقیقه تکان دادن، ترکیب حاصل با دستگاه اولتراسونیک میله‌ای (Bandelin electronic, Germany) دارای قطر ۳ سانتی‌متر و قدرت ۵۰۰ وات (۵۰ درصد) به مدت ۱۰ دقیقه اولتراسونیک شد (de Brito et al., 2021). شایان ذکر است که طی فرآیند اولتراسونیک، ترکیب زرده و آب درون یک ظرف حاوی یخ قرار داده شد تا گرمای اضافی ایجاد شده به وسیله اولتراسونیک سبب تغییر پروتئین‌های زرده نشود. سپس، ۹۵ میلی‌لیتر از ترکیب اولتراسونیک شده با ۲۵ میلی‌لیتر رقیق‌کننده پیش-ساخته تریلادیل مخلوط شد و در حجم‌های ۹/۵ میلی-لیتری درون لوله فالکون ریخته شد و در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شد.

جمع‌آوری و رقیق‌سازی منی: در فصل تولیدمثلی، سه راس قوچ ۳ تا ۴ ساله نژاد مهربان که از قبل به اسپرم‌دهی با واژن مصنوعی عادت داده شده بودند انتخاب شده و تا پایان آزمایش در شرایط تغذیه‌ای، محیطی و مدیریتی یکسان نگهداری شدند. یک شب قبل از اسپرم‌گیری، رقیق‌کننده‌های مربوط به هر تیمار از فریزر خارج شده و به آرامی درون یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس ذوب شدند. یک ساعت قبل از اسپرم‌گیری، رقیق‌کننده‌ها درون بن‌ماری (با دمای ۳۷ درجه سلسیوس) قرار گرفتند تا هم‌دمای شوند. عمل اسپرم‌گیری از قوچ‌ها با استفاده از یک میس مقید شده انجام شد. منی هر یک از قوچ‌ها قبل از ادغام با میکروسکوپ نوری ارزیابی اولیه شد. نمونه‌های دارای حجم بالای ۰/۷ میلی‌لیتر، تحرک بالای ۰/۸۵، ناهنجاری زیر ۱۰٪ و غلظت بیشتر از ۲ میلیارد اسپرم در هر میلی‌لیتر استفاده شد. مایع منی گرفته شده از قوچ‌ها برای حذف آثار فردی به نسبت مساوی با هم مخلوط شده و سپس، به سه قسمت مساوی تقسیم شد و به وسیله رقیق‌کننده‌های هر تیمار تا غلظت ۲۰۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر رقیق شد و به دمای ۴ درجه سلسیوس منتقل شد.

ارزیابی فراسنجه‌های کیفی اسپرم: فراسنجه‌های مربوط به زنده‌مانی، سلامت غشاء و دینامیک حرکتی اسپرم (کاسا) هر ۲۴ ساعت یک‌بار و تا ۷۲ ساعت پس از نگهداری در

به مدت ۴۰ دقیقه (CEY) و ۳- زرده اولتراسونیک شده با شدت ۵۰ درصد (۵۰۰ وات) به مدت ۱۰ دقیقه (SEY) بود. *آماده‌سازی رقیق‌کننده‌ها:* ابتدا تعداد مورد نیاز از تخم‌مرغ-های تازه را در محیط آزمایشگاه شکسته و زرده به آرامی از سفیده جدا شده و روی فیلتر کاغذی غلتاننده شد به گونه‌ای که محتویات سفیده و شالاز از زرده جدا شود. سپس، با استفاده از یک سرنگ، غشای نازک زرده سوراخ شده و محتویات آن درون یک ظرف استریل جمع‌آوری شد. سپس، به ازای هر میلی‌لیتر زرده ۰/۰۵ میلی گرم سدیم دو سولفات (SDS) در ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر حل شده و به زرده تخم‌مرغ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۴۰ دقیقه به شکل عدد 8 لاتین هم‌زده شد تا میسل-های چربی زرده آزاد و حل شود.

تهیه رقیق‌کننده حاوی زرده کامل تخم‌مرغ (WEY): در این پژوهش از رقیق‌کننده تجاری پیش‌ساخته تریلادیل (Minitube, Germany) استفاده شد. بر اساس دستورالعمل آماده‌سازی شرکت تولیدکننده، هر ۲۵۰ میلی‌لیتر از رقیق‌کننده با ۷۵۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر استریل به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به محلول آماده شده ۲۰۰ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ اضافه شده و در ۳۰ درجه سلسیوس به آرامی مخلوط شد. در نهایت، رقیق‌کننده آماده شده جهت حذف ذرات حل نشده و درشت زرده و عدم تداخل در ارزیابی اسپرم‌ها در کاسا، به صورت ملایم سانتریفیوژ (۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه) شد. پس از سانتریفیوژ، رقیق‌کننده آماده شده در حجم‌های ۹/۵ میلی‌لیتری درون لوله فالکون ریخته شد و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شد. این رقیق‌کننده به عنوان رقیق‌کننده حاوی زرده کامل تخم‌مرغ یا WEY در نظر گرفته شد.

تهیه رقیق‌کننده حاوی زرده اولتراسانتریفیوژ شده (CEY): برای این منظور، زرده کامل تخم‌مرغ به درون میکروتیوب-های ۲ میلی‌لیتری ریخته شد و به مدت ۶۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰۰ g با سانتریفیوژ سرعت بالا (Micro 17TR, South Korea) اولتراسانتریفیوژ شد و مایع شفاف روی زرده جدا شد (Holt et al., 1996). سپس، به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از رقیق‌کننده تریلادیل، ۲۰ سی‌سی پلاسمای زرده اضافه شد و به عنوان رقیق‌کننده تیمار CEY در نظر گرفته شد. رقیق‌کننده آماده شده در حجم‌های ۹/۵ میلی‌لیتری درون

Videotest نسخه ۳/۲ (روسیه) بود. دسته بندی فراسنجه های دینامیک جنبایی اسپرم بر اساس دستورالعمل پیشنهادی WHO-2010 انجام شد. جهت ارزیابی دینامیک جنبایی، ۷ میکرولیتر از نمونه منی گرم شده روی لام گرم منتقل شده و با لامل تمیز (۱۸×۱۸ میلی متر) روی آن پوشانده شد و روی گرمکن صفحه میکروسکوپ قرار گرفت. برای هر نمونه، تعداد ۱۰ فیلد میکروسکوپی فیلم برداری شد. مدت زمان فیلم برداری برای هر فیلد برابر با ۲ ثانیه بود. فراسنجه های دینامیک ارزیابی شده به شرح زیر بود: TM: جنبایی کل (درصد)، PM: جنبایی پیش رونده (درصد)، VSL: سرعت اسپرم روی خط فرضی مستقیم واصل بین نقطه شروع و پایان حرکت اسپرم بر حسب میکرومتر در ثانیه، VCL: سرعت اسپرمها در مسیرهای واقعی طی شده بر حسب میکرومتر در ثانیه، VAP: سرعت میانگین حرکت اسپرمها بر حسب میکرومتر در ثانیه، STR: درصد مستقیم-الخط بودن حرکت اسپرم (ملاکی از نزدیک بودن مسیر حرکت متوسط به خط مستقیم واصل بین نقاط ابتدایی و انتهایی است)، ALH: حداکثر دامنه حرکات جانبی (دامنه حرکات جانبی سریع سر اسپرم در اطراف مسیر میانگین بر حسب میکرومتر)، LIN: درصد خطی بودن حرکت اسپرمها (ملاکی از نزدیک بودن مسیر حرکت واقعی اسپرم به خط مستقیم واصل بین دو نقطه ابتدایی و انتهایی) و BCF: تعداد دفعاتی که سر اسپرم در هر ثانیه به صورت جانبی حرکت نموده و مسیر میانگین را قطع می کند.

تعیین باروری: جهت تعیین قابلیت باروری اسپرمهای نگهداری شده در هر یک از رقیق کننده ها، در اواخر فصل تولیدمثلی از ۴۲ رأس میش غیرآبستن نژاد مهربان با سن ۲ تا ۴ سال و نمره بدنی ۴-۳/۵ که در شرایط مدیریتی یکسان نگهداری می شدند استفاده شد. برای این منظور، ابتدا چرخه فعلی میشها با استفاده از سیدر پروژسترونی (فایزر) و ۴۰۰ واحد بین المللی گنادوتروپین جفت اسب (eCG، هیپرا، اسپانیا) همزمان شد. در روز سیدرگذاری، پس از ضد عفونی و خشک کردن اطراف دستگاه تولیدمثلی، سیدرها با استفاده از اپلیکاتور مخصوص در درون واژن میشها قرار داده شدند. بعد از ۱۴ روز، سیدرها از واژن میشها خارج شده و ۴۰۰ واحد بین المللی هورمون eCG به صورت عضلانی به هر میش تزریق شد. تلقیح مصنوعی با روش لاپاراسکوپی و ۵۶ ساعت پس از خارج سازی سیدر انجام شد. برای این منظور، ابتدا میشها ۱۸ ساعت قبل از

دمای ۴ درجه سلسیوس ارزیابی شد. برای این منظور، قبل از ارزیابی، ابتدا نمونه اصلی به طور کامل هم زده شد و سپس، ۵۰۰ میکرولیتر از آن با استفاده از سمپلر به درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتر منتقل شده و به مدت ۱۵ دقیقه داخل بن ماری (۳۷/۵ درجه سلسیوس) قرار داده شد.

ارزیابی زنده ماننی: ارزیابی زنده ماننی اسپرمها به روش رنگ-آمیزی با ائوزین-نیگروزین انجام شد. نمونه منی یخ گشایی شده به نسبت ۱ به ۲ با محلول رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین (۱/۶۷ گرم ائوزین Y-۱۰ گرم نیگروزین) و ۲/۹ گرم سدیم سیترات در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شده و روی لام قرار گرفت. سپس، با کمک یک لام دیگر گسترشی از آن تهیه شده و با کمک میکروسکوپ نوری (Genus, China) با بزرگنمایی X ۴۰۰، حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شدند. اسپرمهای با سر صورتی رنگ به عنوان اسپرمهای مرده و اسپرمهای با سر بدون رنگ به عنوان اسپرمهای زنده ثبت شده و درصد اسپرمهای زنده محاسبه شد.

ارزیابی سلامت غشای اسپرم: سلامت و یکپارچگی غشا با استفاده از آزمون تورم هیپواسموتیک (HOST) انجام شد. برای این منظور، ۰/۴۹ گرم سدیم سیترات و ۰/۹ گرم فروکتوز با ۱۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر مخلوط شده و تا زمان استفاده در درون یخچال نگهداری شد. قبل از استفاده، یک میلی لیتر از محلول هیپواسموتیک به درون بن ماری منتقل شد و پس از هم دما شدن، ۱۰۰ میکرولیتر از منی رقیق شده به آن اضافه شد و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. بعد از این مدت، دم اسپرمهای دارای غشای سالم در محلول HOST پیچ-خورده و دم اسپرمهای دارای غشای ناسالم، صاف باقی می ماند. با استفاده از میکروسکوب نوری فازکنتراست (Genus, China) با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر، تعداد ۲۰۰ اسپرم از هر نمونه شمارش شد و درصد اسپرمهای دارای غشاء سالم محاسبه شد.

ارزیابی فراسنجه های حرکتی: فراسنجه های حرکتی اسپرم با کمک دستگاه کاسا هر ۲۴ ساعت و تا ۷۲ ساعت پس از نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس ارزیابی شد. دستگاه کاسا مورد استفاده در این پژوهش مجهز به میکروسکوپ فاز کنتراست (Labomed 400, USA)، با لنز فازکنتراست زمینه منفی (۲۰X)، گرمکن صفحه، دوربین فیلم برداری (Mshot50، چین) با سرعت ۵۰ فریم بر ثانیه و نرم افزار

WEY بیشتر بود ($P < 0.05$). درصد جنبایی کل در رقیق-کننده CEY ($P = 0.0807$) و جنبایی پیش‌رونده در رقیق-کننده SEY ($P = 0.0897$) تمایل به افزایش داشت. اثر متقابل تیمار×زمان برای درصد زنده‌مانی، سلامت غشاء اسپرم و ویژگی‌های حرکتی تعیین شده با کاسا معنی‌دار نبود. برخی از فراسنجه‌های حرکتی تعیین شده با کاسا مانند PM، VCL، VSL، VAP و ALH با گذشت زمان، روند کاهشی داشتند ($P < 0.05$)، اما سایر فراسنجه‌ها تحت تاثیر زمان قرار نگرفتند. نتایج مربوط به تاثیر برهمکنش تیمار و زمان بر قابلیت زنده‌مانی، سلامت غشاء، درصد جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده و فراسنجه‌های تعیین شده با کاسا در جدول ۲ نشان داده شده است. درصد PM و WOB ۲۴ ساعت پس از نگهداری منی در رقیق‌کننده SEY به‌طور معنی‌داری بالاتر از WEY بود ($P < 0.05$) و میزان ALH (بر حسب میکرومتر) و درصد LIN در رقیق-کننده SEY گرایش به افزایش داشت.

در تیمار SEY و پس از ۴۸ ساعت، بیشترین میزان سلامت غشاء اسپرم (درصد) و پس از ۷۲ ساعت، بیشترین میزان زنده‌مانی و جنبایی (درصد) مشاهده شد ($P < 0.05$). همچنین، در این تیمار، جنبایی پیش‌رونده (درصد) و میزان VSL (میکرومتر بر ثانیه) نیز پس از ۷۲ ساعت تمایل به افزایش داشت. سایر فراسنجه‌ها در زمان‌های ارزیابی تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفتند.

نتایج مربوط به درصد آبستنی میش‌های تلقیح شده با اسپرم‌های نگهداری شده در رقیق‌کننده‌های WEY، CEY و SEY در دمای ۴ درجه سلسیوس در جدول ۳ نشان داده شده است. درصد آبستنی میش‌های تلقیح شده با اسپرم-های نگهداری شده در رقیق‌کننده‌های WEY، CEY و SEY در ۴۵ روز پس از تلقیح بین تیمارها تفاوت معنی-داری نشان نداد.

بحث

در این مطالعه، اثر اولتراسونیک و یا اولتراسانتیفیوژ کردن زرده تخم‌مرغ و افزودن آن به رقیق‌کننده بر خصوصیات کیفی منی ذخیره شده قوچ در دمای ۴ درجه سلسیوس آزمایش شد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد پس از ۷۲ ساعت نگهداری منی با رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ اولتراسونیک شده، زنده‌مانی، سلامت غشاء اسپرم، جنبایی پیش‌رونده و کل و برخی فراسنجه‌های تعیین شده با کاسا

انجام لاپاراسکوپی از آب و خوراک محروم شدند. قبل از عمل تلقیح، میش‌ها به سه گروه تقسیم شده و اسپرم مخصوص هر تیمار تلقیح شد. در این پژوهش از اسپرم تازه که به مدت ۱۲ ساعت در رقیق‌کننده‌های هر تیمار ذخیره شده بود برای تلقیح استفاده شد. برای انجام تلقیح مصنوعی با روش لاپاراسکوپی، هر دام روی تخت مخصوص لاپاراسکوپی (کریدل) مقید شده و نقطه پائین‌تر از پستان با تروکار سوراخ شد تا دسترسی به محوطه شکمی امکان-پذیر شود. سپس، با کمک دوربین لاپاراسکوپی (Wolf، آلمان) که متصل به منبع نور سرد (Asculap، امریکا) بود، دستگاه تولیدمثل جستجو و رویت شد. وضعیت فحلی دام مورد بررسی قرار گرفت و در صورت آمادگی دام، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر منی ذخیره شده به داخل لومن شاخ‌های رحمی (هر شاخ رحمی به میزان ۰/۲۵ میلی‌لیتر) هر میش تلقیح شد. پس از اتمام عملیات تلقیح، روی ناحیه سوراخ شده اکسی‌تتراسایکلین (OCT) اسپری شد و میش‌ها به محل دریافت آب و خوراک هدایت شدند. ۴۵ روز پس از تلقیح مصنوعی دام‌ها به کمک دستگاه سونوگرافی مجهز به پراب کانوکس (۳/۵ مگاهرتز، SIUI، چین) از ناحیه شکمی معاینه شده و میزان آبستنی مربوط به هر تیمار تعیین شد. تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۴) و رویه GLM در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با اندازه‌گیری‌های تکرار شده در زمان تجزیه شدند. هر هفته اسپرم‌گیری به‌عنوان یک بلوک در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی و سطح خطای برابر با ۵ درصد انجام شد. همچنین، سطح خطای کمتر از ۱۰ درصد نیز به عنوان گرایش به معنی‌داری در نظر گرفته شد. داده‌های ناپارامتری مربوط به باروری با استفاده از رویه Freq تجزیه شده و تفاوت بین میانگین‌ها با آزمون مربع کای در سطح خطای برابر با ۵ درصد تعیین شد.

نتایج

نتایج مربوط به نگهداری مایع منی در رقیق‌کننده‌های WEY، SEY و یا CEY به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس در جدول ۱ نشان داده شده است. در کل زمان نگهداری منی، سلامت غشاء اسپرم در رقیق‌کننده SEY به‌طور معنی‌داری نسبت به رقیق‌کننده‌های CEY و

ایجاد تغییر در بار سطحی، اندازه ذرات و تشکیل مولکول‌های پروتئین‌های زرده و تولید گروه سولفیدریل آزاد، این خصوصیات را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Xie et al., 2020). لیپوپروتئین با چگالی پائین (LDL) موجود در زرده تخم‌مرغ یکی از عوامل مؤثر بر زنده‌مانی و حفظ سلامت غشاء سلول‌های اسپرم در طول زمان نگهداری است (Watson, 1976). گزارش شده است که طی فرآیند اولتراسانتریفیوژ کردن و یا اولتراسونیک کردن، ذرات آسیب‌رسان به سلول‌های اسپرم از بین می‌روند و یا اینکه در ته لوله سانتریفیوژ جمع می‌شوند که به نوبه خود باعث افزایش فراسنجه‌های کیفی اسپرم به‌ویژه حفظ سلامت غشا و فراسنجه‌های حرکتی می‌شود (Yassen & Foote, 1967; de Brito et al., 2021). خطر انتقال بیماری، متغیر بودن ترکیب زرده تخم‌مرغ، ذرات درشت، عدم حلالیت زرده و ذرات ریز زائد از جمله مضرات استفاده از زرده کامل تخم‌مرغ در رقیق‌کننده‌های مایع منی هستند. وجود پروژسترون در زرده تخم‌مرغ نیز به دلیل نقش القایی آن در ظرفیت‌پذیر شدن اسپرم از معایب آن در نظر گرفته شده است (Dalal et al., 2019). علاوه بر آن، برخی از گرانول‌های زرده مانند لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا یا HDL از جمله ترکیبات مضر است که با برخی از فرآیندهای بیوشیمیایی اسپرم تداخل دارند (Watson & Martin, 1975). بنابراین، پس از اولتراسانتریفیوژ نمودن، بخش محافظت‌کننده زرده که LDL است در مایع رویی جمع می‌شود و طی فرآیند سردسازی منی، روی غشای سلول‌های اسپرم را می‌پوشاند و از آن محافظت می‌کند (Hu et al., 2006). گرانول‌های ناهمگن زرده، ذراتی با قطر حداقل ۲۰۰-۱۵۰ نانومتر هستند که حداکثر قطر آن‌ها چند میکرومتر است. لیپوپروتئین LDL زرده، یک نانوذره کروی با قطر ۸۰-۳۰ نانومتر است که دارای هسته‌ای متشکل از لیپیدها و پوسته‌ای از پروتئین‌ها و فسفولیپیدها است (Anton, 2013). زمانی که فرآیند اولتراسونیک اتفاق می‌افتد انتظار می‌رود که ذرات میسلی LDL در اندازه میکرو و یا حتی نانو به‌وجود آید که این ذرات ممکن است به اندازه لیپوزوم‌ها و یا اندکی از آنها بزرگتر باشد که می‌تواند آثار مثبت خود را اعمال نماید (Kentish et al., 2008).

نسبت به رقیق‌کننده حاوی زرده کامل تخم‌مرغ و زرده اولتراسانتریفیوژ شده بهتر حفظ می‌شود، اما نتیجه باروری تیمارها با هم مشابه بود. در مورد نگهداری منی قوچ با رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ اولتراسونیک شده و یا اولتراسانتریفیوژ شده در دمای ۴ درجه سلسیوس مطالعات اندکی انجام شده است. بیشتر مطالعات صورت گرفته تأثیر رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ اولتراسونیک شده و یا اولتراسانتریفیوژ شده را پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی گزارش کرده‌اند. همسو با یافته‌های این پژوهش، et al. (2022) da Silva نشان دادند که جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده و سلامت غشاء اسپرم بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی اسپرم سگ در رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ اولتراسونیک شده نسبت به رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ اولتراسانتریفیوژ شده بهتر حفظ می‌شود. در مقابل، de Brito et al. (2021) نشان دادند که فراسنجه‌های حرکتی اسپرم و سلامت غشاء اسپرم خوک بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی فقط در رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ سانتریفیوژ شده بهبود می‌یابد که بر خلاف یافته این پژوهش است. در پژوهش Zhang et al. (2018) نشان داده شد که انجماد منی نریان در رقیق‌کننده‌های حاوی زرده تخم‌مرغ اولتراسونیک شده با شدت و مدت زمان‌های مختلف اولتراسونیک، باعث افزایش جنبایی کل و پیش‌رونده، VCL، VAP و VSL پس از یخ‌گشایی شد که در توافق با نتایج این پژوهش است.

برای داشتن باروری موفق، غشاء اسپروماتوزوآ باید طبیعی بوده و از یکپارچگی عملکردی برخوردار باشد. یکی از شرایط طبیعی بودن چنین اسپروماتوزوآیی، متورم شدن دم آن به دلیل نفوذ آب در زمانی است که در محیط هایپواسموتیک قرار می‌گیرد (Baker, 1992). به‌طور کلی، هر چند با گذشت زمان از ساعات اولیه ذخیره‌سازی، سلامت غشاء به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد، اما نوع رقیق‌کننده می‌تواند سرعت از بین رفتن یکپارچگی غشاء را کاهش دهد. می‌توان دلایل متفاوتی برای توجیه سازوکار تأثیر استفاده از امواج اولتراسونیک و اولتراسانتریفیوژ کردن زرده تخم‌مرغ بر زنده‌مانی، سلامت غشاء و جنبایی اسپرم مطرح نمود. استفاده از امواج اولتراسونیک تأثیر مثبتی بر خصوصیات کارکردی پروتئین‌های زرده تخم‌مرغ داشته و خصوصیات امولسیفیه‌کنندگی، تشکیل کف و ژل و یکپارچگی آن را بهبود می‌بخشد. امواج اولتراسونیک با

رسانتریفیوژ زرده تخم مرغ قبل از استفاده آن در رقیق کننده بر قابلیت زنده‌مانی، سلامت غشاء اسپرم و برخی فراسنجه‌های تعیین شده به وسیله کاسا اسپرم قوچ نژاد مهربان هنگام ذخیره‌سازی در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت

Table 1. Effect of ultrasonic or ultracentrifuge treatment of egg yolk before utilizing in extender on viability, membrane integrity, and sperm motility of Mehraban ram semen across the time of storage at 4°C for 72 hours¹

Item	Viability (%)	Membrane Integrity (%)	TM (%)	PM (%)	VCL (m/sμ)	VSL (m/sμ)	VAP (m/sμ)	STR (%)
Treatment								
WEY (Control)	72.28	73.17 ^b	68.14	53.42	81.75	29.10	35.26	78.55
CEY	71.57	72.56 ^b	66.44	55.66	85.91	30.50	37.04	78.61
SEY	75.40	76.31 ^a	70.92	56.71	83.78	30.24	36.52	79.07
SEM	1.85	1.803	1.813	1.073	2.131	0.615	0.774	0.601
Time								
24 h	74.41	70.28	70.20	58.23 ^a	88.26 ^a	31.57 ^a	38.13 ^a	79.20
48 h	73.19	69.21	69.07	56.37 ^a	84.88 ^{ab}	30.30 ^a	37.99 ^a	78.71
72 h	71.64	65.91	65.62	51.42 ^b	78.30 ^{bc}	28.09 ^b	33.78 ^b	78.50
SEM	1.708	1.674	1.671	1.102	2.280	0.695	0.892	0.561
P-value								
Treatment	0.1538	0.0094	0.0807	0.0897	0.6278	0.5160	0.5869	0.7117
Time	0.5838	0.6786	0.2189	0.0003	0.0072	0.0015	0.0013	0.7492
Treatment × Time	0.9589	0.8218	0.8460	0.1109	0.6726	0.1083	0.3052	0.4077

¹ TM: Total motile spermatozoa, PM: Progressively motile spermatozoa, VCL: Curvilinear line velocity, VSL: Straight-line velocity, VAP: Average path length, LIN: Linearity, ALH: The amplitude of lateral head displacement, WOB: Wobble, BCF: Beat cross frequency, WEY: Egg yolk by ultracentrifugation, SEY: Ultrasonicated egg yolk.

^{a-c} Different superscript letters in each column for each item indicated significant differences ($P < 0.05$).

جدول ۲- اثر تیمار اولتراسونیک و یا اولتراسانتریفیوژ زرده تخم مرغ قبل از استفاده آن در رقیق کننده بر قابلیت زنده ماندن، سلامت غشاء اسپرم و فراسنجه‌های تعیین شده با کاسا در اسپرم قوچ نژاد مهربان در زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی در ۴ درجه سلسیوس

Table 2. Effect of ultrasonic or ultracentrifuge treatment of egg yolk before utilizing in extender on viability, membrane integrity, and CASA detected parameters in Mehraban ram semen at different storage times at 4°C¹

Item	WEY (Control)	CEY	SEY	SEM	P-value
Viability (%)					
24 h	74.59	72.94	75.69	2.136	0.6683
48 h	71.12	70.37	73.43	2.335	0.6516
72 h	71.09	71.41	77.07	1.767	0.0655
Membrane integrity (%)					
24 h	75.13	72.99	75.80	1.102	0.2193
48 h	71.02 ^b	71.43 ^b	76.90 ^a	1.342	0.0197
72 h	73.36	73.26	76.23	1.892	0.4893
Total Motility (%)					
24 h	70.86	68.74	71.23	2.263	0.7118
48 h	65.43	64.74	67.55	2.143	0.6405
72 h	68.12 ^b	65.53 ^b	73.99 ^a	1.573	0.0099
Progressive Motility (%)					
24 h	55.63 ^b	57.30 ^{ab}	61.90 ^a	1.395	0.0194
48 h	57.13	54.56	56.46	2.011	0.6631
72 h	48.41	54.08	51.76	1.690	0.1055
VCL (µm/s)					
24 h	87.29	89.94	86.50	3.812	0.7960
48 h	84.58	84.64	84.69	3.670	0.9943
72 h	72.69	82.12	80.14	3.092	0.1219
VSL (µm/s)					
24 h	30.83	31.68	31.97	1.351	0.8584
48 h	30.91	29.72	30.14	1.050	0.6829
72 h	25.54	30.12	28.61	1.277	0.0779
VAP (µm/s)					
24 h	37.24	38.29	38.48	1.971	0.8756
48 h	37.47	36.48	36.79	1.358	0.8634
72 h	31.08	35.99	34.29	2.501	0.1105
STR (%)					
24 h	78.25	79.11	80.17	0.789	0.2446
48 h	79.69	78.19	78.55	0.895	0.4690
72 h	77.89	79.13	78.49	0.883	0.6200
ALH (µm)					
24 h	1.69	1.98	1.77	0.081	0.0718
48 h	1.69	1.75	1.72	0.062	0.8537
72 h	1.48	1.69	1.63	0.065	0.1249
LIN (%)					
24 h	34.19	35.00	37.28	0.912	0.0902
48 h	36.80	34.38	34.93	1.121	32.81
72 h	34.40	35.20	34.57	1.339	0.9061
BCF (Hrtz)					
24 h	15.40	14.43	15.20	0.311	0.1180
48 h	15.38	15.14	15.20	0.284	0.7874
72 h	15.02	15.15	15.27	0.191	0.6788

¹ VAP: Average path velocity, VSL: Straight-line velocity, STR: Straightness, LIN: Linearity, ALH: The amplitude of lateral head displacement, BCF: Beat cross frequency, WEY: Whole egg yolk as control, CEY: Clarified egg yolk by ultracentrifugation, SEY: Ultrasonicated egg yolk.

^{a-b} Different superscript letters in each row for each item indicated significant differences ($P < 0.05$).

جدول ۳- اثر تیمار اولتراسونیک و یا اولتراسانتریفیوژ زرده تخم مرغ قبل از استفاده آن در رقیق کننده بر باروری اسپرم قوچ نژاد مهربان ذخیره سازی شده در دمای ۴ درجه سلسیوس

Table 3. Effect of ultrasonic or ultracentrifuge treatment of egg yolk before utilizing in extender on fertility rate of Mehraban ram semen after storage at 4°C¹

Item	WEY (Control)	CEY	SEY	P-value
Number of inseminated ewes	12	15	15	
Number of pregnant ewes on d-45	6	8	8	
Pregnancy rate on d-45	50.00	53.33	53.33	0.9811

¹ WEY: whole egg yolk considered as control, CEY: Clarified egg yolk by ultracentrifugation, SEY: Ultrasonicated egg yolk

(Watson, 1976). همچنین، با افزودن فسفولیپیدها و کلسترول بیشتر به غشای سلول اسپرم، سلامت غشاء اسپرم را بهبود می بخشد (Bergeron et al., 2004). در این پژوهش، سلامت غشاء اسپرم های تیمار CEY دارای تفاوت معنی داری با تیمار WEY نبود که این نتیجه متناقض می-تواند به تفاوت در نوع گونه حیوانی، مدت و شدت سانتریفیوژ در مطالعات مختلف مربوط باشد. اولتراسونیک کردن و اولتراسانتریفیوژ کردن زرده تخم مرغ توانست باعث بهبود برخی از فراسنجه های دینامیک حرکتی اسپرم نیز شود. زندهمانی، جنبایی کل، دامنه حرکات جانبی سریع سر اسپرم در اطراف مسیر میانگین (ALH، برحسب میکرومتر) و درصد خطی بودن حرکت اسپرمها (LIN، درصد)، درصد جنبایی پیش رونده و سرعت حرکت اسپرم روی خط فرضی مستقیم، مهمترین فراسنجه هایی بودند که به وسیله تیمارهای CEY و SEY تحت تاثیر قرار گرفتند. گزارش شده است صدماتی که طی فرآیند سردسازی و یا انجماد به میتوکندری و اکسونم اسپرماتوزوآ وارد می شود باعث کاهش سرعت حرکت اسپرم در مسیر خود می شود (O'connell et al., 2002). در مطالعات درون آزمایشگاهی، ارتباط مثبتی بین این فراسنجه های جنبایی و نرخ باروری مشاهده شده است (Barlow et al., 1991). جنبایی عرضی سر (ALH) یک فراسنجه مهم جهت نفوذ به موانع لقاح اطراف تخمک مانند لایه های سلولی کومولوس و زونا پلوسیدا است (Gadea et al., 2004). اهمیت این فراسنجه ها در نشان دادن قدرت ضربان فلاژلوم همراه با فرکانس چرخش سلولی است که احتمالاً برای پیشرفت اسپرمها به سمت مخاط دهانه رحم و پوشش های اطراف تخمک نیاز است (Serres et al., 1984). در این پژوهش، درصد آبستنی میش های تلقیح شده با اسپرم های نگهداری شده در رقیق کننده های WEY، CEY و SEY در ۴۵ روز پس از تلقیح بین تیمارها تفاوت

انتظار می رود با کاهش اندازه ذرات LDL، قابلیت دسترسی آن برای سلول افزایش یابد تا بتواند هم فراسنجه های حرکتی و هم فراسنجه های ساختاری اسپرم را بهبود بخشد، این نتیجه در پژوهش حاضر مشاهده شد و باعث قبول فرضیه پژوهش شد. در مقابل، گزارشی نیز وجود دارد که نشان می دهد اولتراسونیک کردن زرده تخم مرغ ممکن است تاثیر مضر بر فراسنجه های حرکتی اسپرم بگذارد (de Brito et al., 2021). دلیل گزارش شده برای این موضوع این است که فرآیند اولتراسونیک نمودن باعث کوچکتر شدن اندازه ترکیباتی می شود که برای زندهمانی اسپرم مضر هستند و در نتیجه باعث کاهش فراسنجه های حرکتی اسپرم ذخیره شده می شود (de Brito et al., 2021). همچنین، گزارش شده است که زمانی که از لیپوزومها در رقیق کننده منی مادیان استفاده شد، فراسنجه های حرکتی اسپرم پایین تر از زمانی بود که در رقیق کننده از زرده کامل تخم مرغ استفاده شد (Pillet et al., 2012). نتایج مغایر می-تواند به شدت و مدت زمان اولتراسونیک کردن زرده تخم-مرغ مربوط باشد (Zhang et al., 2018). علاوه بر آن، گزارش شده است که اولتراسونیک کردن پلاسمای زرده تخم مرغ به جای زرده کامل تخم مرغ می تواند تاثیر مثبتی بر فراسنجه های حرکتی اسپرم خوک داشته باشد (de Brito et al., 2021). احتمالاً پس از استحصال پلاسمای زرده که معمولاً با سانتریفیوژ کردن سرعت بالا رخ می دهد، ذرات مضر در ته لوله جمع می شوند و اولتراسونیک نمودن بخش بالایی آن (پلاسمای زرده تخم مرغ) باعث کوچکتر شدن ذرات LDL می شود. در نتیجه، ذرات LDL کوچک شده برای سلول قابل دسترس تر شده و بهتر می توانند روی سلول را پوشانده و از آسیب سرمایی جلوگیری نمایند (de Brito et al., 2021). گزارش شده است که LDL با جلوگیری از خروج فسفولیپیدها و کلسترول از غشاء سلول-های اسپرم آن را در برابر شوک سرما محافظت می کند

باروری بالا را پس از تلقیح حفظ نمودند (Wall & Foote, 1999). در مطالعه‌ای نشان داده شد که انجماد منی گاو نر با رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ اولتراسانتریفیوژ شده باعث افزایش نرخ لقاح آزمایشگاهی و نرخ تولید بلاستوسیت پس از یخ‌گشایی شد (Amirat et al., 2004b). شایان ذکر است که در بیشتر مطالعات قبلی، تاثیر عمل-آوری زرده تخم‌مرغ افزوده شده به رقیق‌کننده را در شرایط آزمایشگاهی بررسی نموده‌اند و داده‌های باروری در دام زنده بسیار اندک است.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی، عمل‌آوری زرده تخم‌مرغ با روش اولتراسانتریفیوژ و اولتراسونیک می‌تواند با تغییر در خصوصیات کارکردی آن و تأثیر مثبت بر سلامت غشاء و برخی از خصوصیات حرکتی اسپرم به‌عنوان راهکاری مناسب برای افزودن آن به رقیق‌کننده جهت نگهداری اسپرم و استفاده از آن در تلقیح مصنوعی گوسفند باشد. پیشنهاد می‌شود اثر فرآوری زرده تخم‌مرغ به‌روش اولتراسانتریفیوژ و یا اولتراسونیک پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی منی قوچ نیز بررسی شود.

معنی‌داری نشان نداد. علت عدم وجود تفاوت معنی‌دار از یک طرف به نوع اسپرم تلقیح شده به میس‌ها و از طرف دیگر به روش تلقیح به‌کار برده شده و مدت زمان ذخیره-سازی تا تلقیح مربوط است. در این پژوهش، برای تلقیح از اسپرم تازه که به‌مدت ۱۲ ساعت در رقیق‌کننده‌های هر تیمار ذخیره شده بود استفاده شد. علاوه بر آن، تلقیح مصنوعی با روش لاپاراسکوپي انجام شد. در این روش، تلقیح حتی اسپرم‌های با کیفیت پایین نیز شانس لقاح بیشتری با تخمک پیدا می‌کنند زیرا با تکنیک لاپاراسکوپي، سد سرویکس پشت سر گذاشته می‌شود. به‌دلیل محدودیت‌های این پژوهش، امکان ذخیره‌سازی طولانی‌تر اسپرم‌ها و سپس، تلقیح آنها وجود نداشت. بنابراین، ممکن است تلقیح اسپرم‌های ذخیره شده برای مدت ۲۴ ساعت یا بیشتر، بتواند تفاوتی در نتیجه باروری ایجاد نماید. دلیل دیگر غیرمعنی‌دار بودن این فراسنجه، کم بودن تعداد میس‌های هر تکرار در تیمارها است. در توافق با نتایج این پژوهش، نشان داده شده است که تلقیح منی منجمد شده با رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ اولتراسانتریفیوژ شده در مقایسه با منی منجمد شده در زرده کامل تخم‌مرغ در تلیسه‌های هلشتاین تفاوتی ایجاد نکرد و هر دو تیمار

فهرست منابع

- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J. L., & Anton, M. (2004a). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61, 895-907. doi: 10.1016/S0093-691X(03)00259-0
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J. L., & Anton, M. (2004b). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61(5), 895-907. doi: 10.1016/S0093-691X(03)00259-0
- Anton, M. (2013). Egg yolk: structures, functionalities and processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2871-2880. doi: 10.1002/jsfa.6247
- Baker, H. G. (1992). Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertility and Sterility*, 58(6), 1178-1184. doi: 10.1016/S0015-0282(16)55566-6
- Barlow, P., Delvigne, A., Dromme, J. V., Hoeck, J. V., Vandebosch, K., & Leroy, F. (1991). Predictive value of classical and automated sperm analysis for in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, 6(8), 1119-1124. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137496
- Bergeron, A., Crête, M. H., Brindle, Y., & Manjunath, P. (2004). Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*, 70(3), 708-717. doi: 10.1095/biolreprod.103.022996
- Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220. doi: 10.14202/vetworld.2021.1220-1233
- da Silva, E. A., Corcini, C. D., Junior, F. d. A. A. C., Martins, D., Gheller, S. M. M., Hädrich, G., Dora, C. L., & Junior, A. S. V. (2022). Probe ultrasonification of egg yolk plasma forms low-density lipoprotein nanoparticles that efficiently protect canine semen during cryofreezing. *Journal of Biological Chemistry*, 298(7). doi: 10.1016/j.jbc.2022.101975

- Dalal, J., Kumar, P., Chandolia, R., Pawaria, S., Rajendran, R., Sheoran, S., Andonissamy, J., & Kumar, D. (2019). A new role for RU486 (mifepristone): it protects sperm from premature capacitation during cryopreservation in buffalo. *Scientific Reports*, 9(1), 6712.
- de Brito, C. R., Varela Junior, A. S., Gheller, S. M. M., Acosta, I. B., Anciuati, A. N., Gatti, N. L. S., Silva, E. A., Knabah, N. W., & Corcini, C. D. (2021). High-speed centrifugation of extender of freeze-thaw boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(5), 821-825. doi: 10.1111/rda.13915
- Gadea, J., Sellés, E., & Marco, M. (2004). The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(5), 303-308. doi: 10.1111/j.1439-0531.2004.00513.x
- Holt, W., Abaigar, T., & Jabbour, H. (1996). Oestrous synchronization, semen preservation and artificial insemination in the Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*) for the establishment of a genome resource bank programme. *Reproduction, fertility and development*, 8(8), 1215-1222. doi: 10.1071/RD9961215
- Hu, J.-h., Li, Q.-W., Chen, X.-Y., Zhang, S.-S., & Wang, L.-Q. (2006). The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(4), 486-494. doi: 10.5713/ajas.2006.486
- Kentish, S., Wooster, T., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., & Simons, L. (2008). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 170-175. doi: 10.1016/j.ifset.2007.07.005
- O'connell, M., McClure, N., & Lewis, S. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17(3), 704-709. doi: 10.1093/humrep/17.3.704
- Pillet, E., Labbe, C., Batellier, F., Duchamp, G., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., & Magistrini, M. (2012). Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology*, 77(2), 268-279. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.08.001
- Samadian, F., Memar, M., & Ardabili, F. 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 [In persian]
- Serres, C., Feneux, D., Jouannet, P., & David, G. (1984). Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gamete Research*, 9(2), 183-195. doi: 10.1002/mrd.1120090208
- Wall, R., & Foote, R. (1999). Fertility of bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk-Tris-glycerol extender. *Journal of Dairy Science*, 82(4), 817-821. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75301-4
- Watson, P. (1976). The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep-freezing. *Journal of Thermal Biology*, 1(3), 137-141. doi: 10.1016/0306-4565(76)90003-6
- Watson, P., & Martin, I. (1975). The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. *Australian Journal of Biological Sciences*, 28(2), 145-152. doi: 10.1071/BI9750145
- Xie, Y., Wang, J., Wang, Y., Wu, D., Liang, D., Ye, H., Cai, Z., Ma, M., & Geng, F. (2020). Effects of high-intensity ultrasonic (HIU) treatment on the functional properties and assemblage structure of egg yolk. *Ultrasonics Sonochemistry*, 60, 104767. doi: 10.1016/j.ultsonch.2019.104767
- Yassen, A., & Foote, R. (1967). Freezability of bull semen in centrifuged or dialyzed and reconstituted buffered egg yolk extenders. *Journal of Dairy Science*, 50(9), 1481-1485. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(67)87652-5
- Zhang, H., Ye, H., Shao, Y., Wu, S., Yu, J., Ji, C., Wang, S., & Zeng, S. (2018). The effects of egg yolk concentration and particle size on donkey semen preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 19-24. doi: 10.1016/j.jevs.2018.03.002