

Effects of centrifugation and cholesterol-loaded with cyclodextrin in the soybean lecithin -based extender on the quality of the post-thaw sperm of Ghezel ram

Shamsollahi, M.¹, Daghigh Kia, H.^{2*}

1- Ph.D. Student, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2- Professor, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

*Corresponding author's email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

(Received: 2018/6/1 Accepted: 2019/5/1)

Abstract

When using frozen-thawed semen, maintaining the motility and viability of ram sperm is important for achieving high pregnancy rates. The goal of this research was to clearly elucidate the effects of centrifugation and cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) in a soy lecithin-based extender on post-thaw ram sperm quality. Sperm samples were collected from 5 Ghezel rams with the age of 4-5 years for 3 weeks. After the initial assessment, the approved semen samples were combined and divided into 8 equal parts. Four samples were combined at 30°C and the seminal plasma was then removed by centrifugation. The semen from the other four samples was not centrifuged and was diluted with Tris buffer plus different concentrations of CLC (0, 0.75, 1.5 and 3 mg/ 1.2×10^8 spermatozoa) and 7% glycerol, similar to the first group. The samples were then cooled to 5°C and frozen in 0.25 ml straws. After thawing, total motility (TM) and progressive motility (PM), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), beat cross frequency (BCF), total antioxidant capacity (TAC), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GPX), the integrity of the acrosome membrane and the integrity of the plasma membrane were significantly ($p < 0.05$) higher in the 1.5 mg CLC group compared to the other groups. Also TM, PM, VCL, TAC, SOD, GPX and plasma membrane was significantly ($p < 0.05$) higher in the group without centrifugation than in the centrifugation group. Overall, the results suggested that addition of 1.5 mg CLC improves most of the sperm parameters measured in vitro in comparison to other groups.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Cyclodextrin, Sperm, Ram, Centrifugation, Soybean lecithin, Freeze-thawing.

اثر سانتریفیوژ و کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکستین در رقیق‌کننده لیستین سویا بر کیفیت اسپرم قوچ قزل بعد از فرآیند ذوب

محمد شمس‌الهی^۱، حسین دقیق‌کیا^{۲*}

۱- دانشجوی دکترای تخصصی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

*نگارنده مسئول مکاتبات: daghighkia@tabrizu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۷/۳/۱۱ پذیرش نهایی: ۹۸/۲/۱۱)

چکیده

حفظ تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ هنگام استفاده از اسپرم منجمد شده برای به دست آوردن میزان آبستنی بالا مهم است. هدف از این مطالعه بررسی اثر سانتریفیوژ و کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکستین در لیستین سویا به عنوان رقیق‌کننده، بر کیفیت اسپرم بعد از فرآیند انجماد-ذوب بود. نمونه‌های منی از ۵ رأس قوچ قزل ۵-۴ ساله به مدت ۳ هفته جمع‌آوری شدند. بعد از ارزیابی اولیه و تأیید کیفیت، نمونه‌ها به ۸ قسمت مساوی تقسیم شدند. پلاسمای منی ۴ نمونه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به وسیله سانتریفیوژ حذف گردید. نمونه‌های باقی‌مانده بدون سانتریفیوژ به وسیله بافر تریس و غلظت‌های مختلف کلسترول لود شده با سیکلودکستین (۰، ۰/۷۵، ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم در ۱/۲×۱۰۸ اسپرم) و ۷ درصد گلیسرول مشابه با گروه اول رقیق‌سازی شدند. سپس نمونه‌ها تا دمای ۵ درجه سلسیوس سردسازی شده و در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری ذخیره شدند. نتایج نشان‌دهنده بهبود معنی‌دار پارامترهای تحرک کل و پیش‌رونده، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، تناوب عرضی زنش، یکپارچگی غشای آکروزومی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و مالون‌دی‌آلدئید، بعد از ذوب در گروه دریافت‌کننده ۱/۵ میلی‌گرم سیکلودکستین در مقایسه با سایر گروه‌ها بود ($p < 0/05$). همچنین تحرک کل و پیش‌رونده، سرعت در مسیر منحنی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز به طور معنی‌داری در گروه بدون سانتریفیوژ نسبت به گروه با سانتریفیوژ، بالاتر بود ($p < 0/05$). به طور کلی نتایج نشان داد که افزودن ۱/۵ میلی‌گرم کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکستین باعث بهبود اغلب پارامترهای مورد ارزیابی نسبت به سایر گروه‌ها شد. کلیدواژه‌ها: سیکلودکستین، اسپرم، قوچ، سانتریفیوژ، لیستین سویا، انجماد-ذوب.

مقدمه

حاضر ارزیابی دو پروتکل فریز با به‌کار بردن سطوح مختلف لیسیتین سویا و مطالعه تاثیر آن‌ها بر تحرک کل و پیش‌رونده، خطی بودن تحرک، راستی مسیر طی شده، سرعت در مسیر منحنی، تحرک عرضی سر، میانگین سرعت در مستقیم، تناوب عرضی زنش، میزان مالون‌دی‌آلدئید و یکپارچگی غشاء آکروزومی در اسپرم قوچ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان وابسته به دانشگاه تبریز در دی‌ماه ۱۳۹۵ بر روی قوچ قزل انجام شد.

- تهیه نمونه منی و فرآوری آن: نمونه‌های منی از ۵ رأس قوچ بالغ ۵-۴ ساله در فصل غیرتولیدمثلی (دی‌ماه ۱۳۹۵ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خلعت پوشان دانشگاه تبریز) به‌صورت هفتگی، به‌وسیله واژن مصنوعی جمع‌آوری شدند. ارزیابی اولیه نمونه‌ها در مدت ۴۵ دقیقه صورت گرفت و نمونه‌های با حجم ۰/۷۵ الی ۲ میلی‌لیتر، تحرک پیش‌رونده بالای ۷۵ درصد، غلظت اسپرم بالاتر از 10^9 /mL و اسپرم غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد مورد استفاده قرار گرفتند. در هر بار نمونه‌گیری، به‌منظور حذف اثرات فردی، نمونه‌های منی تأییدشده با هم مخلوط می‌شدند. از محلول پایه با ۲۲۳/۷۱ میلی‌گرم تریس (108,382 Darmstadt, Germany)، ۵۵/۵۰ میلی‌مول فروکتوز (F2543 Sigma St. Louis, MO, USA) و ۷۲/۸۷ میلی‌مول اسید سیتریک (100,244 Darmstadt, Germany) (۳۲۰ میلی‌اسمول بر کیلوگرم و اسیدیتیه ۷/۲) و ۱/۵ درصد لیسیتین سویا (P3644 Sigma L-aPhosphatidylcholine from soybean, Type IV-S,

انجماد اسپرم، یکی از تکنیک‌های مناسب جهت بهبود تولید گوشت و پشم در گوسفند می‌باشد. نتایج حاصل از تحقیقات نشان داده است که مکانیسم ظرفیت‌دارشدن اسپرم بر اثر انجماد، سبب کاهش عمر باروری اسپرم‌ها می‌شود (Ellington *et al.*, 1999). تغییر در ساختار و یکپارچگی پلاسمایی عامل بسیار مهمی در باروری اسپرم بعد از فرآیند انجماد-ذوب است (Sion *et al.*, 2004). غشای پلاسمایی اسپرم قوچ دارای نسبت بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع به اسیدهای چرب اشباع و نسبت کمی از کلسترول به فسفولیپید می‌باشد که این عوامل خطر بروز واکنش‌های اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species; ROS) را بیشتر می‌کند (Bucak *et al.*, 2007). به‌علاوه، در نتیجه سردسازی و ذخیره‌سازی اسپرم، محتوای کلسترول غشای پلاسمایی دچار تغییرات غیرفیزیولوژیکی می‌شود (Purdy and Graham, 2004). در جریان ظرفیت‌پذیری اسپرم، با خارج شدن بخشی از کلسترول، غشای پلاسمایی دچار تخریب شده و در نتیجه نفوذپذیری و سیالیت غشاء افزایش می‌یابد (Cross, 2003). تحقیقات نشان داده که پروتئین‌های پلاسمای منی می‌توانند سبب خروج کلسترول از ترکیب غشای پلاسمایی قوچ شوند (Roostaei-Ali Mehr *et al.*, 2015). اگرچه سانتریفیوژ پتانسیل آسیب رساندن به اسپرم را دارد، با این وجود استفاده از سانتریفیوژ می‌تواند سبب حذف ذرات اضافی مانند اسپرم‌های غیرطبیعی و مرده شود. اسپرم‌های مرده سبب تولید ROS می‌شوند که اثرات مضر بر اسپرم در طول انجماد دارند (Upreti *et al.*, 1999). هدف از مطالعه

یک گرم متیل-بتا-سیکلودکسترین در اتانول حل گردیده، سپس با ۲۰۰ میلی گرم کلسترول حل شده در کلروفرم (C2432, Sigma, USA) ترکیب گردید. در ادامه باقی مانده این محلول به وسیله گاز نیتروژن (قرار دادن لوله فالکن زیر لوله خروجی از کپسول ازت) حذف گردید. محلول کاربردی ترکیبی از ۵۰ میلی گرم کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین در یک میلی لیتر تریس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بود.

- **تحرك اسپرم:** جهت ارزیابی پارامترهای حرکتی اسپرم از سیستم CASA (computer aided semen analyses) (Video Test-Sperm 3.1, St. Petersburg, Russia) استفاده شد. بدین منظور بعد از یخ‌گشایی، ۷ میکرولیتر از نمونه اسپرم بر روی لام گرم ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و فراسنجه‌های تحرك کل (total motility; TM)، تحرك پیش‌رونده (progress motility; PM) و ویژگی‌های کینتیک حرکتی شامل میانگین سرعت در مسیر (Average pass velocity; VAP)، سرعت در مسیر منحنی (curvilinear velocity; VCL)، راستی مسیر طی شده (velocity of straight line; VSL) و جنبایی عرضی سر (straightness; STR) (amplitude; ALH) خطی بودن جنبایی (beat cross LIN) و تناوب عرضی زنش (frequency; BCF) با بزرگنمایی ۲۰× مورد ارزیابی قرار گرفتند.

- **زنده‌مانی اسپرم:** به منظور ارزیابی زنده‌مانی اسپرم از تکنیک رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. بدین منظور ۱/۶۷ گرم ائوزین Y (115935, Sigma, USA)، ۱۰ گرم نیگروزین (8005-03-6, Merck, Germany)

(P30% enzymatic) برای رقیق‌سازی نمونه‌های منی استفاده شد. نمونه‌های ترکیب شده اسپرم قوچ به ۸ قسمت مساوی تقسیم شدند. چهار نمونه منی با بافر تریس (108,382 Darmstadt, Germany) ترکیب گردیده سپس پلاسمای منی آن‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به وسیله سانتریفیوژ (۳۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۰ دقیقه) حذف گردید. چهار نمونه بعدی بدون این‌که سانتریفیوژ انجام شود، بوسیله بافر تریس و غلظت‌های مختلف کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین (C4805 - β -Cyclodextrin, Sigma, USA) (۰، ۰/۷۵، ۱/۵ و ۳ میلی گرم) به همراه ۷ درصد گلیسرول (G9012- Sigma, USA) مشابه با گروه اول رقیق‌سازی شدند. نمونه‌های رقیق‌سازی شده در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری (IMV, L'Aigle, France) ذخیره گردیده و در مدت ۲ ساعت به آرامی تا دمای ۴ درجه سلسیوس سرد شده و در ادامه به صورت افقی روی صفحات آلومینیومی به مدت ۷ دقیقه در معرض بخار ازت قرار گرفته و سپس به مدت ۴ هفته در ازت مایع نگه‌داری شدند. برای انجام آزمایشات لازم پایوت‌های منی منجمد از تانک ازت خارج گردیده و در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سلسیوس در مدت ۳۰ ثانیه یخ‌گشایی شدند. در نهایت منی یخ‌گشایی شده در درون یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری تخلیه گردیده، سپس جهت تطابق‌پذیری، به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد.

- **آماده‌سازی کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین:** کلسترول (C8503, Sigma, USA) با بتا-متیل-سیکلودکسترین (C4805, Sigma, USA) طبق پروتکل پیشنهادی ترکیب گردید (Purdy and Graham, 2004).

تقطیر شده) استفاده شد. ده میکرولیتر از نمونه منی با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰۰ میلی‌اسمول HOST به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ترکیب گردید. بعد از گرمخانه‌گذاری، ۵ میکرولیتر از مخلوط فوق، به وسیله میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۴۰× مورد ارزیابی قرار گرفت و اسپرم‌های با دم تاب‌خورده و متورم به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم در نظر گرفته شده و اسپرم‌های با دم صاف به‌عنوان اسپرم با غشای آسیب دیده تعیین شدند.

- ارزیابی میزان پراکسیداسیون چربی‌ها: برای ارزیابی غلظت مالون‌دی‌آلدئید (malonaldehyde; MDA) نمونه‌ها، به‌عنوان شاخصی از میزان پراکسیداسیون چربی‌ها، از واکنش تیوباربتوریک اسید (TBA) Esterbauer and (tiobarbitoretic acid) استفاده شد (Cheeseman, 1990). در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و شرایط اسیدی یک مولکول MDA با دو مولکول تیوباربتوریتیک اسید TBA واکنش داده و کمپلکس صورتی رنگی را به‌وجود می‌آورد. برای اندازه‌گیری غلظت MDA یک میلی‌لیتر از هر نمونه به دو میلی‌لیتر محلول حاوی ۲۰ درصد تری‌کلرواستیک اسید، (100810, Merck, Germany) یک میلی‌لیتر بوتیلتند هیدروکسی‌تولون (butylated hydroxytoluene) (817074, Merck, Germany) و یک میلی‌لیتر EDTA (ethylenediamine tetra-acetic acid) (108421, Merck, Germany) به‌منظور جداسازی پروتئین‌ها اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه با شتاب ۱۲۰۰ سانتی‌فیوژ شدند. سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی با یک میلی‌لیتر از محلول حاوی ۰/۶۷ درصد تیوباربتوریتیک اسید (T5500, Sigma, USA)

۲/۹ گرم سیترات سدیم (106448, Merck, Germany) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر مورد استفاده قرار گرفت. پس از یخ‌گشایی، ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۲۰ میکرولیتر از رنگ روی لام گرم مخلوط گردیده و به وسیله یک لام دیگر گسترش تهیه گردید. گسترش تهیه شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفته و پس از خشک شدن تعداد ۲۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۴۰× مورد بررسی قرار گرفتند. اسپرم‌هایی که به‌طور جزئی یا کامل رنگ بنفش به خود گرفته بودند، اسپرم مرده و اسپرم‌هایی که از ورود رنگ به‌داخل خود ممانعت کرده بودند، به‌عنوان اسپرم زنده محاسبه شدند.

- مورفولوژی اسپرم: به‌منظور ارزیابی درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی از محلول هانکوک (۶۲/۵ میلی‌لیتر فرمالین ۳۷ درصد، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سالین سدیم، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر) استفاده شد (Hancock et al., 1956). ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۱۵۰ میکرولیتر از محلول هانکوک مخلوط گردیده و در ادامه یک قطره از این مخلوط روی لام قرار گرفته و توسط یک لام پوشانده شد. با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۴۰× درصد اسپرم‌های طبیعی و غیرطبیعی شامل غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم محاسبه شدند.

- یکپارچگی غشاء پلاسمایی: جهت ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی از آزمون تورم اسپرم در محیط هیپواسموتیک HOST (۹ گرم در لیتر فروکتوز + ۴/۹ گرم سدیم سیترات محلول در یک لیتر آب دوبار

محلول H₂O₂ که غلظت نهایی آن در محیط ۰/۲۵ میلی مول بود، نیز اضافه گردید. میزان جذب نوری در ۴۱۲ نانومتر و به مدت ۵ دقیقه با استفاده از اسپکتروفتومتر ثبت شد.

- بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما منی: میزان TAC (total antioxidant capacity) بر اساس رنگ‌سنجی و با استفاده از کیت رندوکس (RANDOX Laboratories Ltd., UK) ارزیابی گردید. بدین منظور مایع منی منجمدشده به آرامی در حمام آبگرم ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه یخ‌گشایی شده و فوراً ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن ارزیابی شد. اندازه‌گیری مقادیر آنتی‌اکسیدان تام پلاسما منی بر اساس روش TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) انجام شد (Miller et al., 1993). این روش بر اساس مهارکنندگی با آنتی‌اکسیدان‌های جاذب رادیکال کاتیون (-Azino-2, 2', 2''-ABTS; di-[3-ethylbenzthiazoline sulphone]; ABTS) انجام می‌شود. در این روش ABTS با پراکسیداز و H₂O₂ جهت تولید کاتیون ABTS گرمخانه‌گذاری شده و رنگ پایدار آبی-سبز که حداکثر جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر است، تولید می‌شود که به وسیله اسپکتروفتومتری قابل اندازه‌گیری است.

- ارزیابی یکپارچگی غشای آکروزومی: جهت ارزیابی یکپارچگی غشای آکروزومی از دستورالعمل تیس و همکاران استفاده شد (Thys et al., 2009). بدین منظور ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شده و به وسیله سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه، ۶۰۰g) محلول رویی حذف گردید و پلت در ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد مخلوط گردید. در

به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس حرارت داده شدند. بعد از سرد شدن نمونه‌ها در داخل یخ در مدت ۳۰ دقیقه، عدد جذب MDA محلول رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) اندازه‌گیری شده و در پایان غلظت محاسبه گردید.

- بررسی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: نمونه‌های اسپرم پس از یخ‌گشایی به مدت ۱۵ دقیقه در شتاب ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جمع‌آوری شده و به هر کدام از نمونه‌ها ۵۰۰ میکرولیتر تریتون X-100 (T8787, Merck, Germany) اضافه گردید. از مایع رویی برای اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی اسپرم توسط کیت Ransod شرکت رندوکس (RANDOX Laboratories Ltd., UK) استفاده شد. اساس این آزمایش تسریع دیسموتاسیون رادیکال O₂ و تبدیل آن به H₂O₂ توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است.

- اندازه‌گیری آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز: برای اندازه‌گیری مقدار این آنزیم نیز از کیت Ransel شرکت رندوکس استفاده شد (RANDOX Laboratories Ltd., UK). مخلوط واکنش شامل ۵۰ میلی‌مولار پتاسیم فسفات (pH=۷)، ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱ میلی‌مولار سدیم آزید (NaN₃)، ۰/۲ میلی‌مولار نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده (NADPH)، یک واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر گلوکاتایون ردوکتاز و ۱ میلی‌مولار GSH بود. ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر مایع منی به ۰/۸ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه قبل از شروع واکنش در ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. علاوه بر آن ۰/۱ میلی‌لیتر از

یافته‌ها

پارامترهای TM، PM، VSL، VCL و BCF بعد از فرآیند یخ‌گشایی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند (جدول ۱). همچنین مشاهده شد که PM، TM، VSL، VCL و BCF در سطح ۱/۵ میلی‌گرم کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکستین بیشترین مقدار را در مقایسه با سایر سطوح (۰، ۰/۷۵ و ۳ میلی‌گرم) داشتند ($p < ۰/۰۵$). از نظر سایر پارامترهای حرکتی مانند STR، LIN، VAP و ALH تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نشد. همچنین تفاوت معنی‌داری بین دو پروتکل فریز در خصوص پارامترهای TM، PM و VCL وجود داشت ($p < ۰/۰۵$). (جدول ۴). یکپارچگی غشای پلاسمایی در گروه تیماری ۱/۵ میلی‌گرم CLC بیشتر از سایر گروه‌ها و همچنین یکپارچگی غشای پلاسمایی در گروه تیماری بدون سانتریفیوژ در مقایسه گروه با سانتریفیوژ به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($p < ۰/۰۵$). (جدول ۲ و ۵). تیمارهای مختلف کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکستین و پروتکل‌های فریز اثر معنی‌داری بر زنده‌مانی و میزان اسپرم‌های غیرطبیعی نداشتند. غلظت MDA در گروه تیماری ۱/۵ میلی‌گرم کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکستین دارای کمترین میزان (۱/۸ نانومول بر میلی‌لیتر) در مقایسه با سایر گروه‌ها بود ($p < ۰/۰۵$). (جدول ۳). سطح ۱/۵ میلی‌گرم کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکستین به‌طور معنی‌داری باعث افزایش سطح گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) در مقایسه با گروه کنترل شد. ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی (TAC) در گروه تیماری ۱/۵ میلی‌گرم کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکستین در مقایسه با سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری بالاتر بود

ادامه اسپرم‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه حاصله روی لام قرار داده شد و فرصت داده شد تا اتانول آن تبخیر گردد، سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول PSA (pisum sativum agglutinin) (۵۰ $\mu\text{l/ml}$) بر نمونه‌های روی لام اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. در ادامه لام‌ها ۱۵ بار در داخل آب دوبار تقطیر فرو برده شدند. پس از خشک شدن به لام‌ها گلیسرول اضافه گردید و با یک لامل ۲۴×۲۴ میلی‌متری پوشانده شدند. در نهایت تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنس (Olympus IX81 fluorescence microscope, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰× مورد ارزیابی قرار گرفت. اسپرم‌هایی که سرشان رنگ سبز فلوروسنس به خود گرفته بود، به‌عنوان اسپرمی با غشای آکروزومی سالم و یکپارچه در نظر گرفته شد.

- تحلیل آماری داده‌ها: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA) بر اساس رویه GLM (generalized linear model) مورد آنالیز قرار گرفتند. طرح آزمایشی مورد استفاده طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل ۲×۴ با ۸ تیمار و ۵ تکرار بود که متغیرها شامل سطوح مختلف کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکستین و دو پروتکل فریز (با و بدون سانتریفیوژ) و اثر متقابل این عوامل بودند و نتایج به شکل $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش گردیدند. اختلاف آماری بین گروه‌ها با استفاده از آزمون توکی تعیین گردید و سطح معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

($p < 0/05$) همچنین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در گروه تیماری ۱/۵ میلی گرم کلاسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ($p < 0/05$). درصد اسپرم‌های با غشای آکروزوم یکپارچه در گروه ۱/۵ میلی گرم کلاسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین در مقایسه با گروه

کنترل به طور معنی داری بالاتر بود ($p < 0/05$). همچنین بین دو پروتکل فریز از نظر پارامترهای TAC، SOD و GPX تفاوت معنی داری وجود داشت ($p < 0/05$)، (جدول ۶). لازم به ذکر است که اسپرم‌های دارای سر، به رنگ سبز فلورسانس، به عنوان اسپرم‌های با غشای آکروزومی یکپارچه در نظر گرفته شدند (شکل ۱).

جدول ۱- تاثیر سطوح مختلف کلاسترول بر فراسنجه‌های تحرک اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

تیمار (میلی گرم کلاسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین)	تحرک کل (درصد)	حرکت پیشرونده (درصد)	سرعت در مسیر مستقیم (میکرون بر ثانیه)	سرعت در مسیر منحنی (میکرون بر ثانیه)	میانگین سرعت در مسیر (میکرون بر ثانیه)	درصد خطی بودن تحرک	راستی مسیر طی شده (درصد)	تحرک عرضی سر (میکرون)	تناوب عرضی زنبش (هرتز)
کنترل (۰ میلی گرم کلاسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین)	۵۰/۳ ^c	۱۸/۴ ^c	۶۰/۳ ^b	۱۱۸ ^b	۷۳/۰۲	۵۰/۷	۸۳	۶/۹۴	۲۲/۸ ^b
۰/۷۵ میلی گرم کلاسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین	۵۳/۷ ^b	۲۰/۴ ^b	۶۳/۳ ^{ab}	۱۲۵ ^a	۷۴/۴۲	۵۰/۴	۸۵/۳	۷/۲۹	۲۳/۶ ^b
۱/۵ میلی گرم کلاسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین	۵۸/۳ ^a	۲۳/۹ ^a	۶۶/۶ ^a	۱۳۱ ^a	۷۸/۰۷	۵۰/۵	۸۵/۵	۷/۷۵	۲۶/۶ ^a
۳ میلی گرم کلاسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین	۴۸/۳ ^c	۱۶/۵ ^d	۶۲/۱ ^{ab}	۱۲۵ ^a	۷۴/۱۱	۴۹/۴	۸۴/۱	۷/۴۴	۲۴/۵ ^{ab}
خطای استاندارد میانگین	۰/۵۶۷	۰/۲۴۷	۱/۶۰۳	۱/۸۲۰	۱/۵۶۲	۱/۳۰۵	۱/۸۴۰	۰/۳۱۸	۰/۶۹۲

میانگین‌های ارائه شده در هر ستون با حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی دار می‌باشد ($p < 0/05$).

جدول ۲- تاثیر سطوح مختلف کلاسترول بر صفات ارزیابی اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

تیمار (میلی گرم کلاسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین)	ناهنجاری اسپرم (درصد)	یکپارچگی غشاء پلاسمایی (درصد)	زنده‌مانی (درصد)	یکپارچگی غشاء آکروزوم (درصد)
کنترل (۰ میلی گرم کلاسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین)	۱۸/۰۲	۴۸/۱ ^b	۵۳/۳	۸۰/۶ ^b
۰/۷۵ میلی گرم کلاسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین	۱۷/۳۲	۵۰ ^{ab}	۶۰	۸۳/۳ ^{ab}
۱/۵ میلی گرم کلاسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین	۱۵/۵۵	۵۲/۹ ^a	۶۳/۷	۸۷ ^a
۳ میلی گرم کلاسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین	۱۷/۱۹	۴۹/۴ ^{ab}	۶۰/۱	۸۴/۴ ^{ab}
خطای استاندارد میانگین	۰/۸۲۴	۱/۱۳۷	۱/۴۶۴	۱/۳۹۵

میانگین‌های ارائه شده در هر ستون با حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی دار می‌باشد ($p < 0/05$).

جدول ۳- تاثیر سطوح مختلف کلسترول بر میزان مالون‌دی‌آلدئید و وضعیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

تیمار (میلی گرم کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین)	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/ml)	ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (mmol/l)	سوپر اکسید دیسموتاز (U/mg)	گلو‌تاتیون پراکسیداز (IU/g protein)
کنترل (۰ میلی گرم کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین)	۲/۴۴ ^a	۱/۰۵ ^b	۹۳/۵۴ ^b	۵۴/۰۵ ^b
۰/۷۵ میلی گرم کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین	۲/۰۰ ^b	۱/۱۷ ^b	۹۷/۲۴ ^{ab}	۵۶/۱۳ ^{ab}
۱/۵ میلی گرم کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین	۱/۸۰ ^b	۱/۳۶ ^a	۱۰۳ ^a	۵۹/۴۴ ^a
۳ میلی گرم کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین	۲/۰۳ ^b	۱/۱۸ ^b	۹۹ ^{ab}	۵۷/۵۰ ^{ab}
خطای استاندارد میانگین	۰/۰۹۲	۰/۰۳۵	۱/۳۶۴	۱/۳۶۴

میانگین‌های ارائه شده در هر ستون با حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).

جدول ۴- تاثیر سانتریفیوژ بر فراسنجه‌های تحرک اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

تیمار	تحرک کل (درصد)	حرکت پیش رونده (درصد)	سرعت در مسیر مستقیم (میکرون بر ثانیه)	سرعت در مسیر منحنی (میکرون بر ثانیه)	میانگین سرعت در مسیر (میکرون بر ثانیه)	درصد خطی بودن (درصد)	راستی مسیر طی شده (درصد)	تحرک عرضی سر (میکرون) (هر تریز)	تناوب عرضی زنش (هر تریز)
بدون سانتریفیوژ	۵۳/۸ ^a	۲۱/۸ ^a	۶۳/۷	۱۲۸ ^a	۷۶/۳	۴۶/۶	۸۳/۶	۷/۴۵	۲۴/۷
با سانتریفیوژ	۵۱/۴ ^b	۱۷/۷ ^b	۶۲/۵	۱۲۳ ^b	۷۳/۵	۵۰/۸	۸۵/۳	۷/۲۷	۲۴
خطای استاندارد میانگین	۰/۴۰۱	۰/۱۷۵	۱/۱۳۴	۱/۲۸۷	۱/۱۰۴	۰/۹۲۳	۱/۳۰۱	۰/۲۲۵	۰/۴۸۹

میانگین‌های ارائه شده در هر ستون با حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).

جدول ۵- تاثیر سانتریفیوژ بر صفات ارزیابی اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

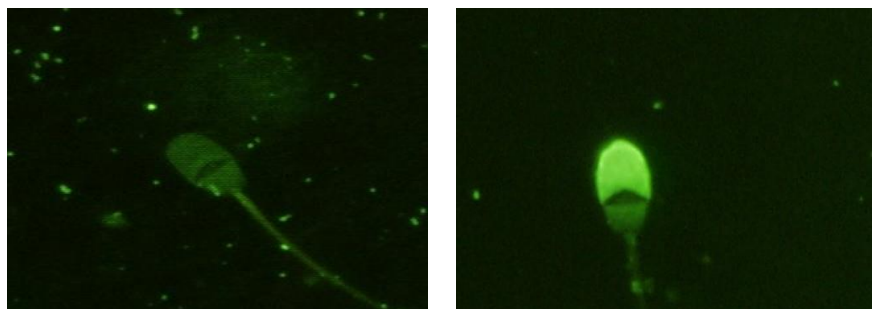
تیمار	ناهنجاری اسپرم (درصد)	یکپارچگی غشاء پلاسمایی (درصد)	زنده‌مانی (درصد)	یکپارچگی غشاء آکروزوم (درصد)
بدون سانتریفیوژ	۱۶/۴۷	۵۱/۵ ^a	۶۲/۱۵	۸۴/۶۵
با سانتریفیوژ	۱۷/۵۶	۴۸/۷ ^b	۵۸/۹	۸۳
خطای استاندارد میانگین	۰/۵۸۲	۰/۸۰۴	۱/۰۳۵	۰/۹۸۷

میانگین‌های ارائه شده در هر ستون با حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).

جدول ۶- تاثیر سانتریفیوژ بر مالون‌دی‌آلدئید و وضعیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

تیمار	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/ml)	ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (mmol/l)	سوپراکسید دیسموتاز (U/mg)	گلو‌تاتیون پراکسیداز (IU/g protein)
بدون سانتریفیوژ	۲/۱۱	۱/۴۱ ^a	۱۰۲ ^a	۵۸/۱۱ ^a
با سانتریفیوژ	۲/۰۲	۰/۹۷۹ ^b	۹۴ ^b	۵۵/۴۴ ^b
خطای استاندارد میانگین	۰/۰۶۵	۰/۰۲۵	۱/۳۵۷	۰/۹۶۵

میانگین‌های ارائه‌شده در هر ستون با حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0/05$).



شکل ۱- سمت راست اسپرم با آکروزوم یکپارچه و سمت چپ اسپرم با آکروزوم غیریکپارچه

بحث و نتیجه‌گیری

دارای نسبت کمی از کلسترول به فسفولیپید (۳۸ درصد) بوده و به شوک سرماییی خیلی حساس می‌باشد، به‌خصوص زمانی که در معرض درجه حرارت‌های بحرانی قرار بگیرد (Darin and White, 1977). تحقیقات نشان داده که یکسری از پروتئین‌ها سبب خروج کلسترول از ترکیب غشای پلاسمایی می‌شوند (Roostaei-Ali Mehr *et al.*, 2015). نتایج حاصله از تحقیق حاضر، نشان‌دهنده اثر مثبت CLC بر TM، PM، VSL، VCL و BCF بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی اسپرم می‌باشد. در مطالعه حاضر، بیشترین اثر حفاظتی CLC در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم مشاهده شد، به‌طوری‌که در این غلظت، TM، PM، VSL، VCL و BCF به شکل معنی‌داری بهبود یافت. گزارش شده که یک رابطه مثبتی بین تحرک اسپرم و میزان باروری اسپرم

اساس عملکرد سلول بر این اصل استوار است که غشای سلولی تحت تاثیر اثرات محیط قرار نگیرد. ترکیب غشای سلولی بوسیله یکسری پیوندهای غیرکوالان سازماندهی شده است. کلسترول دارای نقش کلیدی در نفوذپذیری (Ohvo-Rekila *et al.*, 2002)، سیالیت و سازماندهی چربی‌های غشای سلولی است (Witte and Schafer-Somi, 2007). میزان حساسیت اسپرم پستانداران به شوک سرماییی، به ترکیبات فسفولیپیدی غشا و نسبت بین کلسترول و فسفولیپیدها وابسته است (Holt, 2000). گزارش شده که تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی، سبب تخریب غشای پلاسمایی، غشای آکروزومی و سایر ساختارهای داخل سلولی می‌شود (Futino *et al.*, 2010). اسپرم قوچ

قوچ با لیسیتین سویا جهت حذف پلاسمای منی ضروری نیست. در این خصوص نتایج تحقیقات نشان داده که سانتریفیوژ، اثر منفی بر تحرک و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم قوچ (Gil et al., 1999) و بز دارد (Ritar, 1993). همچنین گزارش شده که سانتریفیوژ سبب ایجاد استرس‌های مکانیکی شده و زنده‌مانی اسپرم را هم تحت تاثیر قرار می‌دهد (Gil et al., 1999). یکپارچگی غشای پلاسمایی برای حفظ عملکرد اسپرم در جریان نگاه‌داری در لوله تناسلی جنس ماده ضروری بوده و تخریب یکپارچگی غشای پلاسمایی در طول انجماد ممکن است منجر به آسیب و حتی مرگ سلول شود (Holt and North, 1994). بعد از یخ‌گشایی در گروه تیمار شده با ۱/۵ میلی‌گرم CLC، درصد اسپرم‌های با غشای پلاسمایی یکپارچه بالاترین مقدار (۵۲/۹ درصد) و اختلاف آن با سایر تیمارهای آزمایشی معنی‌دار بود. سلمانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که یکپارچگی غشای پلاسمایی رابطه مستقیمی با تحرک اسپرم دارد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که اثرات مثبت سطح ۱/۵ میلی‌گرم CLC بر روی TM و برخی پارامترهای حرکتی اسپرم ممکن است مربوط به یکپارچگی غشای پلاسمایی باشد. مطابق جدول ۲ تحقیق حاضر، درصد اسپرم‌های با غشای آکروزوم یکپارچه در گروه تیمار شده با ۱/۵ میلی‌گرم CLC، بالاترین مقدار (۸۷ درصد) در مقایسه با سایر گروه‌ها بود. مشابه با یافته‌های پژوهش حاضر، نتایج حاصله از مقایسه سطوح مختلف CLC (۰، ۱/۵ و ۴/۵ میلی‌گرم) نشان داده که درصد اسپرم‌های با غشای آکروزومی یکپارچه بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی به ترتیب (۰، ۴۹/۹ و ۵۱/۹) بوده و مشاهده شده که از

منجمد شده در قوچ وجود دارد (Del et al., 2013). بنابراین تحرک اسپرم پارامتر مهمی برای ارزیابی عملکرد اسپرم محسوب می‌شود. نتایج تحقیق حاضر در توافق با نتایج پژوهشی در سال ۲۰۰۰ می‌باشد که اثر حفاظتی CLC بر تحرک اسپرم در طول انجماد را نشان داده است (Combes et al., 2000). مکانیسم پیشنهادی برای افزایش تحرک اسپرم بعد از تیمار شدن با CLC، نفوذ آن به داخل غشای پلاسمایی و در نتیجه محافظت از میتوکندری می‌باشد. همچنین نتایج تحقیق حاضر در توافق با نتایج پژوهشی است که در سال ۲۰۱۵ بر روی اسپرم شتر انجام گرفته است، به‌طوری‌که در آن تحقیق هم مشابه مطالعه ما، استفاده از ۱/۵ میلی‌گرم CLC باعث بهبود TM و PM اسپرم شده است (Elizabeth et al., 2015). همچنین گزارش شده که مشابه با تحقیق حاضر، اضافه کردن کمتر از ۲ میلی‌گرم کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکستین نتایج بهتری داشته است (Awad, 2011). از طرف دیگر در پژوهش حاضر مشخص گردید که عمل سانتریفیوژ اثر معنی‌داری بر میزان اسپرم‌های غیرطبیعی و زنده‌مانی اسپرم بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی ندارد. زنده‌مانی اسپرم به‌طور معنی‌داری با تحرک اسپرم و باروری آن در ارتباط است و افزایش زنده‌مانی اسپرم تحت تاثیر CLC بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی ممکن است در نتیجه اثر تثبیت‌کنندگی CLC بر روی غشای پلاسمایی باشد (Combes et al., 2000). از طرف دیگر با توجه به نتایج جدول ۵ تحقیق حاضر (درصد اسپرم‌های با غشای پلاسمایی یکپارچه در گروه تیمار بدون سانتریفیوژ نسبت به گروه با سانتریفیوژ، بالاتر بود)، به‌نظر می‌رسد که عمل سانتریفیوژ منی رقیق‌سازی شده

این نظر، تفاوت معنی‌داری بین سطوح ۱/۵ و ۴/۵ میلی‌گرم وجود نداشته است (Elizabeth *et al.*, 2105). سلول اسپرم و پلاسمای منی دارای ترکیبات مختلف جاروب‌کننده ROS (گونه‌های فعال اکسیژن) می‌باشند (Partyka *et al.*, 2012a). نشان داده شده که آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما و حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشد و از اینرو سبب جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌های غشای پلاسمایی می‌شود. همچنین آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز می‌تواند باعث تبدیل هیدروژن پروکسید به آب و اکسیژن و در نتیجه کاهش ترکیبات ROS شود (Ochsendorf, 1999). علاوه بر آن، آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز مانع اکسیداسیون ترکیبات آلی، مخصوصاً چربی‌ها می‌شود (Partyka *et al.*, 2012b). سطح ۱/۵ میلی‌گرم CLC به‌طور معنی‌داری باعث افزایش سطح گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در مقایسه با سایر گروه‌ها گردید (جدول ۳). حذف پلاسما توسط سانتریفیوژ و رقیق‌سازی زیاد، سیستم آنتی‌اکسیدانی اسپرم را در پستانداران بعد از فرایند انجماد-یخ‌گشایی تحت تاثیر قرار می‌دهد (Bilodeau *et al.*, 2000). احتمالاً حذف جزئی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در پلاسمای منی سبب آسیب به اسپرم و ایجاد حساسیت بالا در برابر خطر اکسیداسیون بعد از یخ‌گشایی می‌شود.

در نتایج تحقیق حاضر، سطح اپتیمم CLC جهت انجماد اسپرم قوچ ۱/۵ میلی‌گرم به ازای $10^8 \times 1/2$ اسپرم، به‌دست آمد که مشابه با یافته‌های تحقیقات قبلی بر روی گاو و اسب می‌باشد (Moore *et al.*, 2005;)

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه تبریز به خاطر فراهم کردن امکانات اجرای این تحقیق قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

منابع

- Ahmad, E., Aksoy, M., Serin, I., Kucuk, N., Ceylan, A., Ucan, U., *et al.* (2013). Cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment of ram spermatozoa protects structural integrity of plasma membrane during osmotic challenge and reduces their ability to undergo acrosome reaction in vitro. *Small Ruminant Research*, 115(1-3): 77-81.
- Awad, M.M. (2011). Effects of sub-optimal glycerol concentration and cholesterol-loaded cyclodextrin in a Tris-based diluent on cryopreserved ram sperm longevity and acrosomal integrity. *Small Ruminant Research*, 100(2-3): 164-168.
- Bilodeau, J.F., Chatterjee, S., Sirard, M.A. and Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 55(3): 282-288.
- Bucak, M.N., Atessahin, A., Varisli, Ö., Yüce, A., Tekin, N., Akcay, A., *et al.* (2007). Influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze thawing process. *Theriogenology*, 67(5): 1060-1067.
- Combes, G.B., Varner, F., Schroeder, R.C. and Burghard, T.L. (2000). Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 56(56): 127-132.
- Cross, N.L. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation, *Biology Reproduction*, 59(1): 7-11.
- Cross, N.L. (2003). Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biology of Reproduction*, 69(2): 529-534.
- Darin-Bennett, A. and White, I.G. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14(4): 466-470.
- Del, E., Olmo, A., Bisbal, A., Maroto-Morales, O., Garcia-Alvarez, M., Ramon, P., *et al.* (2013). Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Animal Reproduction Science*, 138(1-2): 102-109.
- Elizabeth, G., Crichton, A., Budhan, S., Pukazhenth, B., Billah, A., Julian, A., *et al.* (2015). Cholesterol addition aids the cryopreservation of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) spermatozoa. *Theriogenology*, 83(2): 168-174.
- Ellington, J.E., Samper, J.C., Jones, A.E., Oliver, S.A., Burnett, K.M., Wright, R.W., *et al.* (1999). In vitro interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products. *Animal Reproduction Science*, 56(1): 51-65.
- Esterbauer, H. and Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186 407-421.
- Futino, D., Mendes, M., Matos, W., Mondadori, R. and Lucci, C. (2010). Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(2): 214-220.
- Gil, J., Söderquist, L. and Rodríguez-Martínez, H. (1999). Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram sperm. *Theriogenology*, 54(1): 93-108.
- Hancock, J.L. (1956). The morphology of boar spermatozoa. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 76(3): 84-97.
- Holt, W.V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1): 47-58.
- Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska, E. and Madsen, F.C. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*, 76(9): 2812-2823.
- Moore, A.I., Squires, E.L. and Graham, J.K. (2005). Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 51(3): 241-249.
- Naseer, Z., Ahmad, E., Aksoy, M., Küçük, N., Serin, İ., Ceylan, A., *et al.* (2015). Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. *Cryobiology*, 71(1): 18-23.

- Ochsendorf, F. (1999). Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*, 5(5): 399-420.
- Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimaki, P. and Slotte J.P. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress Lipid Research*, 41(1): 66-97.
- Partyka, A., Łukaszewicz, E. and Nizański, W. (2012a). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, 77(8): 1497-1504.
- Partyka, A., Łukaszewicz, E. and Nizański, W. (2012b). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in avian semen. *Animal Reproduction Science*, 134(3-4): 184-190.
- Purdy, P.H. and Graham J.K. (2004). Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 48(1): 36-45.
- Ritar, A.J. (1993). Control of ovulation, storage of semen and artificial insemination of fiber-producing goats in Australia a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 33: 807-820.
- Roostaei, A.M.M., Mousavi, M. and Ghadamyari, M. (2015). Effect of seminal plasma proteins on membrane cholesterol efflux of ram epididymal spermatozoa. *Small Ruminant Research*, 129: 88-91.
- Salmani, H., Nabi, M.M., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, M.B., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., *et al.* (2013). Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Research*, 112(1-3): 123-127.
- Serin, I., Aksoy, M. and Ceylan, A. (2011). Cholesterol-loaded cyclodextrin inhibits premature acrosomal reactions in liquid-stored rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 123(1-2): 106-111.
- Sion, B., Janny, L., Boucher, D. and Grizard, G. (2004). Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryopreserved spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 27(2): 108-114.
- Thys, M., Nauwynck, H., Maes, D., Hoogewijs, M., Vercauteren, D., Rijsselaere, T., Favoreel, H., Van Soom, A., *et al.* (2009). Expression and putative function of fibronectin and its receptor (integrin $\alpha 5 \beta 1$) in male and female gametes during bovine fertilization in vitro. *Reproduction* 138(3): 471-482.
- Upreti, G.C., Hall, E.L., Koppens, D., Oliver, J.E. and Vishwanath, R. (1999). Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. *Animal Reproduction Science*, 56(2): 107-121.
- Witte, T.S. and Schäfer-Somi, S. (2007). Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Animal and Reproduction Science*, 102(3-4): 181-193.