



حفظ پارامترهای کیفی اسپرم خروس با افزودن ترکیبات کلسیمی به رقیق کننده لیک به مدت ۷۲ ساعت

پرنده فرزام^۱، امجد فرزین پور^۲، اسعد وزیری^۲، سینا نادری^۱

^۱ دانش آموخته دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران

^۲ گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران

تاریخ دریافت: ۳۰ شهریور ماه ۱۴۰۱، تاریخ پذیرش: ۲۹ آبان ماه ۱۴۰۱

doi 10.22059/jvr.2022.346425.3290



20.1001.1.20082525.1401.77.4.4.5

چکیده

زمینه مطالعه: ذخیره سازی منی پرندگان در دمای ۴ درجه سانتی گراد باعث کاهش تحرک اسپرم و افت کیفیت مایع منی می شود.

هدف: تعیین اثر افزودن ترکیبات کلسیمی: کلسیمفور (CMP)، کلسیم گلوکونات (CG) و کلسیم کلراید (CaCl₂) بر میزان جنبایی و تحرک پیشرونده اسپرم منی خروس نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد یخچال بود.

روش کار: در مطالعه حاضر از ۵ قطعه خروس نژاد لاری ۴۵ هفته استفاده شد. ترکیبات مختلف کلسیمی در غلظت‌های ۰/۵۶، ۰/۰۵۶ و ۰/۰۰۵۶ میلی مولار به رقیق کننده لیک اضافه شدند. نمونه‌های منی رقیق شده پس از تیمار بندی جهت جلوگیری از ایجاد شوک حرارتی تا دمای نگهداری خنک گردید و سپس به داخل یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد انتقال داده شد. فراسنجه‌هایی که از اهمیت بیشتر برخوردار بودند مانند: جنبایی، تحرک پیش رونده به صورت چشمی با استفاده از لنز ۴۰ میکروسکوپ نوری، زنده مانی با استفاده از روش رنگ آمیزی اتوزین-نگروزین، درصد سلامت آکروزوم به روش فرمالین سیترات، سلامت غشاء سلولی با تست هایپواسموتیک، میزان پراکسیداسیون لیپید و واکنش اسپرم غشاء پری‌وتیلین در ۷۲ ساعت بعد از نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد، مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: بر اساس نتایج به دست آمده ترکیبات مختلف کلسیم در اکثر غلظت‌های استفاده شده بعد از ۷۲ ساعت توانست تأثیر معنی داری بر پارامترهای زنده‌مانی، جنبایی و تحرک پیش رونده نشان دهد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری نهایی: اکثر فراسنجه‌های اسپرمی در گروه شاهد بعد از این مدت نگهداری در یخچال کاهش یافت ولی اضافه کردن کلسیم گلوکونات (۰/۵۶، ۰/۰۵۶ و ۰/۰۰۵۶)، کلسیمفور (۰/۵۶، ۰/۰۵۶ و ۰/۰۰۵۶) و کلسیم کلراید (۰/۵۶، ۰/۰۵۶ و ۰/۰۰۵۶) به رقیق کننده منی سبب حفظ شاخص‌های کیفی اسپرم خروس گردید.

کلمات کلیدی: اسپرم، تحرک، خروس، زنده‌مانی، کلسیم

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: امجد فرزین پور، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران

مقدمه

اسپرم و سطح تستوسترون خروس‌های گله مرغ مادر ارتباط دارد (۳). تلقیح مصنوعی به عنوان یکی از تکنیک‌های مطرح در گله‌های مرغ مادر و بوقلمون می‌تواند جایگزین مناسبی برای جفتگیری طبیعی (۴) و کاهش هزینه‌های اسپاکنگ (spiking) (۵) و همچنین انتخاب پرندگانی با صفات برتر ژنتیکی از گله‌هایی با سن بالا باشد (۶)، بنابراین استفاده از تلقیح مصنوعی در عملیات مرغداری در حال گسترش است (۷). توانایی باروری اسپرم منی

یکی از مشکلات اساسی صنعت طیور کاهش باروری گله‌های مرغ مادر به دلیل انتخاب ژنتیکی انجام شده برای بهبود صفات تولیدی است که این صفات دارای رابطه منفی با باروری می‌باشند (۱). انتخاب ژنتیکی لاین‌ها در راستای تولید جوجه‌هایی با رشد سریع و وزن زیاد کشتار است که این اهداف با صفات تولید مثلی از جمله نرخ باروری در تضاد می‌باشد (۲). کاهش میزان باروری از ۴۵ هفتگی با عوامل مختلفی مانند کاهش توده بیضه، میزان تولید

آکسونم‌های جهش یافته که کاملاً فاقد دستگاه مرکزی هستند بازگردانند. علاوه بر این، فعالیت داینین به صورت خطی با افزایش غلظت کلسیم افزایش می‌یابد زیرا تغییر تصویر موج نامتقارن به متقارن ناشی از کلسیم تا حدودی ناگهانی با افزایش کلسیم اتفاق می‌افتد (۲۰). داینین‌های آکسونمال تاژک دارای زیر واحدهای Ca^{2+} -binding هستند و احتمالاً مستقیماً توسط یون کلسیم تنظیم می‌شوند. یکی از اجزای بازوی بیرونی داینین نیز دارای محل‌های اتصال یون کلسیم است (۲۱). پروتئین دیگری به نام کالاکسین نیز در بازوی بیرونی داینین وجود دارد که یک تنظیم کننده بالقوه کلسیم است (۲۲).

اسپرم دارای چندین محل برای اتصال یون کلسیم می‌باشد که می‌تواند زنجیره‌ای از رویدادها را برای تغییر ضربان تاژک آغاز کند. کالمودولین (CaM) یک گیرنده یون کلسیم است که در قسمت اصلی تاژک قرار گرفته است (۲۳). دینامیک کلسیم نقش زیادی در شروع و حفظ تحرک بیش فعال دارد، که برای رسیدن و بارور کردن تخمک برای اسپرم پستانداران حیاتی است (۲۴).

در اسپرم دو منبع اصلی برای یون کلسیم در اسپرم وجود دارد ۱- برخی از آن‌ها در یک پمپ کلسیم واقع در سر اسپرم ذخیره می‌شوند که یک پوشش هسته‌ای اضافی در موقعیت گیرنده IP_3 در ناحیه گردن که از نوع شبکه آندوپلاسمی (RNE) می‌باشد و ۲- مابقی کلسیم در میتوکندری قسمت میانی قرار دارند (۲۵). مجموعه RNE در طیف گسترده‌ای از پستانداران از جمله انسان (۲۶)، همستر (۱۳)، خفاش (۲۷)، گاو نر (۲۸) و موش (۲۹) حفظ می‌شوند. به طور کلی می‌توان بیان کرد که در پستانداران این مجموعه RNE در قاعده تاژک همانند یک مکان ذخیره کلسیم عمل می‌کند که با تحریک شدن گیرنده آن باعث آزاد سازی کلسیم از این ذخایر می‌شود. مطالعات نشان داده است که آزاد سازی کلسیم در شروع حرکت اسپرم نقش دارد (۱۶). این در حالی است که ذخایر کلسیمی شبکه آندوپلاسمی در پرندهگان گزارش نشده است و میتوکندری‌ها مخزن اصلی کلسیم محسوب می‌گردند. نشان داده شده است که غلظت یون کلسیم در مایع منی در نرهای مبتلا به آستنوزواسپرمی به طور قابل توجهی کاهش یافته است. همبستگی قوی بین میزان کلسیم منی، کاهش تحرک و مورفولوژی غیر طبیعی آن‌ها وجود دارد (۳۰). براساس توضیحات فوق در مطالعه حاضر این فرضیه پیشنهاد گردید که در ترکیبات رقیق کننده‌های منی پستانداران به دلیل وجود منابع کلسیمی داخل اسپرمی نیازی به اضافه کردن ترکیبات کلسیم نیست و

پرندهگان در شرایطی که رقیق نشده باشد پس از گذشت یک ساعت به شدت کاهش می‌یابد (۸). لازم است که رقیق کننده‌های اسپرم شرایط متعادل و حفاظتی را برای سلول ایجاد نمایند (۹). مواد معدنی در باروری و فعالیت سلول اسپرم دارای نقش بسزایی هستند (۱۰). کلسیم فعالیت حرکتی اسپرم را تحریک می‌کند و در واکنش آکروزومی اسپرم با غشاء سلول تخمک نقش پایه‌ای داشته و تا حدودی می‌توان جزو مهم‌ترین جزء شروع کننده لقاح دو سلول نر و ماده باشد (۱۱). نقش کلسیم فقط به تحرک اسپرم محدود نشده و گزارش شده که کلسیم در ظرفیت پذیری اسپرم هم نقش دارد (۱۲). این فرآیند شامل فعال سازی یک شبکه سیگنالی‌نگ درون سلولی پیچیده است (۱۳، ۱۴). آگروسیتوز آکروزومی (AE) یک رویداد آگروسیتوز وابسته به کلسیم است (۱۵). ذکر این نکته ضروری است که باز شدن کانال‌های کلسیمی اسپرم باعث ایجاد ظرفیت و متعاقباً AE می‌شوند (۱۶). دو کانال کلسیمی باروری نرها را تنظیم می‌کند: کانال Orail، که ورود کلسیم به مخازن را تنظیم می‌کند و کانال Catsper، که گسترده‌ترین کانال‌های کلسیمی در اسپرم است و غلظت این یون را در داخل سلولی کنترل می‌کند (۱۷). کانال Catsper یک کانال اختصاصی کلسیمی در اسپرم قابل نفوذ، وابسته به pH و وابسته به ولتاژ پایین است که برای شروع فعالیت تاژک اسپرم، کموتاکسی به سمت تخمک، ظرفیت سازی و واکنش آکروزوم ضروری است، همه این رویدادهای فیزیولوژیکی نیاز به ورود کلسیم به داخل سلول‌های اسپرم می‌باشند. در بیشتر پستانداران، تحرک بیش فعال اسپرم بستگی به هجوم کلسیم به سیتوپلاسم اسپرم یا از فضای خارج سلولی یا آزاد شدن از اندامک‌های درون سلولی دارد بنابراین، کانال Catsper، حداقل، رفتار شنای اسپرم را کنترل می‌کند (۱۸).

تحرک مژه‌ها و تاژک با تغییرات کلسیم داخل فلاژل تنظیم می‌شود. با این حال، مکانیسم مولکولی که توسط آن کلسیم حرکت را کنترل می‌کند ناشناخته است. کلسیم حرکت تاژک را با کنترل لغزش میکروتوبول مبتنی بر داینین تنظیم می‌کند و جفت میکروتوبول مرکزی و بازوهای شعاعی در این تنظیم نیز نقش دارند. کالمودولین و کیناز ۲ وابسته به کالمودولین ممکن است واسطه سیگنال کلسیم باشند و این که دستگاه مرکزی و پره‌های شعاعی اجزای کلیدی مسیر سیگنال‌دهی کلسیم هستند (۱۹). سرعت لغزش میکروتوبول مبتنی بر داینین در سلول‌های جهش یافته که دارای دستگاه مرکزی معیوب، نقش کلسیم را در تعدیل فعالیت داینین تأیید کرد. مطالعات نشان داده است که بافرهایی با غلظت کلسیم بالا، فعالیت داینین را به سطوح تقریباً نرمال در

۰/۰۶۸ گرم منیزیم کلراید به همراه ۵ گرم نگرزین و ۱ گرم ائوزین در ۱۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر حل گردید. ۵ میکرولیتر از محلول اسپرم رقیق شده را با ۱۰ میکرولیتر محلول رنگی روی یک لام ریخته و با هم مخلوط کرده سپس گسترشی از آن تهیه شده و اسلاید حاصل را در دمای اتاق و در یک جای عاری از گرد و خاک قرار داده تا کاملاً خشک شود. در گام بعدی توسط یک میکروسکوپ نوری (مدل Olympus.ch-2) در ۱۰ نقطه از لام با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰، تعداد اسپرم‌های فاقد رنگ در هر صد سلول شمارش شدند (تصویر ۱) (۳۱).

جنبایی اسپرم: نمونه منی را به نسبت ۱:۱۰ رقیق کرده و ۱۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده را روی یک لام که دمای آن به ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسیده بود قرار داده شد و یک لامل هم دما با آن را روی نمونه گذاشته و در ۱۰ میدان جنبایی به صورت چشمی توسط تکنسین ماهر ثبت شد. در تمام طول دوره آزمایش برای کاهش خطای فردی تمام مراحل توسط یک تکنیسین انجام داده شد و میانگین همه مشاهدات ثبت گردید (۳۲).

سلامت غشاء اسپرم: این پارامتر توسط تست هایپواسموتیک سنجیده شد. برای تهیه محلول هایپواسموتیک ۰/۴۵ گرم فروکتوز به همراه ۰/۲۴۵ گرم سیترات سدیم در ۵۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر حل شد. ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم هر گروه با ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط هایپو اسمول در یک میکروتیوب مخلوط کرده و به مدت ۵۰ تا ۶۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول فوق بر روی یک لام قرار داده و درصد اسپرم با دم متورم و پیچ خورده در ۱۰۰ عدد محاسبه شد (تصویر ۲) (۳۳).

سلامت آکروزوم: از محلول فرمالین سیترات برای تعیین درصد سلامت آکروزوم استفاده شد. محلول استوک سدیم سیترات ۲/۹ درصد تهیه شد و سپس ۲ میلی لیتر از محلول استوک آماده شده با ۴۸ میلی لیتر از محلول فرمالدئید (۳۷ درصد) مخلوط شد. ۰/۵ میکرولیتر از محلول را روی یک لام ریخته و با لنز ۴۰ در ۱۰ میدان دید اسپرم‌ها با آکروزوم سالم در ۱۰۰ عدد سلول شمارش شدند و میانگین اعداد بر اساس درصد بیان گردید (تصویر ۳) (۳۴).

واکنش اسپرم غشاء پریوتیلین: برای تهیه غشاء پریوتیلین از تخم نابارور و تازه استفاده گردید. ابتدا زرده تخم مرغ بدون نطفه به طور کامل از سفیده جدا شد. زرده جدا شده در پتری‌دیش به نحوی قرار گرفت که ناحیه بلاستودیسک آن رو به

پیروی محققین تلقیح مصنوعی پرندگان از اصول اصلی این فرمول‌ها سبب شده است که اضافه کردن ترکیبات کلسیم به رقیق کننده‌های منی در پرندگان مغفول بماند. همچنین این احتمال وجود دارد که کلسیم داخل مایع منی در پرندگان می‌تواند به‌عنوان مخزن و منبع کلسیم مورد نیاز برای تحرک توسط اسپرم لحاظ گردد. از آن جا که اجزای ترکیبات رقیق کننده‌های مختلف جهت نگهداری اسپرم پرندگان فاقد هرگونه ترکیبات کلسیمی می‌باشد. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی اثر افزودن ترکیبات مختلف کلسیمی به رقیق کننده لیک بر حفظ پارامترهای کیفی اسپرم خروس نگهداری شده پس از ۷۲ ساعت ذخیره سازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود.

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر از ۵ خروس نژاد لاری هم سن استفاده شد که همه آن‌ها تحت رژیم نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند و در تمام طول دوره آزمایش دسترسی به آب آزاد و روزانه به ازای هر قطعه ۹۵ گرم دان در اختیار پرنده‌ها قرار گرفت. خروس‌ها در یک دوره سه هفته‌ای برای اسپرم‌گیری به صورت مالش شکمی عادت دهی شده و اسپرم‌گیری دو بار در هفته انجام گرفت که هر خروس یک بار مورد مالش شکمی قرار گرفت. مایع جمع‌آوری شده در یک محفظه عایق حرارتی و در مدت کمتر از ۱۵ دقیقه به آزمایشگاه انتقال داده شد و نمونه برای ارزیابی اولیه کیفیت اسپرم مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه حاضر جهت رقیق کردن نمونه منی از رقیق کننده لیک استفاده شد که ترکیبات آن در **جدول ۱** آمده است. اندازه‌گیری فشار اسمزی تمام محلول‌های آزمایشی با استفاده از دستگاه اسمومتر شرکت Gonatec مدل Osmomat 030 انجام گرفت. برای تهیه تیمارهای آزمایشی، منی جمع‌آوری شده به نسبت ۱ به ۱۰ با رقیق کننده ترکیب و حجم نهایی بین ۱۰ لوله آزمایشی تقسیم و سپس تیمارها اضافه گردید. ترکیبات کلسیمی انتخاب شده جهت آزمایش شامل محلول تزریق کلسیمافور ۴۰ (شرکت داروسازی نصر فریمان ایران)، کلسیم گلوکونات (سینا دارو) و کلسیم کلراید (Merck) بود که در **جدول ۲** غلظت‌های آن نمایش داده شده است.

زنده‌مانی اسپرم: بدین منظور از رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. برای تهیه محلول رنگی ۱/۷۳۵ گرم سدیم گلوآمات ۰/۱۲۸ گرم پتاسیم سیترات، ۰/۸۵۱ گرم سدیم استات

چربی‌ها پی برد و از آن به عنوان یک نشانگر برای اندازه‌گیری سطح استرس اکسیداتیو در یک موجود زنده استفاده کرد. به‌طور خلاصه مالون دی‌آلدهید با تیو باربیتوریک اسید (TBA) در دمای بالا، واکنش داده و محصول صورتی رنگی تولید می‌کند که با روش رنگ سنجی در طول موج ۵۴۰-۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. با توجه به اهمیت مالون دی‌آلدهید به عنوان یک نشانگر پراکسیداسیون چربی‌ها و همچنین عملکرد منفی آن در برابر سلامت، نیاز به ارزیابی مالون دی‌آلدهید در مطالعات بیولوژی همچنان احساس می‌شود.

در مرحله نخست نمونه‌ای را که برای این آزمایش گرفته شده بود، به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژ شد تا پلاسما آن از اسپرم‌ها جدا شود سپس ۱ میلی‌لیتر از پلاسما بالایی لوله با ۱ میلی‌لیتر EDTA (۳/۷۲ گرم در ۲۰ میلی‌لیتر آب)، ۱ میلی‌لیتر BHT (۰/۲ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول) و ۲ میلی‌لیتر TCA (۳ گرم در ۳۰ میلی‌لیتر آب)، باهم مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰ گرم سانتریفیوژ شد و بعد از اتمام مدت سانتریفیوژ ۱ میلی‌لیتر از محلول بالایی لوله (پلاسما) با ۱ میلی‌لیتر TBA مخلوط شد و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه گرم شد و آن را ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته تا سرد شود بعد از آن محلول به‌دست آمده در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و به کمک آن میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان مالون‌دی‌آلدهید از فرمول زیر به‌دست آمده است (۳۶).

$$\text{حجم کل} \times \text{میزان جذب} \times 10^6 = \frac{\text{حجم کوئنت} \times 1/56 \times 10^5}{\text{حجم کوئنت}} \times \text{مالوندی‌آلدهید}$$

بالا باشد. سپس به‌وسیله یک پیپت و با سرم فیزیولوژی (۹ درصد) به آرامی سفیده به جا مانده روی زرده شستشو داده شد تا آلبومین باقی مانده روی زرده پاک گردد. زرده به مدت یک ساعت در محلول کلراید هیدروژن ۱۰ درصد در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، بعد از اتمام وقت مقرر زرده داخل یک پتری دیش قرار داده و با محلول نمکی ۹ درصد چندین بار شستشو داده شد، بعد از تخلیه کامل محتویات کیسه زرده غشاء پری‌وتیلن برای انجام تست باروری مورد استفاده قرار گرفت.

میزان باروری با استفاده از واکنش بین اسپرم و غشاء پری‌وتیلن تخم مرغ برآورد شد. غشاء آماده شده به همراه ۳۰۰ میلی‌لیتر از محلول حاوی اسپرم را به داخل یک میکروتیوب انتقال داده و به مدت ۵۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۹ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد، بعد از اتمام زمان انکوباتور غشاء با کمک سرم فیزیولوژی چندین بار شستشو داده شد تا اسپرم‌ها کامل شسته شوند، غشاء را با پنس به آرامی روی یک لام پهن کرده سپس برای تثبیت بافت ۱۰ میلی‌لیتر فرمالین ۱۰ درصد روی آن ریخته شد و بعد از گذشت ۱ دقیقه ۱۵ میلی‌لیتر معرف شیف روی آن ریخته و پس از رنگ گرفتن غشاء با کمک آب مقطر چند مرتبه شستشو داده شد تا رنگ اضافی پاک شود. بعد از خشک شدن لام با کمک لنز ۴۰ میکروسکوپ نوری تعداد سوراخ‌های ایجاد شده در چندین ناحیه شمارش و تعداد اسپرم‌های فعال بر اساس تعداد اسپرم در هر میلی‌لیتر محاسبه شد (تصویر ۴) (۳۵).

پراکسیداسیون لیپید: در استرس‌های اکسیداتیو، پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع سبب تولید مالون دی‌آلدهید می‌گردد. بنابراین با اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدهید در نمونه‌های بیولوژیک مختلف می‌توان به میزان پراکسیداسیون

جدول ۱. ترکیبات رقیق‌کننده لیک جهت نگهداری اسپرم خروس.

ترکیبات رقیق‌کننده	مقدار (گرم در لیتر)
پتاسیم منوفسفات	۰/۶۵
منیزیم کلراید+۶آبه	۰/۳۴
پتاسیم دی‌فسفات+۳آبه	۱۲/۷
سدیم استات+۳آبه	۴/۳۰
سدیم گلوتامات	۸/۶۷
فرکتوز	۵
تریس	۱/۹۵
اسیدپته	۷/۵
فشار اسمزی (میلی‌اسمل بر کیلوگرم آب)	۳۹۹-۲۸۳

جدول ۲. سطوح مختلف ترکیبات کلسیمی مورد مطالعه.

تیمار آزمایشی	گروه‌های آزمایشی	فشار اسمزی (میلی اسمل بر کیلوگرم آب)
رقیق کننده پایه (رقیق کننده لیک)	شاهد	۲۸۳
رقیق کننده پایه + ۰/۵۶ میلی مولار کلسیمافور	۰/۵۶ CMP	۳۰۵
رقیق کننده پایه + ۰/۰۵۶ میلی مولار کلسیمافور	۰/۰۵۶ CMP	۳۰۱
رقیق کننده پایه + ۰/۰۰۵۶ میلی مولار کلسیمافور	۰/۰۰۵۶ CMP	۲۹۹
رقیق کننده پایه + ۰/۵۶ میلی مولار کلسیم گلوکونات	۰/۵۶ CG	۲۹۸
رقیق کننده پایه + ۰/۰۵۶ میلی مولار کلسیم گلوکونات	۰/۰۵۶ CG	۲۹۸
رقیق کننده پایه + ۰/۰۰۵۶ میلی مولار کلسیم گلوکونات	۰/۰۰۵۶ CG	۲۹۸
رقیق کننده پایه + ۰/۵۶ میلی مولار کلسیم کلراید	۰/۵۶ CaCl ₂	۳۹۹
رقیق کننده پایه + ۰/۰۵۶ میلی مولار کلسیم کلراید	۰/۰۵۶ CaCl ₂	۳۱۱
رقیق کننده پایه + ۰/۰۰۵۶ میلی مولار کلسیم کلراید	۰/۰۰۵۶ CaCl ₂	۳۰۰

جدول ۳. فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس طی نگهداری برون تنی در رقیق کننده لیک حاوی غلظت‌های مختلف ترکیبات حاوی کلسیم (درصد) بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد).

تیمار آزمایشی	زنده مانی (درصد)	جنبایی (درصد)	تحرك پیش رونده (درصد)	سلامت غشاء (درصد)	سلامت آکروزوم (درصد)	باروری برون تنی (درصد)
شاهد	۵۹/۷±۲/۷ ^d	۴۶/۹±۳/۴ ^c	۳۹/۴±۳/۸ ^b	۵۸/۹±۲/۳ ^c	۵۷/۸±۴/۲ ^b	۴۹/۴±۲/۳ ^b
شاهد	۷۱/۶±۳/۷ ^{abc}	۶۳/۳±۳/۱ ^{ab}	۵۴/۶±۴/۱ ^a	۷۱±۲/۹ ^{ab}	۶۴/۲±۴/۷ ^{ab}	۵۵±۴/۵ ^{ab}
۰/۵۶ CMP	۶۳/۳±۳/۶ ^{cd}	۵۵/۳±۳/۶ ^{bc}	۵۰/۳±۲/۳ ^a	۵۷/۹±۲/۵ ^c	۶۳/۱±۳/۵ ^{ab}	۵۳/۶±۳/۱ ^{ab}
۰/۰۵۶ CMP	۶۴/۱±۱/۴ ^{cd}	۶۰/۸±۳/۸ ^{ab}	۵۲/۳±۴/۵ ^a	۶۳/۵±۲/۹ ^{bc}	۶۱/۳±۲/۶ ^{ab}	۶۱/۵±۲/۳ ^a
۰/۰۰۵۶ CMP	۷۹/۵±۲/۵ ^a	۶۰/۵±۳ ^{ab}	۴۹/۱±۵/۶ ^{ab}	۷۴/۹±۳ ^a	۶۸/۷±۳/۱ ^a	۵۵/۸±۳/۱ ^{ab}
۰/۵۶ CG	۷۷/۵±۲/۸ ^{ab}	۶۷/۲±۴/۱ ^a	۵۹/۵±۴/۳ ^a	۷۵/۱±۲/۹ ^a	۷۲/۹±۲/۶ ^{ab}	۵۸±۲/۹ ^{ab}
۰/۰۵۶ CG	۶۹/۷±۳ ^{bc}	۶۱±۴ ^{ab}	۵۳±۲/۷ ^a	۶۸/۷±۳/۹ ^{ab}	۶۳/۷±۴/۱ ^{ab}	۵۶/۷±۲/۳ ^{ab}
۰/۰۰۵۶ CG	۷۷/۴±۳/۵ ^{ab}	۶۷/۳±۱/۹ ^a	۴۷/۵±۲/۳ ^{ab}	۷۷±۲/۳ ^a	۶۸/۸±۳/۴ ^{ab}	۵۹/۷±۳/۹ ^a
۰/۵۶ CaCl ₂	۶۶/۴±۲/۴ ^{cd}	۶۰±۵/۲ ^{ab}	۵۵/۱±۳/۷ ^a	۶۴±۳/۷ ^{bc}	۶۳/۶±۴ ^{ab}	۵۸/۳±۲/۸ ^{ab}
۰/۰۵۶ CaCl ₂	۶۹/۶±۱/۶ ^{bc}	۶۱/۵±۲/۶ ^{ab}	۵۷/۶±۳/۷ ^a	۶۸/۵±۳/۲ ^{bc}	۶۳/۶±۵/۱ ^{ab}	۶۱/۸±۲/۳ ^a
SEM	۸/۴۲	۱۱/۳۱	۱۱/۹۹	۹/۵۳	۱۲/۰۷	۹/۶
P-value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۷۷	۰/۰۲۵۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۶۹	۰/۰۱۴۶

میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

نتایج

درصد زنده‌مانی اسپرم: نتایج حاصل از ارزیابی زنده‌مانی در جدول ۳ آمده است. درصد زنده‌مانی در تیمارهای ۰/۵۶، ۰/۰۵۶ و ۰/۰۰۵۶ CMP، ۰/۵۶ CaCl₂ و ۰/۵۶ CG میلی مولار بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($P < 0.05$). افزودن این ترکیبات، زنده‌مانی اسپرم‌های آزمایشی را افزایش داد که تیمار ۰/۵۶ CMP از بیشترین میزان زنده‌مانی (۹۷/۵ درصد) برخوردار بود ($P < 0.05$).

جنبایی: در جدول ۳ نتایج آنالیز میانگین تیمارهای آزمایشی نشان داده شده است. بررسی‌ها بیانگر تأثیر تمام ترکیبات کلسیمی بر فراسنجه جنبایی بودند به گونه‌ای که بعد از ۷۲ ساعت نگهداری، تحرک تیمارهای آزمایشی بجز ۰/۵۶ CG به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$).

تجزیه و تحلیل‌های آماری: برای آنالیز داده‌های به دست آمده از طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت روزانه در نرم افزار EXCEL ثبت و سپس در نرم افزار SAS فراخوانی شد. برای آنالیز داده‌ها از روش GLM و مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن و توکی استفاده شد.

$$Y_i = \mu + T_i + e_i$$

Y_i = پارامتر اندازه گیری شده

μ = میانگین جامعه

T_i = اثر تیمار

e_i = اثر اشتباه آزمایشی

گزارش‌هایی مبنی بر اثر بهبود سلامت آکروزوم پس از استفاده آنتی‌اکسیدان وجود دارد (۳۷). اما به دلیل این که تا به حال مطالعه‌ای در مورد اثر بهبود دهندگی ترکیبات یونی بر سلامت آکروزوم منتشر نشده است اظهار نظر در مورد دلیل بهبود این فرآیند بعد از استفاده از این ترکیبات بسیار دشوار است اما از آن جایی که غشاء آکروزوم هم از جنس غشایی سلول اسپرم است می‌توان بیان نمود که نقش کلسیم در فعالیت‌های متابولیسمی دلیل حفظ یک پارچگی غشاءهای سلولی می‌شود (۳۸).

باروری برون تنی: استفاده از سطوح ۰/۰۵۶ CG و ۰/۵۶ و ۰/۰۵۶ CaCl₂ در رقیق کننده لیک سبب افزایش باروری برون تنی نسبت به گروه شاهد بعد از ۷۲ ساعت نگهداری شد ($P < 0/05$).

مالون‌دی‌آلدهید: نتایج حاصل از میزان مالون‌دی‌آلدهید تولید شده در گروه‌های آزمایشی بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال در **تصویر ۵** نشان داده شده است. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمارهای آزمایشی باعث تغییر معنی‌دار میزان پراکسیداسیون لیپید غشاءهای اسپرم نسبت به تیمار شاهد نشدند.

تحرك پیش رونده: تأثیر سطوح و ترکیبات مختلف کلسیم بر پارامتر حرکت پیش رونده در **جدول ۳** آورده شده است. در فراسنجه حرکت پیش رونده به جز تیمارهای حاوی ۰/۵۶ CaCl₂ و CMP سایر تیمارهای آزمایشی بعد از ۷۲ ساعت نگهداری، در مقایسه با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بودند و اضافه کردن این ترکیبات به رقیق کننده لیک سبب افزایش حرکت پیش رونده گردید ($P < 0/05$).

سلامت غشاء: نتایج حاصل از ارزیابی سلامت غشاء در **جدول ۳** نشان داده شده است. افزودن ۰/۵۶ و ۰/۰۵۶ میلی مولار CaCl₂، تمام سطوح استفاده شده CMP و همچنین غلظت ۰/۵۶ CG به رقیق کننده لیک باعث بهبود معنی‌داری در پارامتر سلامت غشاء نسبت به تیمار شاهد بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال شد ($P < 0/05$).

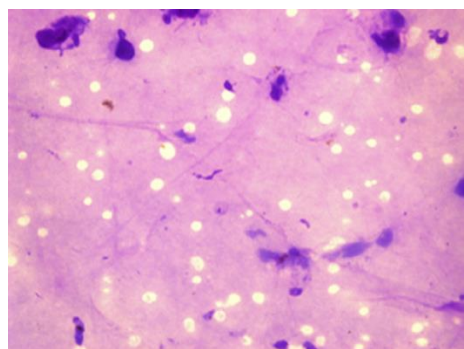
سلامت آکروزوم: مقایسه میانگین‌های فراسنجه سلامت آکروزوم در **جدول ۳** آمده است. افزودن ۰/۵۶ CMP موجب بهبود سلامت آکروزوم بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به تیمار شاهد شد ($P < 0/05$).



تصویر ۲. سلامت غشاء (1000x).



تصویر ۱. زنده‌مانی (1000x).



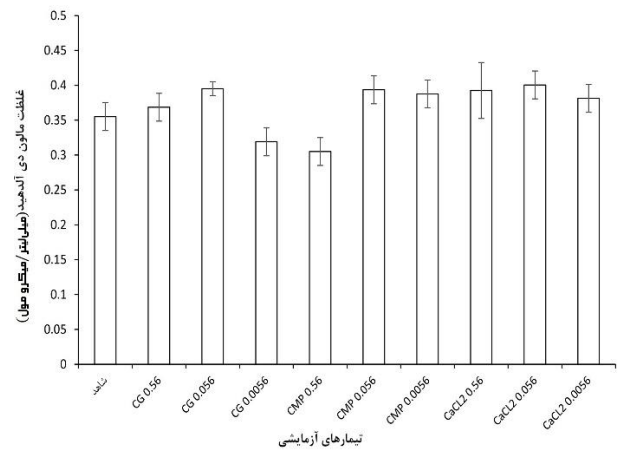
تصویر ۴. باروری (400x).



تصویر ۳. سلامت آکروزوم (1000x).

جهت نگهداری اسپرم بود زیرا در مقایسه با سایر رقیق‌کننده‌های مورد مطالعه پس از نگهداری دارای تعداد اسپرم‌های زنده بیشتری داشت (۴۱). بالا رفتن میزان کلسیم داخل سلولی باعث افزایش موقت سیکل آدنوزین مونو فسفات و نیز سبب تحریک آنزیم آدنیلات سیکلاز داخل سلولی می‌شود که این امر موجب تحریک آنزیم پروتئین کیناز A شده که در نتیجه فعالیت آن پروتئین آکسونم فسفریله می‌شود و دم اسپرم شروع به حرکت می‌کند، نوسانات کلسیم حرکت تاژک اسپرم را تغییر می‌دهد (۴۲). با توجه به داده‌های به‌دست آمده باروری گروه شاهد بعد از ۷۲ ساعت به ۴۹/۴ رسید که با اختلاف معنی‌داری پایین‌تر از سطح ۰/۰۰۵۶ استفاده شده کلسیم گلوکونات و غلظت ۰/۵۶ و همچنین ۰/۰۰۵۶ میلی مولار کلراید کلسیم بوده است. به دلیل نقش تاژک در فرآیند تحرک و باروری می‌توان گفت که تغییرات غلظت کلسیم نقش مهمی در جنبایی و باروری اسپرم دارد (۴۳). اصلاح محلول‌های فعال‌سازی اسپرم با کمک هر یک از یون‌های دو ظرفیتی کلسیم و منیزیم و میزان اسیدیته می‌تواند راندمان تولیدمثلی را افزایش دهد (۴۱). علاوه بر این، کلسیم ظاهراً بیش‌فعالی را تغییر می‌دهد، یک الگوی شنا با ضرب و شتم تاژک نامتقارن و ایجاد امواج تاژک با دامنه بالا که برای لقاح ضروری است کلسیم هم در واکنش آکروزوم و هم در کموتاکسی اسپرم نقش اصلی را بازی می‌کند (۴۲). در حالی که اسپرم در صورت عدم وجود کلسیم خارج سلولی قادر به انجام هیچ یک از این عملکردهای مهم نیست، کموتاکسی اسپرم نسبت به تخمک‌ها یک پدیده گسترده است که در بیشتر اشکال زندگی از گیاهان پایین‌تر تا پستانداران رخ می‌دهد و نقش مهمی در اطمینان از لقاح بازی می‌کند (۴۱). هجوم کلسیم از طریق کانال‌های کلسیم غشاء پلاسمایی اسپرم برای واکنش آکروزوم در مجاورت تخمک و نقش اساسی در واسطه بودن باروری اسپرم دارد. رابطه کمی بین سطح کلسیم داخل سلول اسپرم و تحرک اسپرم هنوز بحث برانگیز است (۴۴). بر اساس مشاهدات مندرج در **تصویر ۵** میزان مالون‌دی‌آلدهید تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد از نظر عددی بیشتر است که این هم با توجه به افزایش تحرک امبری دور از انتظار نبود ولی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که این امر خود نگرانی ناشی از بالا رفتن میزان رادیکال‌های آزاد را به دلیل افزایش فعالیت بر طرف می‌کند.

نتیجه‌گیری نهایی: به‌نظر می‌رسد همانند آنچه در ابتدای انجام مطالعه حاضر انتظار می‌رفت یکی از دلایل کاهش تحرک اسپرم در شرایطی که سایر مواد مورد نیاز برای حفظ پایداری



تصویر ۵. غلظت مالون‌دی‌آلدهید.

بحث

اختلاف آماری در بین گروه‌های آزمایشی در پارامترهای زنده‌مانی، جنبایی و تحرک پیش‌رونده نشان داد که بعد از ۷۲ ساعت اکثر پارامترهای اسپرمی در گروه شاهد دارای روند کاهشی هستند به طوری که جنبایی اسپرم به ۴۶/۹ درصد و تحرک پیش‌رونده به ۳۹/۴ درصد رسید و بررسی تیمارهای آزمایشی به وضوح نشان داد که اضافه کردن هر نوع ترکیب کلسیمی (کلسیم گلوکونات، کلسیم‌افور و کلسیم کلراید) به نحوی سبب افزایش پارامترهای فوق‌گرددید که این افزایش شاخص‌های کیفی می‌تواند به دلیل نقش کلیدی کلسیم در فعالیت متابولیسمی سلول‌های اسپرم باشد. گزارش‌های متعددی مبنی بر نقش کلسیم در تحرک تاژک وجود دارد (۳۸). تعدیل کانال‌های کلسیمی سبب کاهش حرکت تاژک یا دم اسپرم می‌گردد (۳۹). لازمه حرکت تاژک افزایش انتقال کلسیم به داخل سلول و اثر بخشی آن بر انقباض رشته‌های اکتین و میوزین است (۳۸). کلسیم نقش گسترده‌ای در تولید مثل نرها و رشد اسپرم دارد. کلسیم برای فیزیولوژی اسپرم از جمله تحرک، متابولیسم، واکنش آکروزوم و لقاح مهم است. نشان داده شده است که اسپرم‌ها در پاسخ به تغییر غلظت کلسیم داخل سلولی حرکت خود را تعدیل می‌کنند. تحرک همچنین به غلظت کلسیم بیرون سلول و درون سلول در قسمت اصلی تاژک بستگی دارد (۴۰). در شرایطی که زنده‌مانی تیمار شاهد بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به ۵۹/۷ درصد رسید، تیمارهایی که به آن‌ها ۰/۵۶ و ۰/۰۵۶ میلی مولار کلسیم‌افور اضافه شده بود توانستند زنده‌مانی خود را در سطح‌های ۷۹/۵ و ۷۷/۵ حفظ کنند که دارای اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد بود. رقیق‌کننده لیک بدون در نظر گرفتن نژاد مرغ مناسب‌ترین محلول

سپاسگزاری

مطالعه حاضر نتیجه انجام پایان نامه کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان می‌باشد که بودجه آن از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه کردستان تأمین شده است. نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه کردستان، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

اسپرم فراهم باشد یون‌ها و ترکیبات دخیل در انجام حرکت و ادامه‌دار بودن آن است (۱۰). که در این میان براساس مطالعات صورت گرفته بر روی مکانیسم عمل حرکت که در آن پروتئین‌های حرکتی لازم برای انجام حرکات انقباضی مشخص شد که یون کلسیم یکی از مهم‌ترین کاتیون‌های مورد نیاز می‌باشد و اهمیت وجود آن را می‌توان بر این اساس بیان کرد که در غشاء اسپرم کانال‌های مخصوص برای عبور کلسیم وجود دارد (۱۸). آنچه از مطالعه حاضر استنباط می‌شود اثر بهبود دهندگی ترکیبات کلسیمی بر جنبایی است که تمام تیمارها به جز سطح ۰/۵۶ کلسیمافور باعث افزایش معنی‌دار این فراسنجه نسبت به تیمار شاهد شد. پس می‌توان گفت که بخشی از کاهش کیفیت اسپرم در رقیق کننده‌های مورد استفاده به دلیل کم شدن بعضی از یون‌های مورد نیاز برای فعالیت اسپرم ایجاد می‌شود.

References

- Sharideh H, Zhandi M, Zenioaldini S, Zaghari M, Sadeghi M. The effect of coenzyme Q10 on rooster semen preservation in cooling condition. *Theriogenology*. 2019; 129: 103-9. doi: [10.1016/j.theriogenology.2019.02.028](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.028) PMID: [30831340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30831340/)
- Kranis A, Gheyas AA, Boschiero C, Turner F, Yu L, Smith S, Talbot R, Pirani A, Brew F, Kaiser P, Hocking PM. Development of a high density 600K SNP genotyping array for chicken. *BMC genomics*. 2013; 14: 1-3. doi: [10.1186/1471-2164-14-59](https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-59) PMID: [23356797](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23356797/)
- Vizcarra JA, Kirby JD, Kreider DL. Testis development and gonadotropin secretion in broiler breeder males. *Poult Sci*. 2010; 89: 328-34. doi: [10.3382/ps.2009-00286](https://doi.org/10.3382/ps.2009-00286) PMID: [20075286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20075286/)
- Boz MA, Baş H, Sarica M, Erensoy K. The effects of natural mating and artificial insemination on reproductive traits of 1- and 2-year-old domestic Turkish geese. *Vet Res Commun*. 2021; 45: 211-21. doi: [10.1007/s11259-021-09802-6](https://doi.org/10.1007/s11259-021-09802-6) PMID: [34089129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34089129/)
- Mphey LC, van Rensburg WJ, Mpofu TJ, Mtileni BJ, Nephawe KA. Influence of male-male competition on reproductive performance and mortality of broiler breeders following intra-spiking. *Poult Sci*. 2019; 98: 4549-54. doi: [10.3382/ps/pez273](https://doi.org/10.3382/ps/pez273) PMID: [31111931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111931/)
- Akhtar MF, Shafiq M, Ali I. Improving gander reproductive efficacy in the context of globally sustainable goose production. *Animals*. 2021; 12: 44. doi: [10.3390/ani12010044](https://doi.org/10.3390/ani12010044) PMID: [35011150](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35011150/)
- Vasicek J, Kuzelova L, Kulikova B, Chrenek P. Effect of diluent and storage time on sperm characteristics of rooster insemination doses. *Avian Biol Res*. 2015; 8: 41-6. doi: [10.3184/175815515X14232453836759](https://doi.org/10.3184/175815515X14232453836759)
- Feyzi S, Sharafi M, Rahimi S. Stress preconditioning of rooster semen before cryopreservation improves fertility potential of thawed sperm. *Poult Sci*. 2018 1; 97(7): 2582-90. doi: [10.3382/ps/pey067](https://doi.org/10.3382/ps/pey067) PMID: [29584912](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29584912/)
- Sun L, He M, Wu C, Zhang S, Dai J, Zhang D. Beneficial influence of soybean lecithin nanoparticles on rooster frozen-thawed semen quality and fertility. *Animals*. 2021; 11(6): 1769. doi: [10.3390/ani11061769](https://doi.org/10.3390/ani11061769) PMID: [34199159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34199159/)
- Halliwell B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res*. 2007; 73: 341-7. doi: [10.1016/j.cardiores.2006.10.004](https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.10.004) PMID: [17141749](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17141749/)
- Visconti PE, Krapf D, De La Vega-beltrán JL, Acevedo JJ, Darszon A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*. 2011; 13: 395. doi: [10.1038/aja.2010.69](https://doi.org/10.1038/aja.2010.69) PMID: [21540868](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21540868/)
- Alonso CA, Osycka-Salut CE, Castellano L, Cesari A, Di Siervi N, Mutto A, Johannisson A, Morrell JM, Davio C, Perez-Martinez S. Extracellular cAMP activates molecular signalling pathways associated with sperm capacitation in bovines. *MHR: Mol Hum Reprod*. 2017; 23: 521-34. doi: [10.1093/molehr/gax030](https://doi.org/10.1093/molehr/gax030) PMID: [28521061](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28521061/)
- Neild DN, Gadella BM, Agüero A, Stout TA, Colenbrander B. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Anim Reprod Sci*. 2005; 89: 47-56. doi: [10.1016/j.anireprosci.2005.06.017](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.017) PMID: [16054782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16054782/)
- Yanagimachi R. Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? *Biol Reprod*. 2011; 85: 4-5. doi: [10.1095/biolreprod.111.092601](https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092601) PMID: [21490244](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21490244/)
- Ruiz-Díaz S, Grande-Pérez S, Arce-López S, Tamargo C, Olegario Hidalgo C, Pérez-Cerezales S. Changes in the cellular distribution of tyrosine phosphorylation and its relationship with the acrosomal exocytosis and plasma membrane integrity during in vitro capacitation of frozen/thawed bull spermatozoa. *Int J Mol Sci*. 2020; 21: 2725. doi: [10.3390/ijms21082725](https://doi.org/10.3390/ijms21082725) PMID: [32326382](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32326382/)
- Sangani AK, Masoudi AA, Torshizi RV. Association of mitochondrial function and sperm progressivity in slow-and fast-growing roosters. *Poult Sci*. 2017; 96: 211-9. doi: [10.3382/ps/pew273](https://doi.org/10.3382/ps/pew273) PMID: [27591282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27591282/)
- Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung JJ, Clapham DE. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol*. 2012; 74: 453. doi: [10.1146/annurev-physiol-020911-153258](https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153258) PMID: [22017176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22017176/)

18. Quill TA, Wang D, Garbers DL. Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSper. *Mol Cell Endocrinol.* 2006; 250: 84-92. doi: [10.1016/j.mce.2005.12.031](https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.031) PMID: [16413670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16413670/)
19. Smith EF. Regulation of flagellar dynein by calcium and a role for an axonemal calmodulin and calmodulin-dependent kinase. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 3303-13. doi: [10.1091/mbc.e02-04-0185](https://doi.org/10.1091/mbc.e02-04-0185) PMID: [12221134](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12221134/)
20. Brokaw CJ, Luck DJ. Bending patterns of Chlamydomonas flagella: III. A radial spoke head deficient mutant and a central pair deficient mutant. *Cell Motil.* 1985; 5: 195-208. doi: [10.1002/cm.970050303](https://doi.org/10.1002/cm.970050303) PMID: [4005942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4005942/)
21. Yang P, Diener DR, Yang C, Kohno T, Pazour GJ, Dienes JM, Agrin NS, King SM, Sale WS, Kamiya R, Rosenbaum JL. Radial spoke proteins of Chlamydomonas flagella. *J Cell Sci.* 2006; 119: 1165-74. doi: [10.1242/jcs.02811](https://doi.org/10.1242/jcs.02811) PMID: [16507594](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16507594/)
22. Mizuno K, Padma P, Konno A, Satouh Y, Ogawa K, Inaba K. A novel neuronal calcium sensor family protein, calaxin, is a potential Ca²⁺-dependent regulator for the outer arm dynein of metazoan cilia and flagella. *Biol Cell.* 2009; 101: 91-103. doi: [10.1042/BC20080032](https://doi.org/10.1042/BC20080032) PMID: [18620543](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18620543/)
23. Schlingmann K, Michaut MA, McElwee JL, Wolff CA, Travis AJ, Turner RM. Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: Evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway. *J Androl.* 2007; 28: 706-16. doi: [10.2164/jandrol.106.001669](https://doi.org/10.2164/jandrol.106.001669) PMID: [17460096](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17460096/)
24. Olson SD, Fauci LJ, Suarez SS. Mathematical modeling of calcium signaling during sperm hyperactivation. *Mol Hum Reprod.* 2011; 17: 500-10. doi: [10.1093/molehr/gar040](https://doi.org/10.1093/molehr/gar040) PMID: [21606121](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21606121/)
25. Costello S, Michelangeli F, Nash K, Lefievre L, Morris J, Machado-Oliveira G, Barratt C, Kirkman-Brown J, Publicover S. Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction.* 2009; 138: 425. doi: [10.1530/REP-09-0134](https://doi.org/10.1530/REP-09-0134) PMID: [19542252](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19542252/)
26. Bajpai M, Doncel GF. Involvement of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. *Reproduction.* 2003 1; 126(2): 183-95. doi: [10.1530/rep.0.1260183](https://doi.org/10.1530/rep.0.1260183) PMID: [12887275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12887275/)
27. Naresh S, Atreja SK. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology.* 2015; 70: 211-6. doi: [10.1016/j.cryobiol.2015.03.008](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.03.008) PMID: [25828199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25828199/)
28. Colás C, Grasa P, Casao A, Gallego M, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Changes in calmodulin immunocytochemical localization associated with capacitation and acrosomal exocytosis of ram spermatozoa. *Theriogenology.* 2009; 71(5): 789-800. doi: [10.1016/j.theriogenology.2008.10.003](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.003) PMID: [19081128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19081128/)
29. Peris-Frau P, Martín-Maestro A, Iniesta-Cuerda M, Sánchez-Ajofrín I, Cesari A, Garde JJ, Villar M, Soler AJ. Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation. *Theriogenology.* 2020 15; 145: 100-8. doi: [10.1016/j.theriogenology.2020.01.046](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.046) PMID: [32007635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32007635/)
30. Meseguer M, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. *J Assist Reprod Genet.* 2004; 21(12): 445-51. doi: [10.1007/s10815-004-8761-7](https://doi.org/10.1007/s10815-004-8761-7) PMID: [15704520](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15704520/)
31. Łukaszewicz E, Jerysz A, Partyka A, Siudzińska A. Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. *Res Vet Sci.* 2008; 85(3): 583-8. doi: [10.1016/j.rvsc.2008.03.010](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.03.010) PMID: [18486956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18486956/)
32. Masoudi R, Sharafi M, Pourazadi L. Improvement of rooster semen quality using coenzyme Q10 during cooling storage in the Lake extender. *Cryobiology.* 2019 1; 88: 87-91. doi: [10.1016/j.cryobiol.2019.03.003](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.03.003) PMID: [30857955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30857955/)
33. Ortatatlı M, Ciftci MK, Tuzcu M, Kaya A. The effects of aflatoxin on the reproductive system of roosters. *Res Vet Sci.* 2002; 72(1): 29-36. doi: [10.1053/rvsc.2001.0516](https://doi.org/10.1053/rvsc.2001.0516) PMID: [12002635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12002635/)
34. Qazi IH, Angel C, Yang H, Zoidis E, Pan B, Wu Z, Ming Z, Zeng CJ, Meng Q, Han H, Zhou G. Role of selenium and selenoproteins in male reproductive function: a review of past and present evidences. *Antioxidants.* 2019; 8(8): 268. doi: [10.3390/antiox8080268](https://doi.org/10.3390/antiox8080268) PMID: [31382427](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31382427/)
35. Croyle KE, Durrant BS, Jensen T. Detection of oocyte perivitelline membrane-bound sperm: a tool for avian collection management. *Conserv Physiol.* 2015; 3(1): cou060. doi: [10.1093/conphys/cou060](https://doi.org/10.1093/conphys/cou060) PMID: [27293681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27293681/)
36. Bramwell RK, Marks HL, Howarth B. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs. *Poult Sci.* 1995; 74(11): 1875-83. doi: [10.3382/ps.0741875](https://doi.org/10.3382/ps.0741875) PMID: [8614695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8614695/)
37. Ammar O, Houas Z, Mehdi M. The association between iron, calcium, and oxidative stress in seminal plasma and sperm quality. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019; 26(14): 14097-105. doi: [10.1007/s11356-019-04575-7](https://doi.org/10.1007/s11356-019-04575-7) PMID: [30852746](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30852746/)
38. Benko F, Ďuračka M, Kováč J, Lukáč N, Tvrdá E. Comparative analysis of the effects of curcumin and epicatechin on the vitality of rooster spermatozoa. *Journal of microbiology, Biotechnology and Food Sciences.* 2021 1; 10(6): e3078-. doi: [10.15414/jmbfs.3078](https://doi.org/10.15414/jmbfs.3078)
39. Asaduzzaman M, Saha A, Akter S, Biswas S, Alam MG, Bari FY. Quality changes in spermatozoa of exotic muzaffarnagari cross-breed ram semen during the stages of frozen production. *Online J Anim Feed Res.* 2021; 11(6): 206-12. doi: [10.51227/OJAFR.2021.30](https://doi.org/10.51227/OJAFR.2021.30)
40. Jueraitetibaike K, Ding Z, Wang DD, Peng LP, Jing J, Chen L, Ge X, Qiu XH, Yao B. The effect of vitamin D on sperm motility and the underlying mechanism. *Asian J Androl.* 2019; 21(4): 400. doi: [10.4103/aja.aja_105_18](https://doi.org/10.4103/aja.aja_105_18) PMID: [30618415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30618415/)
41. Nguyen TM, Duittoz A, Praud C, Combarous Y, Blesbois E. Calcium channels in chicken sperm regulate motility and the acrosome reaction. *FEBS J.* 2016; 283(10): 1902-20. doi: [10.1111/febs.13710](https://doi.org/10.1111/febs.13710) PMID: [26990886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26990886/)
42. Espinal-Enríquez J, Priego-Espinosa DA, Darszon A, Beltrán C, Martínez-Mekler G. Network model predicts that CatSper is the main Ca²⁺ channel in the regulation of sea urchin sperm motility. *Sci Rep.* 2017; 26; 7(1): 1-4. doi: [10.1038/s41598-017-03857-9](https://doi.org/10.1038/s41598-017-03857-9) PMID: [28652586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28652586/)
43. Siudzińska A, Łukaszewicz E. Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. *J Appl Poult Res.* 2008; 17(1): 101-8. doi: [10.3382/japr.2007-00048](https://doi.org/10.3382/japr.2007-00048)
44. Puga Molina LC, Luque GM, Balestrini PA, Marín-Briggiler CI, Romarowski A, Buffone MG. Molecular basis of human sperm capacitation. *Front Cell Dev Biol.* 2018; 6: 72. doi: [10.3389/fcell.2018.00072](https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00072) PMID: [30105226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30105226/)