تحقیقات تولیدات دامی
سال سوم/ شماره اول/ بهار ۱۳۹۳ (۹-۱)

بررسی کیفیت اسپرم پوشش دار شده قوچ بعد از ۷۲ ساعت ذخیره سازی در ۴ درجه سانتی‌گراد و افزودن مایع منی

علیرضا وافری[۱]، محمد روستائی علی‌مهر[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۲- دانشیار گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۱- تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۲۷)

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی اثر افزودن مایع منی به اسپرم پوشش‌دار شده پس از ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی انجام شد. منی از ۴ راس قوچ نژاد تالشی به وسیله واژن مصنوعی جمع‌آوری شد. جهت پوشش‌دارکردن اسپرم، منی در لوله حاوی تریس-فروکتوز-۱۵ درصد زرده تخم مرغ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بعد از ارزیابی اولیه، تجمیع و سانتریفیوژ شدند. پس از حذف مایع فوقانی، رسوب رقیق شد. نمونه به ۳ بخش مساوی تقسیم و تا ۴°C سرد شد و بعد به مدت ۶۸ ساعت ذخیره شد. بخش اول نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و مایع فوقانی برداشته شد (روشI). بخش دوم نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و دوباره با مایع فوقانی مخلوط شد (روشII). بخش سوم نمونه‌ها بدون تغییر در دمای ۴°C نگهداری شدند (روشIII). نمونه‌های به دست آمده از هر روش به سه قسمت مساوی تقسیم شد و مقادیر صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد مایع منی به آن‌ها اضافه شد و در ۴°C ذخیره شدند. تحرک پیش‌رونده، سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی اسپرم و سلامت غشای آکروزوم نمونه‌ها پس از ۴ ساعت بررسی شدند. زنده‌مانی در مقدار صفر درصد مایع منی (۶۹/۴۱۶٪) بیشتر از مقدار ۲۰ درصد مایع منی (۶۰/۶۶۷٪) بود ($P<۰/۰۵$). کمترین میزان تحرک پیش‌رونده (۱۱/۶۶۷٪)، زنده‌مانی اسپرم (۵۹/۱۶۷٪) و سلامت غشای پلاسمایی (۴۸/۱۶۷٪) در روش ۱ مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). روش‌ها اثری بر سلامت غشای آکروزوم نداشتند ($P>۰/۰۵$). بنابراین حذف زرده تخم مرغ و افزودن مایع منی به اسپرم پوشش‌دارشده پس از ۷۲ ساعت سبب کاهش ماندگاری اسپرم می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسپرم پوشش‌دار شده، سانتریفیوژ، قوچ تالشی، مایع منی

* نویسندهٔ مسئول: roostaei@guilan.ac.ir

مقدمه

تلقیح مصنوعی روشی مناسب برای استفاده بهینه از خصوصیات قوچ برتر در گله‌های گوسفند است. تنها در صورتی می‌توان از این روش به عنوان یک ابزار موثر در برنامه‌های اصلاح نژادی استفاده کرد که امکان ذخیره‌سازی منی وجود داشته باشد. اسپرم قوچ حساسیت بالایی نسبت به تنش اعمال شده در زمان عمل‌آوری و ذخیره‌سازی منی از جمله رقیق‌سازی، سردکردن، انجماد و یخ‌گشایی دارد. به همین دلیل تلقیح مصنوعی در گوسفند توسعه مناسبی نداشته است (Senger, 2003). با توجه به افت کیفیت منی قوچ پس از انجماد و یخ‌گشایی نمی‌توان از منی یخ‌گشایی شده در تلقیح مصنوعی این دام از طریق مهبل و گردن رحم استفاده کرد (Kaabi *et al*., 2006). تنها در زمانیکه تلقیح منی یخ‌گشایی شده قوچ از طریق لاپاروسکوپی در شاخ رحم انجام می‌شود نتایج قابل قبولی به‌دست می‌آید (Anel *et al*., 2005). از طرفی هزینه زیاد روش لاپاروسکوپی سبب محدودیت در استفاده از این روش شده است (Anel *et al*., 2005). بعلاوه، انجام این روش در ایران به دلیل کمبود نیروی متخصص و تجهیزات با محدودیت بیشتری مواجه است. از طرفی مشخص شده است تلقیح مصنوعی منی ذخیره شده قوچ در دمای ۴ °C برای مدت کمتر از یک روز با نتایج رضایت‌بخشی همراه است (Paulenz et al., 2002). در صورتیکه کاهش چشم‌گیر کیفیت اسپرم پس از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی در ۴ °C امکان استفاده آن را در تلقیح مصنوعی با محدودیت مواجه کرده است (Maxwell and Salamon, 1993). بنابراین بهبود روش‌های نگهداری منی قوچ به صورت مایع در دمای ۴ °C و تلقیح آن از طریق دهانه گردن رحم در وضعیت کنونی کشور از اهمیت بالایی برخوردار است.

تحقیقات نشان داده است که پروتئین‌های مایع منی بلافاصله پس از انزال به سطح غشای اسپرم متصل شده و با القای خروج فسفولیپیدها و کلسترول از آن موجب ناپایداری غشای پلاسمایی و کاهش زنده‌مانی اسپرم در طی مدت ذخیره‌سازی می‌شوند (Manjunath *et al*., 2002). مشخص شده است که اجزا موجود در زرده تخم مرغ از جمله لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین با ایجاد یک لایه محافظ در سطح غشای اسپرم (Quinn *et al*., 1980) و نیز اتصال به پروتئین‌های مایع منی، مانع از اتصال آنها به غشای پلاسمایی اسپرم می‌شوند (Bergeron *et al*., 2004). از طرفی افزودن پروتئین‌های مایع منی به اسپرم رقیق‌شده با رقیق‌کننده فاقد زرده تخم مرغ، پس از شوک سرمایی موجب ترمیم آسیب‌های حاصل از شوک سرمایی می‌شود (Barrios *et al*., 2000). بنابراین احتمالاً افزودن مایع منی به اسپرم قوچ بعد از ذخیره‌سازی سبب بهبود عملکرد اسپرم شود.

در مطالعه حاضر جهت حذف مایع منی به منظور کاهش آثار منفی آن بر اسپرم در طی روند سرد کردن و ذخیره‌سازی از روش پوشش‌دارکردن اسپرم استفاده شد و بعد از ذخیره‌سازی به مدت ۶۸ ساعت در ۴°C، آثار افزودن مایع منی به اسپرم پوشش‌دارشده در حضور و فقدان زرده تخم مرغ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

دام‌ها و نمونه‌گیری

این آزمایش از مهر تا آبان ماه سال ۱۳۹۰ در واحد دامداری دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. از ۴ راس قوچ نژاد تالشی با سن ۲/۵ تا ۴ سال و متوسط وزن ۵۰±۵ کیلوگرم و یک راس میش با وزن ۳۵ کیلوگرم و سن ۳ سال استفاده شد. برای تحریک کامل قوچ‌ها، میش مورد استفاده در طول دوره انجام آزمایش دائماً فحل نگه داشته شد. برای فحل کردن میش ۷ روز سیدرگذاری انجام شده و در روز برداشت سیدر مقدار ۱ میلی‌لیتر وتاسترول[1] (استرادایول بنزوات ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به صورت عضلانی تزریق شد. برای ادامه فحلی میش در طول دوره انجام آزمایش هر ۴۸ ساعت ۰/۲ میلی‌لیتر وتاسترول تزریق شد (Stellflug *et al*., 2008). یک دوره عادت‌دهی ۵۲ روزه برای رسیدن حیوانات به شرایط مطلوب در نظر گرفته شد. در این مدت از حمام ضدکنه و داروهای ضدانگل نیز استفاده شد. بر اساس جدول کمیته ملی تحقیق (NRC, 1985) روزانه ۱۳۰۰ گرم یونجه خشک، ۵۹۰ گرم جو و ۶۲۰ گرم کاه برنج به صورت خرد شده در دو وعده صبح و شب در اختیار دام‌ها قرار گرفت. همچنین حیوانات روزانه ۲ ساعت چرای آزاد داشتند. بعلاوه، نمک و آجر لیسیدنی (مکمل مواد معدنی) به صورت آزاد در اختیار دام‌ها قرار داده شد.

نمونه‌گیری به فاصله زمانی دو روز و به کمک واژن مصنوعی و حضور میش فحل انجام شد. در مجموع از ۱۶

1. Vetasterol

انزال در ۴ نوبت برای انجام این آزمایش استفاده شد. جهت پوشش‌دارکردن اسپرم، انزال دوم در لوله حاوی تریس-فروکتوز [۳/۲۵۸ گرم تریس-(هیدروکسی متیل)-آمینومتان، ۱/۸۷۰ گرم اسید سیتریک مونوهیدرات، ۰/۹۳ گرم فروکتوز و ۰/۵ میلی‌لیتر جنتامایسین (۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH=۷] با ۱۵ درصد زرده تخم مرغ (حجم/ حجم) جمع‌آوری و به وسیله فلاکس عایق، حاوی آب ۳۵°C به آزمایشگاه منتقل شد (محمدی نودهی و روستائی علی‌مهر، ۱۳۹۲).

جمع‌آوری مایع منی

برای جمع‌آوری مایع منی از انزال اول هر قوچ استفاده شد. به طور خلاصه، انزال‌های اول بدون رقیق‌سازی و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها تجمیع شده و با قدرت g ×۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند. مایع فوقانی جدا شده و دوباره با قدرت g ×۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد (Roostaei-Ali Mehr and Sharafi, 2013). به این ترتیب مایع فوقانی آن که همان مایع منی کاملاً شفاف و عاری از هرگونه سلول بود جدا شده و در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

رقیق‌سازی، سردکردن و ذخیره‌سازی

در آزمایشگاه، نمونه منی هر قوچ به صورت جداگانه از نظر تحرک پیش‌رونده و غلظت اسپرم ارزیابی شدند. نمونه‌هایی که دارای تحرک اسپرم بیشتر از ۷۰ درصد و غلظت بیشتر از ۲×۱۰^{۹} اسپرم در هر میلی‌لیتر منی بودند مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها تجمیع و با قدرت g ×۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از انجام سانتریفیوژ مایع‌رویی که شامل محلول پوشش‌دارکننده و مایع منی بود، حذف شد. رقیق کننده تریس-گلوکز [۳/۶۳۴ گرم تریس-(هیدروکسی‌متیل)- آمینو متان، ۱/۹۹۶ گرم اسید سیتریک مونوهیدرات و ۲۵ mg/ml از جنتامایسین در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر،pH = ۷] حاوی ۲۰ درصد زرده تخم مرغ و ۰/۰۶۲۵ درصد اسید کاپروئیک (Merck, Germany) به رسوب اضافه شد تا غلظت نهایی اسپرم به $۱/۶\times۱۰^{۹}$ سلول در هر میلی‌لیتر برسد. منی رقیق شده به ۳ بخش مساوی تقسیم شد. از آنجاییکه ذخیره‌سازی در شرایط بی‌هوازی سبب کاهش تنش اکسیداتیو می‌شود (Pagl *et al*., 2006) لذا نمونه‌ها به داخل سرنگ کشیده شدند. ابتدا با استفاده از پلی ونیل الکل سوراخ سوزن مسدود شد. و سپس به سرنگ متصل شد. نمونه‌ها به کمک دستگاه سرد کننده (Test Chamber EG53AH, KATO, Japan) با سرعت ۰/۲۵°C در دقیقه تا ۴°C سرد شدند و به مدت ۶۸ ساعت در همین دما نگهداری شدند. پس از پایان مدت نگهداری، بخش اول نمونه‌ها در ۴°C با قدرت g ×۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع‌رویی حذف شده و رقیق‌کننده تریس-گلوکز اضافه شد (روش I)، بخش دوم نمونه‌ها در دمای ۴°C با قدرت g ×۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و دوباره با مایع‌رویی مخلوط شد (روش II) و بخش سوم نمونه‌ها بدون تغییر در دمای ۴°C نگهداری شدند (روش III). نمونه‌های به دست آمده از هر روش به سه قسمت مساوی تقسیم شده و بافر تریس حاوی صفر، ۲۰ و ۴۰ درصد مایع منی به صورت ۱:۱ (حجم/حجم) به آنها اضافه شد. به این ترتیب غلظت نهایی اسپرم به ۸۰۰×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر و مقادیر مایع منی به صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد رسید. پس از افزودن مایع منی نمونه‌ها در پایوت‌های ۲۵۰ میکرولیتری کشیده شده و پس از مسدود کردن سر پایوت‌ها با استفاده از پلی ونیل الکل، به مدت ۴ ساعت در دمای ۴°C نگهداری شدند. در طول انجام تیمارهای آزمایش، نمونه‌ها در دمای ۴°C نگهداری شدند. سپس نمونه‌های منی از نظر درصد تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا آکروزوم اسپرم مورد بررسی قرار گرفتند. تمام مراحل برای ۴ مرتبه به صورت مستقل تکرار شد.

ارزیابی اسپرم

به منظور بررسی تحرک اسپرم نمونه‌های منی به صورت ۸:۱ با رقیق‌کننده‌ی تریس-گلوکز رقیق شد. ۵ µL از منی روی لام با دمای ۳۷°C ریخته شده و یک لامل روی آن گذاشته شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ اختلاف فاز با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ × و مجهز به صفحه گرم با دمای ۳۷°C، تحرک اسپرم با اختلاف ۱۰ درصد در حداقل ۵ میدان دید تخمین زده و در انتها میانگین حاصل از این تخمین‌ها به عنوان درصد تحرک پیش‌رونده ثبت شد (Bucak *et al*., 2008).

برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم ۵ µL از نمونه‌ی اسپرم با ۵۰ µL از محلول هایپواسموتیک (۰/۷۳۵ گرم سیترات سدیم دی‌هیدرات و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH=۷) مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه آون با دمای ۳۷°C قرار گرفت (Jeyendran *et al.*, 1992). سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰×، حداقل در ۵ میدان دید ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی شد. اسپرم‌های دارای دم متورم به عنوان پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌های با دم بدون تورم به عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی ناسالم) در نظر گرفته شدند (García-Artiga, 1994).

برای ارزیابی زنده‌مانی اسپرم از روش De Leeuw *et al.* (1991) استفاده شد. بطور خلاصه، ۱۰µL از نمونه‌ی منی با ۱۰µL از محلول ۲٪ گلوتارآلدهید در بافر فسفات (۱۳۷mM سدیم کلرید، ۲/۷mM پتاسیم کلرید، ۸/۱ mM سدیم هیدروژن فسفات، ۱/۵ mM پتاسیم هیدروژن فسفات، pH=۷) ترکیب شد. پس از ۵ دقیقه، ۲۰µL از محلول رنگ هوخست بیس بنزامید H33258[1] (AppliChem, Germany) (۲۰µg/ml از H33258 در mM ۱۵۴ سدیم کلرید و ۱۵ mM تری سدیم سیترات pH=۷)، به آن اضافه شد. نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شده و سپس ۵ µL از نمونه روی لام قرار داده شده و با گذاشتن لامل روی آن، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus IX70, Olympus Optical CO., Ltd., Japan) و فیلتر WU، با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ × و در شرایط نور بسیار کم ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی شد. اسپرم‌های بدون رنگ به عنوان پاسخ مثبت (زنده) و اسپرم‌های با تلالو آبی رنگ به عنوان پاسخ منفی (مرده) در نظر گرفته شدند.

ارزیابی سلامت غشای آکروزوم، بر اساس روش Varisly et al. (2009) و با استفاده از رنگ آلکسافلور[2] (Molecular Probes, USA) انجام شد. در این روش لکتین گیاه بادام زمینی مورد استفاده، به بخش‌های بتا- گالاکتوز مرتبط با غشای بیرونی آکروزوم اسپرماتوزوای متصل می‌شود که نشان‌دهنده‌ی سلول‌هایی با آکروزوم سالم است. به طور خلاصه، از هر نمونه‌ی تیماری روی لام گسترش تهیه شد. گسترش‌ها پس از خشک شدن با استفاده از متانول مطلق ثابت و در دمای اتاق خشک شدند. سپس رنگ آلکسافلور ۴۸۸ (۱۰µg/mL) روی آنها ریخته شده و به مدت۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C، در محل تاریک و مرطوب نگهداری شدند. گسترش‌ها با استفاده از بافر فسفات (PBS) شسته شده، در شرایط نور بسیار کم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت با بزرگنمایی۴۰۰× و فیلتر WB، ۲۰۰ عدد اسپرم حداقل در ۵ میدان دید بررسی شد. آکروزوم‌های با رنگ سبز پراکنده و با حاشیه نامشخص به عنوان پاسخ منفی (آسیب دیده) و آکروزوم‌های با رنگ یکدست، شفاف و با حاشیه مشخص به عنوان پاسخ مثبت (سالم) در نظر گرفته شدند.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج

به منظور تعیین اثر افزودن مقادیر صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد مایع منی و سه روش مورد استفاده (I، II و III)، و اثرات متقابل آنها بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی و سلامت غشای آکروزوم اسپرم پوشش‌دارشده از آزمون فاکتوریل ۳×۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تیمار و ۴ تکرار استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایشی با استفاده از رویه GLM برنامه SAS (۱۹۹۶) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت و تفاوت‌ها در سطح $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد اثر متقابل روش‌های مورد استفاده و مقادیر مایع منی بر هیچ یک از فراسنجه‌های مورد بررسی معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). درصد زنده‌مانی اسپرم در مقدار صفر درصد مایع منی بیشتر از مقدار ۲۰ درصد مایع منی بود ($P<۰/۰۵$، جدول ۱). درصد زنده‌مانی اسپرم در مقدار ۱۰ درصد مایع منی تفاوتی با مقادیر صفر و ۲۰ درصد آن نشان نداد ($P>۰/۰۵$، جدول ۱). مقادیر مختلف مایع منی اثری بر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشای پلاسمایی و آکروزوم نداشتند ($P>۰/۰۵$، جدول ۱).

در تحقیق حاضر مجاورت اسپرم پوشش‌دارشده با ۲۰ درصد مایع منی به مدت ۴ ساعت پس از ذخیره‌سازی به مدت ۶۸ ساعت در ۴°C سبب کاهش زنده‌مانی اسپرم شد.

1. Hoechst bisbenzimide 33258 (H33258)
2. Alexa Fluor-488 conjugated lectin PNA from *Arachis hypogaea* (peanut)

جدول ۱- اثر اصلی مایع منی بر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشای آکروزوم پس از نگهداری به مدت ۷۲ ساعت در ۴°C

Table 1. Main effect of seminal plasma on sperm motility, viability, plasma membrane integrity and acrosome integrity after72 h storage at 4°C

	Seminal plasma (%)		
Traits	0	10	20
Sperm motility (%)	21.66 ± 2.98	19.16 ± 2.87	15.83 ± 1.93
Sperm viability (%)	69.42 ± 1.54[a]	65.42 ± 1.23[ab]	60.67 ± 3.26[b]
Membrane integrity (%)	60.92 ± 3.78	59.25 ± 3.30	55.33 ± 4.02
Acrosome integrity (%)	71.17 ± 2.72	66.67 ± 3.12	65.75 ± 3.12

[a-b] Different superscripts within same row indicate significant differences ($P < 0.05$).

مشخص شده است که خصوصیات فیزیولوژیکی اسپرم از جمله تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشا در شرایط آزمایشگاهی تحت تاثیر مایع منی قرار می‌گیرد (Kirkwood *et al*., 2008). در واقع، پپتیدهای کاتیونی موجود در مایع منی به فسفولیپید کولین‌های غشای اسپرم متصل شده و با تحریک خروج کلسترول و فسفولیپیدها موجب آسیب و ایجاد ناپایداری در غشای اسپرم طی مدت ذخیره‌سازی می‌شوند (Manjunath *et al*., 2002; Ricker *et al*., 2006). تحقیقات نشان داده است که اضافه کردن مایع منی به اسپرم انزالی و مجاورت آنها با اسپرم به مدت ۳ و ۶ ساعت موجب بروز آسیب در سلول و در نتیجه کاهش درصد زنده‌مانی آن می‌شود (Dott et al., 1979) که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد. از طرفی گزارش شده است که افزودن مایع منی به اسپرم انزالی قوچ در حضور ۲۰ درصد زرده تخم مرغ پس از انجماد و یخ‌گشایی سبب بهبود تحرک شده است (Graham, 1994). اثر پروتئین‌های منی با غلظت و مدت مجاورت آنها با اسپرم رابطه مستقیم داشته (Therien et al., 1999) و در واقع، غلظت بالای پروتئین‌های مایع منی یا مدت زمان طولانی مجاورت اسپرم با مایع منی موجب می‌شود تا بیشتر محتوای کلسترول و فسفولیپید غشای اسپرم از آن خارج شود (Manjunath *et al*., 2002). اگر چه خروج کلسترول از غشا اسپرم و در نتیجه افزایش سیالیت آن قبل از اتصال غشا اسپرم و تخمک ضروری است ولی در شرایط ذخیره‌سازی منجر به بی‌ثباتی غشا اسپرم شده که در نتیجه مقاومت اسپرم در برابر عوامل تنش‌زا کاهش یافته و درصد زنده‌مانی اسپرم به طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد (Barrios *et al*., 2000; Manjunath *et al*., 2002; Witte and Schafer-Somi, 2007). بعضی از محققین معتقدند که اتصال پروتئین‌های مایع منی به غشا اسپرم اگر چه می‌تواند نقش حمایتی برای غشا داشته باشد ولی با کاهش تراکم و افزایش سیالیت غشا حساسیت سلول را به تغییرات محیط افزایش می‌دهند (Muiño- ; Perez-Pe *et al*., 2001 Blanco *et al*., 2008). بنابراین، کاهش زنده‌مانی اسپرم پوشش‌دار شده متعاقب افزودن مایع منی احتمالاً به دلیل آثار پروتئین‌های مایع منی بر غشا اسپرم و خروج کلسترول از آن است.

کمترین میزان تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در روش I مشاهده شد ($P<۰/۰۵$، جدول۲). بین روش‌های II و III از نظر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$، جدول۲). روش‌ها اثری بر سلامت غشای آکروزوم نداشتند ($P>۰/۰۵$).

هدف دیگر این تحقیق بررسی امکان کاهش زمان مجاورت مایع منی با اسپرم در زمان ذخیره سازی و استفاده از مایع منی کمی قبل از استفاده از اسپرم‌های ذخیره شده، بود. ارزیابی‌های انجام شده از نظر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشای آکروزوم اسپرم نشان داد که انجام عمل سانتریفیوژ در حضور زرده تخم‌مرغ، اثر معنی‌داری بر فراسنجه‌های مورد بررسی در این پژوهش نداشت. یکی از روش‌های سریع، آسان و در دسترس برای جداسازی اسپرم از مایع منی انجام سانتریفیوژ است (Varner *et al*., 2008). تحقیقات انجام شده روی منی رقیق‌شده قوچ نشان داده است که انجام عمل سانتریفیوژ بدون حذف زرده تخم مرغ پس از سرد کردن و بلافاصله قبل از عمل انجماد اسپرم اثر معنی‌داری بر قدرت ماندگاری (Gil and and Rodriguez-Martinez, 2000) و باروری (Gil *et al*., 2002) منی ندارد که تاییدی بر نتایج این پژوهش است. از طرفی مشخص شده است با انجام عمل سانتریفیوژ تولید رادیکال‌های آزاد

جدول ۲- اثر مستقل روش افزودن مایع منی بر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا آکروزوم پس از نگهداری به مدت ۷۲ ساعت در ۴°C

Table 2. Main effect of method of adding seminal plasma on sperm motility, viability, plasma membrane integrity and acrosome integrity after 72 h storage at 4°C

	Methods†		
Traits	I	II	III
Sperm motility (%)	11.67 ± 1.12[b]	21.67 ± 2.41[a]	23.33 ± 2.84[a]
Sperm viability (%)	59.17 ± 3.23[a]	68.33 ± 0.78[a]	67.92 ± 1.41[a]
Membrane integrity (%)	48.17 ± 3.59[a]	65.17 ± 2.03[a]	62.17 ± 2.40[a]
Acrosome integrity (%)	67.50 ± 2.48[a]	69.67 ± 3.12[a]	66.42 ± 3.20[a]

† I: Performing centrifuge, removing supernatant and adding extender containing seminal plasma. II: Performing centrifuge, mixing supernatant and pellet and then adding extender containing seminal plasma. III: No action

[a-b] Different superscripts each row indicate significant differences ($P < 0.05$)

اکسیژن (ROS) افزایش می‌یابد که این ترکیبات با القا پراکسیداسیون چربی موجب تغییرات ساختاری و آسیب در غشا اسپرم می‌شوند که در نتیجه، قدرت ماندگاری اسپرم کاهش می‌یابد (Twigg et al., 1998). تحقیقات نشان داده است که کاروتن موجود در زرده تخم مرغ موجب محافظت غشا اسپرم در برابر اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد می‌شود (Aboagla and Terada, 2004; Purdy, 2006). همچنین، کاهش دما موجب تغییر وضعیت فیزیکی غشا پلاسمایی از مایع-کریستالی به حالت ژله‌ای می‌شود (Muller *et al.*, 2008). در این وضعیت چربی‌های غشا به صورت متراکم‌تری در کنار هم قرار می‌گیرند. تغییر در طرح قرارگیری چربی‌های غشای پلاسمایی اسپرم ناشی از سرما سبب کاهش سیالیت و افزایش شکنندگی غشای پلاسمایی می‌شود و در نتیجه مقاومت اسپرم نسبت به استرس‌های مکانیکی ناشی از سانتریفیوژ کاهش می‌یابد (Muller *et al.*, 2008). زرده تخم مرغ در طی مدت ذخیره‌سازی در سرما از خروج کلسترول از غشای پلاسمایی اسپرم جلوگیری می‌کند (Bergeron *et al.*, 2004). حضور کلسترول در بین چربی‌های غشای اسپرم سبب حفظ سیالیت آن در دماهای پایین می‌شود (Bloom et al., 1991). بعلاوه جایگزینی فسفاتیدیل کولین زرده تخم مرغ به جای فسفولیپیدهای خارج شده از غشای پلاسمایی موجب افزایش ثبات غشای پلاسمایی اسپرم در طی ذخیره‌سازی آن در سرما می‌شود (Witte and Schafer-Somi, 2007). بنابراین انجام سانتریفیوژ در دمای ۴°C و حذف زرده تخم مرغ احتمالاً از طریق افزایش آسیب‌های فیزیکی و اکسیداتیو باعث کاهش ماندگاری اسپرم قوچ شده است.

نتیجه‌گیری کلی

مجاورت اسپرم پوشش‌دارشده با ۲۰ درصد مایع منی به مدت ۴ ساعت بعد از ذخیره‌سازی در ۴°C سبب کاهش زنده‌مانی اسپرم می‌شود. انجام عمل سانتریفیوژ در ۴°C بدون حضور زرده تخم مرغ سبب خسارات شدید در اسپرم می‌شود، در صورتی که حضور زرده تخم مرغ مانع از آسیب ناشی از سانتریفیوژ به اسپرم می‌شود.

فهرست منابع

محمدی نودهی آ. و روستائی علی‌مهر م. ۱۳۹۲ بررسی اثر زرده تخم مرغ و سرما بر ذخیره سازی اسپرم پوشش‌دار شده قوچ تالشی در ۵°C. نشریه پژوهش‌های علوم دامی ایران، ۵ (۱) ۸۳-۷۷.

Aboagla E.M. and Terada T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. Theriogenology, 62: 1160-1172.

Anel L., Kaabi M., Abroug B., Alvarez M., Anel E., Boixo J.C., de la Fuente L.F., de Paz P. 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. Theriogenology, 63:1235-1247.

Barrios B., Pérez R., Gallego M. and Tato A. 2000. Seminal plasma proteins revent the cold-shock damage on ram sperm membrane. Biology of Reproduction, 63: 1531–1537.

Bergeron A., Crete M., Brindle Y. and Manjunath P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's EY 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: 708–717.

Bloom M., Evans E. and Mouritsen O.G. 1991. Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. Quarterly Reviews of Biophysics, 24: 293-397.

Bucak M.N., Atessahin A. and Yüce A. 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. Small Ruminant Research, 75: 128–134.

De Leeuw A.M., Den Daas G.H.E. and Woelders H. 1991. The fix vital stain method simultaneous determination of viability and acrosomal and status of bovine spermatozoa. Journal of Andrology, 12: 112-118.

De Pauw I.M.C., Van Soom D. M., Verberckmoes S. and de Kruif A. 2003. Effect of sperm coating on survical and penetrating ability of in vitro stored bovine spermatozoa. Theriogenology, 59: 1109–1122.

Dott H.M., Harrison R.A. and Foster G.C. 1979. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. Journal of Reproduction and Fertility, 55: 113–24.

García-Artiga C. 1994. Test de endósmosis en ovino, in: 7th International Meeting on Animal Reproduction, Murcia, Spain, pp. 77-81.

Gil J., Rodriguez-Irazoqui M., Söderquist L. and Rodriguez-Martinez H. 2002. Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. Theriogenology, 57: 1781–1792.

Gil J., Sijderquist L. and Rodriguez-Martinez H. 2000. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. Theriogenology, 54: 93-108.

Graham J.K. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. Theriogenology, 41: 1151-1162.

Jeyendran R.S., Van der Ven H.H. and Zaneveld L.J. 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. Archives of Andrology, 29: 105–116.

Kaabi M., Alvarez M., Anel E., Chamorro C.A., Boixo J.C., de Paz P., Anel L. 2006. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study. Theriogenology, 66:1876-1883.

Kirkwood R.N., Vadnais M.L. and Abad M. 2008. Practical application of seminal plasma. Theriogenology, 70: 1364–1367.

Manjunath P., Nauc V., Bergeron A. and Menard M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. Biology of Reproduction, 67: 1250–1258.

Maxwell W.M.C.and Salamon S. 1993. Liquid storage of ram semen—a review. Reprodtion and Fertility Devlepment, 5: 613–38.

Muiño-Blanco T., Pérez-Pé R. and Cebrián-Pérez J.A. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. Reproduction in Domestic Animals, 4: 18-31.

Muller K.P., Muller Pincemy G., Kurz A. and Labbe C. 2008. Cholesterol induced changes in trout spermatozoa. Biology of Reproduction, 78: 390-399.

National Research Council. 1985. Nutrient Requirements of Sheep. 6th revised edition. National Academies Press, Washington D.C, pp: 36-77.

Pagl R., Aurich J.E., MullerSchlosser F., Kankofer M. and Aurich C. 2006. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk based extender for storage of equine semen at 5°C. Theriogenology, 66: 1115-1122.

Paulenz H., Söderquist L., Pérez-Pé R. and Berg K.A. 2002. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. Theriogenology, 57: 823-836.

Perez-Pe R., Cebrian-Perez J.A. and Muino-Blanco T. 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. Theriogenology, 56: 425–434.

Purdy P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research, 63: 215–225.

Quinn P.J., Chow P.Y. and White I.G. 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. Journal of Reproduction and Fertility, 60: 403-407.

Ricker J.V., Linfor J.J., Delfino W.J., Kysar P., Scholtz E.L., Tablin F., Crowe J.H., Ball B.A., Meyers S.A. 2006. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipidbased cryoprotectants. Biology of Reproduction, 74: 359–365.

Roostaei-Ali Mehr M. and Sharafi F. 2013. Influence ofsperm coating and seminal plasma on frozen-thawed spermatozoa. Iranian Journal of Veterinary Reseach, 14: In press

SAS Institute. 1996. SAS/STAT User's Guide. Release 9.1.SAS Inst., Inc., Cary, NC.

Senger P.L. 2003. Pathways of pregnancy and parturition. 2nd ed. USA: Cadmus Professional Communication.

Stellflug J.N., Cockett N.E. and Lewis G.S. 2008. The influence of breeding intensity on above and below average sexual performance rams in single and multiple sire breeding environments. Animal Reproduction Science, 104: 248-256.

Therien I., Moreau R. and Manjunath P. 1999. Bovine seminal plasma phopholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. Biology of Reproduction, 61: 590-598.

Twigg J., Irvine D.S., Houston P., Fulton N., Michael L. and Aitken R.J. 1998. Iatrogenic DNA damage induced in humanspermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. Molecular Human Reproduction, 4: 439–445.

Varisly O., Uguz C., Agca C. and Agca Y. 2009. Motility and acrosomal integrity comparison between electro-ejaculated and epididimal ram sperm after exposure to a range of anisosmotic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. Animal Reproduction science, 110: 256-268.

Varner D.D., Love C.C., Brinsko S.P., Blanchard T.L., Hartman D.L., Bliss S.B., Carroll B.S., Eslick M.C. 2008. Semen processing for the subfertile stallion. Journal of Equine Veterinary Science, 28: 677–685.

Witte T.S. and Schafer-Somi S. 2007. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Animal Reproduction Science, 102: 181-193.

Evaluation of quality of ram coated sperm after 72 hours storage at 4 °C and adding seminal plasma

A. R. Vaferi[1], M. Roostaei Ali-Mehr[2]

1. MSc physiology student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Associate professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: 22-6-2013- Accepted: 19-10-2013)

Abstract

This experiment was conducted to evaluate the addition of seminal plasma to coated spermatozoa after 72 h. Semen was collected from four Taleshi rams by artificial vagina. To prepare coated spermatozoa, semen was collected in tube containing Tris-fructose-15% egg yolk. After initial evaluation, the samples were mixed and centrifuged. After removal of supernatant and dilution, samples were divided into three sections, cooled to 4°C and stored for 68 hours. The first part was centrifuged and the supernatant was removed (Method I). The second section was centrifuged and the supernatant was mixed again (Method II). The third section was kept without change at 4°C (Method III). Samples were obtained from each method were divided into three equal parts, added 0, 10 and 20% of seminal plasma and incubated at 4°C. Sperm motility, viability, plasma membrane integrity, acrosome membrane integrity were evaluated after 4 hours. Sperm viability was higher in the presence of 0% seminal plasma (69/416%) than 20% seminal plasma (60/667%; P<0/05). The lowest sperm motility (11/667%), viability (59/167%) and plasma membrane integrity (48/168%) was observed in Method I (P<0/05). Methods did not affect the integrity of the acrosome membrane (P>0.05). Therefore, removing egg yolk and adding seminal plasma reduces coated sperm quality after 72 h storage.

Keywords: Centrifuge, Coated Sperm, Seminal plasma, Taleshi ram

*Corresponding author: roostaei@guilan.ac.ir