تحقیقات تولیدات دامی
سال سوم/شماره چهارم/زمستان ۱۳۹۳ (۱۰۸-۹۹)

اثر افزودن زرده تخم مرغ به رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ و شوک سرما بر ذخیره‌سازی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ تالشی به‌صورت مایع در سرما

آزاده محمدی[۱]، محمد روستایی علی مهر [۲]*

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

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۷ – تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۴)

چکیده

این آزمایش به منظور تعیین اثر زرده تخم مرغ و شوک سرما بر اسپرم پوشش‌دارشده، با استفاده از آزمون فاکتوریل ۲×۵ با ۱۰ تیمار و ۵ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت اندازه‌گیری‌های تکرارشده در زمان انجام شد. منی از سه راس قوچ در پنج نوبت با استفاده از واژن مصنوعی متصل به لوله حاوی تریس- فروکتوز- ۱۵٪ زرده تخم‌مرغ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها تجمیع، سانتریفیوژ و مایع رویی حذف شد. رسوب به دو گروه و هر گروه به پنج زیر گروه مساوی تقسیم شد و بعد به هر قسمت صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ اضافه شد. نمونه های گروه اول به سرعت (شوک سرما) و نمونه‌های گروه دوم به‌تدریج تا ۵ سانتیگراد سرد شدند و بعد برای ۷۲ ساعت ذخیره شدند. تحرک پیش‌رونده اسپرم، سلامت غشا پلاسمایی، زنده-مانی (هوخست بیس بنزامید۳۳۲۵۸) و واکنش آکروزومی (آلکسافلور-۴۸۸) در ساعت صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ بررسی شد. زنده-مانی اسپرم طی شوک سرما و سردکردن تدریجی در غلظت ۵٪ زرده تخم مرغ (به ترتیب ۱/۴۷±۶۷/۶۰، ۱/۴۷±۷۷/۳۰) نسبت به صفر درصد (به ترتیب ۱/۴۷±۵۹/۷۵۰، ۱/۴۷±۷۱/۲۰) بیشتر بود. تحرک پیش‌رونده اسپرم، سلامت غشا پلاسمایی و آکروزومی اسپرم در حضور زرده تخم مرغ بهبود یافت، اما در تیمارهای حاوی زرده تخم‌مرغ تفاوت نداشت. بنابراین جهت ذخیره‌سازی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ در رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ و دما ۵°C استفاده از ۵٪ زرده تخم مرغ پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ، زرده تخم مرغ، شوک سرما، قوچ تالشی، پوشش‌دارکردن

* نویسنده مسئول: roostaei@guilan.ac.ir

مقدمه

ذخیره‌سازی منی مستلزم کاهش متابولیسم اسپرم از طریق کاهش دما است (Maxwell and Stojanov, 1996). سرما منجر به بروز تغییرات برگشت‌ناپذیر در اسپرم اکثر پستانداران بخصوص قوچ می‌شود (Salamon and Maxwell, 2000). حساسیت زیاد اسپرم قوچ به خسارات ناشی از سرما مرتبط با مقادیر کم کلسترول در غشای پلاسمایی آن است (Darin-Bennett and White, 1977). مایع منی حاوی گروهی از پروتئین‌ها است که طی انزال به کولین فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم متصل می‌شوند و خروج کلسترول و فسفولیپید از غشا را تحریک می‌کنند (Manjunath *et al.*, 1987). خروج کلسترول از غشا سبب می‌شود حساسیت اسپرم به خسارت‌های ناشی از کاهش دما افزایش یابد (Manjunath and The´rien, 2002). پوشش‌دارکردن اسپرم با رقیق-کننده حاوی زرده تخم‌مرغ روش مناسبی جهت جداسازی سریع مایع منی است. در این روش مدت زمان مواجهه اسپرم و مایع منی از طریق جمع‌آوری اسپرم در لوله حاوی رقیق‌کننده تریس– زرده تخم‌مرغ به حداقل می-رسد (De pauw *et al.*, 2003).

کاهش دما و شوک سرما طی ذخیره‌سازی از طریق اعمال تغییرات فیزیکی و بیوشیمیایی توان باروری اسپرم انزالی را کاهش‌می‌دهد (Salamon and Maxwell, 2000). کنترل سرعت سردشدن و استفاده از زرده تخم‌مرغ از جمله ابزار مقابله با آسیب‌های شوک سرما هستند. مشخص شده زرده تخم مرغ تحرک و زنده‌مانی اسپرم ((De pauw *et al.*, 2003) را حفظ می‌کند. همچنین شیر به عنوان یک رقیق‌کننده مناسب و طبیعی جهت حفظ اسپرم در برابر آثار مضر سرما شناخته شده‌است (Maxwell and Salamon, 1993). تا کنون اثر رقیق-کننده شیر پس‌چرخ در نگهداری اسپرم پوشش‌دارشده قوچ مورد بررسی قرار نگرفته‌است. بنابراین هدف از این تحقیق بررسی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ طی ذخیره‌سازی با رقیق‌کننده شیر حاوی مقادیر مختلف زرده تخم مرغ در ۵°C است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

این آزمایش با استفاده از سه راس قوچ نژاد تالشی با میانگین وزنی ۴۰ kg از شهریور تا مهرماه ۱۳۹۰ در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. روزانه ۱۳۰۰g یونجه خشک، ۵۹۰ g جو، ۶۲۰ g کاه در دو وعده خوراک صبح و شب در اختیار دام‌ها قرارگرفت. در طول آزمایش نمک و آجرلیسیدنی (مکمل مواد معدنی) به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرارداده‌شد. نمونه‌های منی دوبار در هفته به فاصله دو روز و به کمک واژن مصنوعی استریل و حضور میش فحل جمع آوری‌شد. به منظور ایجاد فحلی دائمی در میش به صورت خلاصه، به مدت ۷ روز سیدر حاوی پروژسترون در واژن میش قرارداده‌شد. روز برداشت سیدر ۱ mL وتاسترول[1] (استرادایول بنزونات ۲ mg/mL) به صورت عضلانی تزریق شد. سپس هر ۴۸ ساعت ۰/۲ mL وتاسترول برای ادامه فحلی تزریق شد (Stellflug *et al.*, 2008). با استفاده از مهبل مصنوعی دو انزال با فاصله ۱۰ دقیقه از هر قوچ اخذ شد. انزال اول هر قوچ از آزمایش حذف شد. جهت پوشش‌دارکردن اسپرم، انزال دوم در لوله حاوی تریس- فروکتوز [۳/۲۵۸ g تریس-(هیدروکسی متیل)- آمینومتان، ۱/۸۷۰ g اسید سیتریک مونوهیدرات، ۰/۹۳ g فروکتوز و ۰/۵ mL جنتامایسین (۵۰ mg/mL) در ۱۰۰ mL آب مقطر، ۷= pH] و ۱۵٪ زرده تخم مرغ (حجم/ حجم) جمع آوری و به وسیله فلاکس عایق حاوی آب ۳۵°C به آزمایشگاه منتقل‌شد. در مجموع تعداد ۳۰ انزال در ۵ نوبت جمع آوری شد.

رقیق‌سازی، سردکردن و ذخیره‌سازی

در آزمایشگاه نمونه‌های منی از نظر تحرک پیش‌رونده و غلظت بر اساس توضیحات زیر مورد بررسی قرارگرفتند. نمونه‌هایی که تحرک پیش‌رونده کمتر از۸۰٪ و غلظت کمتر از $۲/۵ \times ۱۰^{۹}$ داشتند از آزمایش حذف شدند. نمونه-های منی تجمیع و با قدرت ۷۰۰×g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژشدند. پس از سانتریفیوژ مایع‌رویی حذف شد و ۱ mL رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ استاندارد (Salamon

[1] Vetasterol

and Maxwell, 2000) به رسوب اضافه و به آرامی مخلوط شد و سانتریفیوژ دوم با همان شرایط انجام شد و رسوب با استفاده از رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ تا غلظت 1×10^{9} mL/ رقیق شد. نمونه‌ها به دو گروه و هر گروه به پنج زیر گروه مساوی تقسیم شدند. نمونه های هر گروه با استفاده از رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ حاوی صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ یا ۴۰ ٪ زرده تخم مرغ به صورت ۱:۱ (حجم/ حجم) رقیق شد تا غلظت نهایی اسپرم به 500×10^{6} و زرده تخم مرغ به صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ ٪ رسید. از آنجاییکه ذخیره‌سازی در شرایط بی‌هوازی سبب کاهش تنش اکسیداتیو می‌شود (Pagl *et al.*, 2006) لذا نمونه‌ها به داخل سرنگ ۵ میلی لیتری کشیده شدند و سرسوزن به سرنگ متصل شد و با استفاده از پلی‌ونیل‌الکل سوراخ سوزن مسدود و در ظرف حاوی آب ºC ۳۷ قرار داده‌شد. سپس تیمارهای بخش اول به وسیله آب و یخ (۵°C) به صورت ناگهانی (شوک سرما) و تیمارهای بخش دوم به کمک دستگاه سردکننده (Test Chamber EG53AH, KATO, Japan) به صورت تدریجی (۰/۲۵ °C/min) تا ۵°C سردشدند. هر دو بخش به مدت ۷۲ ساعت در دما ۵°C نگهداری شدند. تحرک پیش‌رونده اسپرم، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا آکروزوم در ساعت صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ پس از سردسازی بررسی شد. تمام مراحل آزمایش برای ۵ مرتبه به صورت مستقل تکرارشد.

ارزیابی اسپرم

به منظور ارزیابی تحرک اسپرم µL ۵ از نمونه روی لام با دما °C ۳۷ گذاشته شد و بعد از گذاردن یک لامل بر روی آن با استفاده از میکروسکوپ اختلاف فاز مجهز به صفحه گرم با بزرگنمایی ۴۰۰×، در ۵ میدان دید با اختلاف ۱۰٪ تحرک ۱۰۰ اسپرم تخمین زده‌شد. میانگین حاصل از مشاهدات به عنوان درصد تحرک پیش‌رونده ثبت شد (Bucak *et al.*, 2009).

برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم از محلول هایپواسموتیک (۰/۷۳۵ g سیترات سدیم دی‌هیدرات و g ۱/۳۵۱ فروکتوز در mL ۱۰۰ آب مقطر، pH=۷) استفاده شد (Jeyendran *et al.*, 1992; Garcia-Artiga,1994). برای این منظورµL ۵ منی با µL ۵۰ از محلول هایپواسموتیک مخلوط و درون انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای °C ۳۷ قرارداده شد. سپس ۱۰۰ عدد اسپرم حداقل در ۵ میدان دید زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰× بررسی شد. اسپرم‌های دارای دم متورم به عنوان پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم-های دارای دم صاف به عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی ناسالم) در نظر گرفته شدند.

برای ارزیابی زنده‌مانی اسپرم از رنگ هوخست بیس-بنزامید[1] H33258 (AppliChem, Germany) استفاده شد (De Leeuw *et al.*, 1991). بطور خلاصه µL ۱۰ از تیمارها با µL ۱۰ از محلول ۲٪ گلوتارآلدهید در بافر فسفات (۱۳۷ mM/L سدیم کلرید، ۲/۷ mM/L پتاسیم کلرید، ۸/۱ mM/L سدیم هیدروژن فسفات، mM/L ۱/۵پتاسیم هیدروژن فسفات، pH=۷) مخلوط و تثبیت شد. µL ۲۰ از محلول رنگ هوخست بیس‌بنزامید (۲۰ µg/mL از H33258 در بافر M ۰/۱۵۴سدیم کلرید و M ۰/۰۱۵ تری سدیم سیترات pH=۷) به نمونه اضافه شد و بعد از ۳ تا ۵ دقیقه در دمای اتاق µL ۵ از نمونه روی لام قراردادشده و با گذاشتن لامل بر روی آن، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر WU با بزرگنمایی۴۰۰×، ۱۰۰ عدد اسپرم در شرایط نور بسیار کم بررسی شد. اسپرم‌های با تلالوء آبی رنگ به عنوان پاسخ منفی (مرده) و اسپرم‌های بدون رنگ به عنوان پاسخ مثبت (زنده) در نظر گرفته شدند.

ارزیابی سلامت غشا آکروزوم، با استفاده از رنگ آلکسافلور[2] PNA-۴۸۸ (Molecular Probes, USA) انجام شد (Varisly *et al.*, 2009). به طور خلاصه از نمونه روی لام گسترش تهیه شد. گسترش‌ها پس از خشک شدن با استفاده از متانول مطلق تثبیت و در دمای اتاق خشک شدند. سپس µL ۱۰ از رنگ آلکسافلور ۴۸۸ (۱۰ µg/mL) روی آن‌ها ریخته شد و به مدت۳۰ دقیقه در دما °C ۳۷ در محل تاریک و مرطوب نگهداری شدند. بعد گسترش‌ها با استفاده از بافر فسفات (PBS) شسته شده و در شرایط نور بسیار کم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر WB با بزرگنمایی۴۰۰× تعداد ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی‌شدند و آکروزوم‌های با رنگ یکدست، شفاف و با حاشیه مشخص به عنوان پاسخ مثبت (سالم) و

[1] Hoechst bisbenzimide 33258 (H33258)
[2] Fluorescein isothiocyanate-peanut agglutinin (FITC-PNA)

آکروزوم‌های با رنگ پراکنده و با حاشیه نامشخص به عنوان پاسخ منفی (آسیب دیده) در نظر گرفته شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تعیین اثر مقادیر مختلف زرده تخم مرغ (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰٪)، روش سردکردن (کاهش تدریجی دما و کاهش ناگهانی دما) و اثرات متقابل آنها بر تحرک پیش-رونده، سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا آکروزوم اسپرم پوشش‌دارشده قوچ از آزمون فاکتوریل (۲×۵) با ۱۰ تیمار و ۵ تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت اندازه گیری‌های تکرارشده در زمان (صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی در دما ۵ ^{o}C) استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایشی با استفاده از رویه Mixed برنامه SAS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون توکی صورت گرفت و تفاوت‌ها در سطح $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت LSMeans±SE ارائه شدند.

نتایج

سطوح مختلف زرده تخم مرغ بر تحرک پیش‌رونده اسپرم، سلامت غشای پلاسمایی و آکروزومی اثر داشت (جدول۱: $P<۰/۰۵$). کمترین میزان تحرک پیش‌رونده اسپرم، سلامت غشای پلاسمایی و آکروزومی در سطح صفر درصد زرده تخم مرغ مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). حضور زرده تخم مرغ تحرک پیش‌رونده اسپرم، سلامت غشای پلاسمایی و آکروزومی را بهبود بخشید ($P<۰/۰۵$). بین سطوح حاوی زرده تخم مرغ از نظر تحرک پیش‌رونده اسپرم، سلامت غشای پلاسمایی و آکروزومی معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$).

اثر سرعت سردکردن بر تحرک پیش‌رونده اسپرم، سلامت غشای پلاسمایی و آکروزومی معنی‌دار بود (جدول۱: $P<۰/۰۵$). تحرک پیش‌رونده اسپرم، سلامت غشای پلاسمایی و آکروزومی طی کاهش تدریجی دما به صورت معنی‌داری نسبت به کاهش ناگهانی دما بیشتر بود ($P<۰/۰۵$).

جدول ۱- اثر مستقل زرده تخم‌مرغ و روش سرد کردن بر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشای پلاسمایی، سلامت غشا آکروزوم (LSMeans±SE)

Table 1.The main effect of egg yolk and chilling methods on progressive motility, plasma membrane integrity, acrosome membrane integrity (LSMeans±SE)

Variables		Progressive motility	Plasma membrane integrity	Acrosome membrane integrity
Egg Yolk (%)	0	32.750±3.22^{a}	64.225±2.04^{a}	65.175±1.87^{a}
	5	42.250±2.81^{b}	72.150±1.75^{b}	72.450±1.69^{b}
	10	49.500±2.99^{b}	73.370±1.87^{b}	73.575±1.78^{b}
	15	49.500±3.51^{b}	69.950±1.96^{b}	72.625±1.79^{b}
	20	49.500±3.55^{b}	65.500±1.86^{b}	69.725±1.94^{b}
Chilling methods	Gradual	55.700±1.80^{a}	77.600±0.79^{a}	75.450±1.01^{a}
	Shock	33.800±1.85^{b}	62.080±1.09^{b}	65.970±1.14^{b}

^{a,b}Values with different superscripts within a column are different significantly (P<0.05).

نتایج نشان داد اثر متقابل سطوح مختلف زرده تخم مرغ و روش سردکردن بر زنده‌مانی اسپرم معنی‌دار بود (شکل۱: $P<۰/۰۵$). زنده‌مانی اسپرم در تمام مقادیر زرده تخم مرغ طی کاهش تدریجی دما به صورت معنی‌داری نسبت به کاهش ناگهانی دما بیشتر بود ($P<۰/۰۵$). بیشترین زنده‌مانی اسپرم در تیمارهای حاوی زرده تخم مرغ در شرایط کاهش تدریجی دما به دست آمد ($P<۰/۰۵$). کمترین زنده‌مانی اسپرم متعلق به تیمار بدون زرده تخم مرغ در شرایط کاهش ناگهانی دما بود ($P<۰/۰۵$). طی کاهش تدریجی و ناگهانی دما بین تیمارهای حاوی زرده تخم مرغ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). زنده‌مانی در تیمار فاقد زرده تخم مرغ در شرایط کاهش تدریجی دما بیشتر از تمام تیمارها در شرایط کاهش ناگهانی دما بود ($P<۰/۰۵$).

تغییرات تحرک پیش‌رونده، سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا آکروزوم در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸

و ۷۲ ساعت معنی‌دار بود (جدول۲: $P<۰/۰۵$). بیشترین میزان تحرک پیش‌رونده، سلامت غشای پلاسمایی، زنده-مانی و سلامت غشا آکروزوم در ساعت صفر ($P<۰/۰۵$) و کمترین میزان در ساعت ۷۲ مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

بحث

نتایج نشان داد که اسپرم پوشش‌دارشده در رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ نسبت به شوک سرما حساس است و افزودن زرده تخم‌مرغ اگرچه شدت بروز آسیب‌های حاصل از شوک سرما را کاهش داد اما مانع از بروز آن نشد. کاهش دما منجر به کاهش تحرک پیش‌رونده، سلامت غشای پلاسمایی و آکروزومی اسپرم قوچ می‌شود (White, 1993). میزان حساسیت اسپرم به شوک سرما تحت تاثیر ماهیت لیپیدهای غشای پلاسمایی بخصوص کلسترول قرار دارد (Drobins *et al.*, 1993).

جدول ۲- اثر مستقل زمان ذخیره‌سازی بر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی، سلامت غشا آکروزوم (LSMeans±SE)

Table 3. The main effect of storage time on sperm progressive motility, plasma membrane integrity, viability, acrosome membrane integrity (LSMeans±SE)

Variable		Progressive motility (%)	Plasma membrane integrity (%)	Viability (%)	Acrosome membrane integrity (%)
Storage time	0	60.200±2.74[a]	77.780±1.53[a]	82.980±1.48[a]	81.260±1.25[a]
	24	48.800±2.67[b]	71.420±10.49[b]	77.920±1.49[b]	74.360±1.25[b]
	48	40.400±2.68[c]	67.340±1.52[c]	72.620±1.58[c]	66.620±1.19[c]
	72	29.600±2.15[d]	62.820±1.71[d]	65.600±1.65[d]	60.600±1.33[d]

[a,b] Values with different superscripts within a column are different significantly (P<0.05).

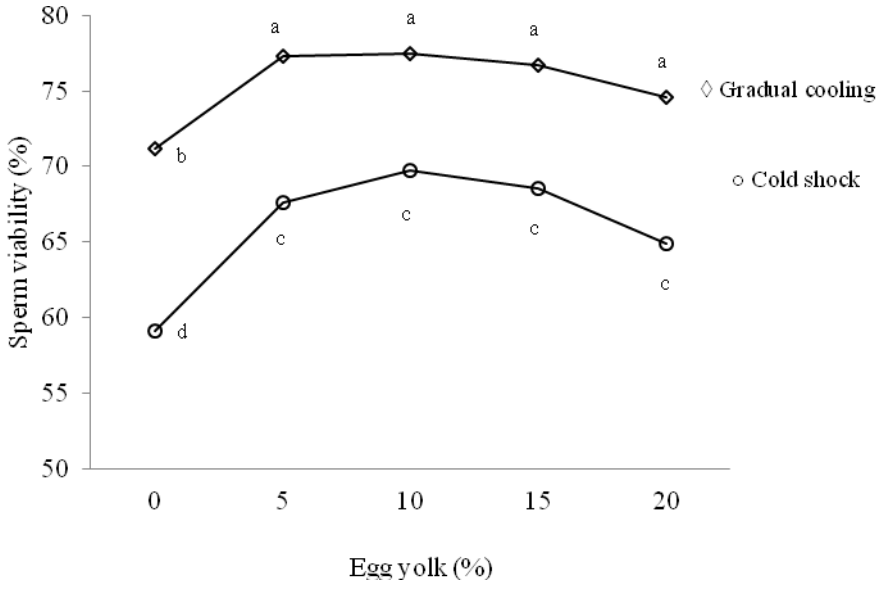

Fig. 1. Interaction effect of egg yolk and methods of reducing the temperature on sperm viability.
[a-d] Different superscripts indicate significant differences among treatments in each storage time (P < 0.05).

شکل ۱- اثر متقابل زرده تخم مرغ و روش سردکردن بر زنده‌مانی اسپرم

[a-d]حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در هر زمان ذخیره‌سازی است

کلسترول مانع از اختلال در چیدمان چربی‌های غشای پلاسمایی طی کاهش دما می‌شود (Moore *et al.*, 2005). میانگین کلسترول در گونه‌های مختلف به ازای یک میلیارد اسپرم از ۲۸۰-۵۶۰ میکروگرم متغیر است. مطالعات نشان داد که اسپرم قوچ تقریبا نیمی از مقدار کلسترول اسپرم خرگوش و انسان را دارد (Darin-Bennett and White, 1977). مقادیر کم کلسترول در غشا پلاسمایی اسپرم قوچ ($\mu g/10^9$ ۳۰۰ سلول) منجر به افزایش ناپایداری غشای پلاسمایی طی کاهش ناگهانی دما می‌شود (Darin-Bennett and White, 1977). مجاورت اسپرم با زرده تخم مرغ و حذف مایع منی احتمالا خروج کلسترول از غشا را کاهش می‌دهد و باعث بهبود ماندگاری اسپرم می‌شود (Bergeron *et al.*, 2004). از طرفی مشخص شده‌است که طی سردکردن نفوذپذیری غشا به شدت افزایش می‌یابد (Ortman and rodriguez-Martinez, 1994). ذخیره‌سازی اسپرم انزالی گاو با رقیق-کننده شیر در دما ۵°C سبب افزایش سرعت دریافت کلسیم و غلظت کلسیم در داخل سلول می‌شود (Zhao and Buhr, 1995). افزایش غلظت کلسیم از مهمترین مشخصات ظرفیت‌پذیری است (Witte and Schäfer-Somi, 2007). ظرفیت‌پذیری زودهنگام از طریق فعال کردن فرایند متابولیک، دوره حیات اسپرم را کاهش خواهدداد (Pummer *et al.*, 2002). افزایش غلظت کلسیم آزاد داخل اسپرم سبب آغاز واکنش آکروزومی خواهدشد (Olde-Clark and Sego, 1992). بنابراین به نظر می‌رسد شوک سرما سبب القا آسیب‌های بسیار شدید می‌شود و احتمالا عوامل سرما محافظ موجود در شیر و زرده تخم مرغ قادر نیستند از بروز این آسیب‌ها در اسپرم پوشش-دارشده ممانعت کنند.

نتایج نشان داد افزودن زرده به رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ منجر به بهبود تحرک پیش‌رونده اسپرم، سلامت غشای پلاسمایی و آکروزومی شد ولی افزودن بیش از ۵٪ زرده تخم مرغ آثار حفاظتی بیشتری را در ذخیره‌سازی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ ایجاد نکرد. مشخص شده‌است رقیق-کننده شیر پس‌چرخ حاوی ۵٪ زرده تخم مرغ سبب حفظ تحرک و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم انزالی قوچ (Gill *et al.*, 2011)، حفظ تحرک اسپرم انزالی بز (Jiménez-Rabadna *et al.*, 2012)، زنده‌مانی و تحرک اسپرم انزالی آلپاکا (Santiani *et al.*, 2005) شده است. درحالیکه در شرایط انجماد و یخ گشایی افزودن بیش از ۱۰٪ زرده تخم مرغ به رقیق‌کننده شیر سبب بهبود تحرک، سلامت غشا و تغییرات مربوط به ظرفیت‌یابی اسپرم قوچ می‌شود (Gill *et al.*, 2003). مشخص شده است که زرده تخم مرغ از اسپرم در برابر خسارت‌های ناشی از کاهش دما (Witte *et al.*, 2009) و شرایط مخرب محیطی محافظت می‌کند (Aboagla and Terada, 2004). زرده تخم مرغ تازه حاوی مقادیر نسبتا زیاد کلسترول در حدود mg/g ۱۳/۰۲±۲/۰۳ است که می‌تواند در حمایت از غشا اسپرم نقش مهمی داشته باشد (El Bagir *et al.*, 2006). لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین (LDL) به عنوان مهم-ترین ترکیب زرده‌ی تخم مرغ در حفاظت از اسپرم شناخته شده‌اند (Bergeron and Manjunath, 2006). LDL و فسفولیپیدهای زرده تخم مرغ می‌توانند اثر حفاظتی خود را به صورت مستقیم از طریق جایگزین شدن در غشا (Trimeche *et al.*, 1996) و یا با ایجاد لایه-ای در سطح غشا (Manjunath and The´rien, 2002) اعمال کنند. همچنین گزارش شده‌است که LDL زرده تخم مرغ از طریق اتصال به پروتئین‌های مایع منی گاو و یا با اشغال محل جایگزینی آن‌ها روی غشا مانع از اتصالشان به غشا اسپرم شده و بدین‌ترتیب خروج فسفولیپید و کلسترول را از غشای اسپرم کاهش می‌دهد و بطور غیرمستقیم در حفاظت از اسپرم نقش ایفا می‌نماید (Bergeron and Manjunath, 2006). مطالعات نشان داد حضور ماکرومولکول‌ها در رقیق‌کننده شیر- زرده تخم مرغ می‌تواند تحرک و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم انزالی نریان را حفظ کند (Braun *et al.*, 1995). از طرفی پروتئین‌های شیر عامل اصلی حفاظت از اسپرم در برابر استرس‌های محیطی هستند (Bergeron *et al.*, 2007). از میان پروتئین‌های شیر کازئین به عنوان ماده سرما محافظ اصلی شناخته شده‌است (Leboeuf *et al.*, 2003). کازئین در شیر به صورت ترکیبات کلوئیدی بزرگی به نام میسل وجوددارد. کازئین با غلظت g/L ۲۷ حدود ۸۰٪ پروتئین-های شیر (وزن/وزن) را به خود اختصاص می‌دهد (Bergeron *et al.*, 2007). به جز کازئین، بتا-لاکتوگلوبولین، آلفا-لاکتالبومین، آلبومین، ایمونوگلوبولین‌ها و لاکتوفرین که در مجموع به آنها پروتئین‌های آب پنیر (Whey protein) اتلاق‌می‌شود حدود ۲۰٪ از پروتئین‌های شیر را تشکیل می‌دهند

(Farrell *et al.*, 2004). پروتئین‌های آب پنیر احتمالا در حفاظت از اسپرم در زمان عمل‌آوری منی دخالت دارند (Lusignan *et al.*, 2011). بنابراین احتمالا حضور کازئین و سایر پروتئین‌ها در رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ سبب شده‌است که غلظت ۵٪ زرده تخم‌مرغ جهت حفظ عملکرد اسپرم پوشش‌دارشده کافی باشد.

نتایج نشان داد که اثر متقابل مقادیر زرده تخم مرغ و شرایط سردکردن بر زنده‌مانی اسپرم پوشش‌دارشده معنی‌دار بود و افزودن زرده تخم مرغ بیش از ۵٪ در شرایط سردکردن تدریجی و ناگهانی سبب بروز آثار حفاظتی بیشتر نشد. در زمان شوک سرما کازئین شیر عمدتا بطور فیزیکی سبب حفظ زنده‌مانی اسپرم قوچ می‌شود (Manjunath, 2012). حضور زرده تخم مرغ در رقیق‌کننده طی ذخیره‌سازی دریافت لیپید توسط غشاپلاسمایی اسپرم را تحریک و ثبات غشا را طی کاهش دما افزایش می‌دهد (Bergeron and Manjunath, 2006). مطالعات انجام‌شده با رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ در شرایط سردکردن تدریجی نشان داد برای نگهداری اسپرم انزالی قوچ (Kulaksiz *et al.*, 2012; Marti *et al.*, 2003) و نریان (Jasko *et al.*, 1992) افزودن زرده تخم‌مرغ به شیر پس‌چرخ الزامی است و حضور زرده تخم مرغ در شیر پس‌چرخ اثر حفاظتی شیر را به صورت محدود افزایش می‌دهد (Gill *et al.*, 2011). از طرفی مشخص شده است اختلال در عملکرد غشا اسپرم بخصوص فعالیت آنزیم‌های آن به دنبال تغییر حالت فیزیکی چربی‌های غشا از حالت مایع-کریستالی به ژل و یا برعکس در اثر تغییر دما بروز می‌کند (Manjunath and The´rien, 2002). در نتیجه به نظر می‌رسد تغییرات مخرب سلولی در اثر افت سریع دما اجتناب‌ناپذیر است و استفاده از روش پوشش‌دارکردن اسپرم و افزودن زرده تخم مرغ به رقیق‌کننده شیر می‌تواند شدت آسیب‌های شوک سرما را کاهش‌دهد.

نتیجه‌گیری کلی

افزودن ۵٪ زرده تخم مرغ به رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ جهت حفظ ویژگی‌های عملکردی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ طی ذخیره‌سازی در دما ۵°C مناسب است.

فهرست منابع

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

Bergeron A., Brindle Y., Blondin P. and Manjunath P. 2007. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. Biology of Reproduction, 77: 120–126.

Bergeron A., Crete, M. H., Brindle Y. and Manjunath P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. Biology Reproduction, 70: 708–717.

Bergeron A. and Manjunath P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Molcular Reproduction and Development, 73: 1338–1344.

Braun J., Hochi S., Oguri N., Sato K. and Torres-Boggino F. 1995. Effect of different protein soplements on motility and plasma membrane integrity of frozen-thawed stallion spermatozoa. Cryobiology, 32: 487-492.

Bucak M. N., Sariozkan S., Tuncer P. B., Ulutas P. A. and Akcadag H. I. 2009. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation, and antioxidant activities in angora goat semen following cryopreservation. Small Ruminant Research, 81: 90-95.

Darin-Bennett A. and White I. G. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. Cryobiology, 14**:** 466-470.

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 A., Maes D., Verberckmoes S. and De Kruif A. 2003. Effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of invitro stored bovine spermatozoa. Theriogenology, 59: 1109-1122.

Drobins E. Z., Crowe L. M., Berger T., Anchordoguy T. J., Overstreet J. W. and Crowe J. H. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. Journal of experimental zoology, 265: 432-437.

El Bagir N. M., Hama A. Y., Hamed R. M., Abd El Rahim A. G. and Beynen A. C. 2006. Lipid composition of egg yolk and serum in laying hens fed diets containing black cumin (Nigella sativa). International Journal of Poultry Science, 5: 574–578.

Farrell H. M., Jimenez-Flores R., Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C. L., Hollar C. M., Ng-Kwai-Hang K. F. and Swaisgood H. E. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk sixth revision. Journal of Dairy Science, 87: 1641-1674.

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

Gill J., Fierro S., Bentancur O. and Olivera-Muzante J. 2011. Chilled Storage of Ram Semen Improves with the Addition of Egg Yolk and Glycerol to Milk-Based Extenders. Reproduction in Domestic Animals, 46: 503–507.

Gill J., Lundeheim N., Soderquist L. and Rodriguez-Martinez H. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology, 59: 1241–1255.

Jasko D. J., Hathaway J. A., Schaltenbrand V. L., Simper W. D. and Squires E. L. 1992. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stalion spermatozoa. Theriogenology, 37: 1241-1252.

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.

Jiménez-Rabadna P., Ramna M., Garca-lvarezb O., Maroto-Moralesb A., del Olmob E., Pérez-Guzmna M. D., Bisbalb A., Fernndez-Santosb M. R., Gardeb J. J. and Solerb A. J. 2012. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. Animal Reproduction Science, 132: 88– 95.

Kulaksiz R., cebi C. and akcay E. 2012. The effect of different extenders on the motility andmorphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science, 36: 177-182.

Leboeuf B., Guillouet P. H., Batellier F., Bernelas D., Bonne J. L., Forgerit Y., Renaud G. and Magistrini M. 2003. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen, Theriogenology, 60: 867–877.

Lusignan M. F., Bergeron A., Lafleur M. and Manjunath P. 2011. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. Biology of Reproduction, 85: 457-464.

Manjunath P. 2012. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection byextender components**.** Animal Reproduction, 9: 809-815.

Manjunath P., Sairam M. R. and Uma J. 1987. Purification of four gelatinbinding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. Bioscience Reports, 7: 231–238.

Manjunath P. and Thérien I. 2002. Role of seminal plasma phospholipidbinding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. Journal of Reproductive Immunology, 53: 109–119.

Marti J. I., Martı E., Cebrián-Pérez J. A. and Muiño-Blanco T. 2003. Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. Theriogenology, 60: 1025–1037.

Maxwell W. and Salamon S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. Reproduction Fertility and Development, 5: 613–638.

Maxwell W. M. C. and Stojanov T. 1996. Liquid Storage of Ram Semen in the Absence or Presence of Some Antioxidants. Reproduction Fertility Development, 8: 1013-1020.

Moore A. I., Squires E. L. and Graham J. K. 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. Cryobiology, 51: 241–249.

Olde-Clark P. and Sego R. 1992. Calcium alters capacitation and progressive motility of uterine sperm from +/+ and $t^{w/32}$/+ mice. Biology of Reproduction, 47: 629-635.

Ortman K. and rodriguez-Martinez H. 1994. Membrane damage during dilution, cooling and freezig-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. Journal of Veterinary Medicine Series A, 41: 37-47.

Pagl R., Aurich J. E., Muller-Schlosser 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 ºC. Theriogenology, 66: 1115–1122.

Pummer A. C., Linfor J. J. and Meyers S. A. 2002. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in commercial semen extenders. Theriogenology, 57: 1493-1501.

Salamon S and Maxwell W. M. C. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science, 62: 77–111.

Santiani A., Huanca W., Sapana R., Huanca T., Sepúlveda N. and Sánchez R. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (Lama pacos) semen using two different cryoprotectants and extenders. Asian Journal of Andrology, 7: 303–309.

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

Trimeche A., Anton A. M., Renard P., Gandemer G. and Tainturie D. 1996. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. Cryobiology, 34: 385–393.

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

White I. G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. Reproduction Fertility Development, 5: 639-658.

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 Reproduction Science, 102: 181–193.

Witte T. S., Schäfer-Somi S., Kuchar A., Mostl E., Iben C. and Aurich C. 2009. Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. Animal Reproduction Science, 110: 293–305.

Zhao Y. and Buhr M. M. 1995. Cryopreservation extenders affect calcium flux in bovine spermatozoa during temperature challenge. Journal of Andrology, 16: 278-285.

Animal Production Research
Vol. 3, No. 4, 2015 (99-108)

University of Guilan

Effect of the addition of egg yolk to skim milk extender and cold shock on ram coated spermatozoa under cold liquid storage

A. Mohamadei[1], M. Roostaei-Ali Mehr[2*]

1. Graduate M.Sc. 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: 16-2-2014 – Accepted: 15-11-2014)

Abstract

This experiment was conducted to determine the effect of egg yolk levels and cold shock on coated spermatozoa by using 2 × 5 factorial arrangement of the ten treatments and 5 replicates under a repeated measure randomize design. At 5 sessions, semen was collected from three ram by artificial vagina contact with a tube containing Tris- fructose-egg yolk 15%. Samples were pooled, centrifuged and removed supernatant. Aliquot was split into two groups and each one was split into 5 subgroups and after that it was added egg yolk 0, 5, 10, 15 and 20%. First group was encountered with cold shock and second group was gradually cooled up to 5°C then samples were incubated for 72 h. Progressive sperm motility, plasma membrane integrity, viability (by *Hoechst 33258 fluorescent* staining) and acrosome reaction (by PNA-Alexa flur-488) were investigated at 0, 24, 48 and 72 h. Sperm viability under cold shock and gradual cooling was higher in 5% egg yolk (67.6 ±1.47and 77.3±1.47, respectively) than 0% egg yolk (59.75±1.47 and 71.2±1.47, respectively). Sperm progressive motility, plasma membrane and acrosome integrity were improved in present of egg yolk; but, there was no difference among the treatments containing egg yolk. It was suggested that 5% egg yolk was superior to keep the function of ram coated spermatozoa for storage at 5ºC in skim milk extender.

Keywords: Skim milk, Egg yolk, Cold shock, Coating, Taleshi ram

*Corresponding author: roostaei@guilan.ac.ir