نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۳ شماره ۳/ سال ۱۳۹۲

اثر افزودن مایع منی به اسپرم پوشش‌دار شده قوچ تالشی در حضور و عدم حضور زرده تخم مرغ

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

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۱۹

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

[۲] استادیارگروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

*مسئول مکاتبه: Email: roostaei@guilan.ac.ir

چکیده

به منظور بررسی اثر وجود زرده تخم مرغ و افزودن مایع منی به اسپرم پوشش‌دارشده، منی از ٤ راس قوچ نژاد تالشی به وسیله واژن مصنوعی جمع‌آوری شد. جهت پوشش‌دارکردن اسپرم، منی در لوله حاوی تریس-فروکتوز۱۵ ٪ زرده تخم مرغ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بعد از ارزیابی اولیه، تجمیع و سانتریفیوژ شدند. پس از حذف مایع‌فوقانی و رقیق‌سازی، نمونه‌ها به ۳ قسمت مساوی تقسیم و به مدت ٤٤ ساعت در ٤°C نگهداری شدند. به منظور افزودن مایع منی سه روش (R، M وN) انجام شد.در روش R، نمونه سانتریفیوژ شده و مایع‌فوقانی برداشته شد. در روش M، نمونه سانتریفیوژ شده و دوباره با مایع رویی مخلوط شد. در روش N، هیچ عملی انجام نشد و نمونه‌ها در دمای ٤°C نگهداری شدند. 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 نمونه ها در ٤°C ذخیره شدند. تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی اسپرم و سلامت غشا آکروزوم نمونه‌ها پس از ٤ ساعت بررسی شدند. کمترین میزان تحرک پیش‌رونده (۱۰/۸۳٪) و زنده‌مانی اسپرم (۵۷/۵۸٪) در روش R مشاهده شد (P<۰/۰۵). سلامت غشای پلاسمایی در روش N (٦۳/۵٪) بیشتر از روش R (۵۲٪) بود (P<۰/۰۵) و بین روش R یا N و M تفاوتی وجود نداشت. روش‌ها اثری بر سلامت غشای آکروزوم نگذاشتند. بنابراین حذف زرده تخم مرغ از اسپرم پوشش‌دارشده بعد از ذخیره‌سازی مطلوب نیست.

واژه‌های کلیدی: اسپرم پوشش‌دارشده، زرده تخم مرغ، مایع منی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

تلقیح مصنوعی روشی است که امکان استفاده بهینه از قوچ‌های برتر را فراهم می‌کند. این روش زمانی به عنوان یک ابزار مهم در خدمت برنامه‌های اصلاح ژنتیکی قرار می‌گیرد که امکان ذخیره‌سازی منی وجود داشته باشد. حساسیت بالای اسپرم قوچ به استرس‌های اعمال شده در زمان عمل‌آوری و ذخیره‌سازی منی از جمله رقیق‌سازی، سرد کردن، انجماد و یخ‌گشایی سبب شده است که تلقیح مصنوعی در گوسفند در مقایسه با گاو توسعه کمتری داشته باشد (سینگر ۲۰۰۳). به دلیل چین‌های متعدد و طول بلند گردن رحم در میش (کابی و همکاران ۲۰۰۶) و همچنین افت کیفیت منی قوچ بعد از انجماد و یخ گشایی (سالامون و مکسول ۲۰۰۰) امکان استفاده از منی منجمد از طریق تلقیح در مهبل و گردن رحم وجود ندارد و تنها تلقیح در شاخ رحم به کمک روش لاپاروسکوپی منتج به باروری قابل قبول می‌شود (آنل و همکاران ۲۰۰۵). تلقیح در شاخ رحم میش به وسیله روش لاپاروسکوپی به دلیل هزینه زیاد با محدودیت همراه است (آنل و همکاران ۲۰۰۵). بعلاوه، کمبود متخصص و تجهیزات در صنعت پرورش گوسفند در ایران کاربرد روش تلقیح منی در شاخ رحم گوسفند را غیر ممکن کرده است. لذا در وضعیت حاضر، تلاش جهت افزایش مدت ذخیره‌سازی منی قوچ به صورت مایع در ٤°C و تلقیح آن از طریق دهانه گردن رحم بیش از پیش واجد اهمیت است.

مشخص شده که اجزا مایع منی با اتصال به غشا اسپرم پس از انزال باعث خروج فسفولیپیدها و کلسترول از غشا پلاسمایی اسپرم شده و موجب ناپایداری آن و کاهش زنده‌مانی اسپرم در طی مدت نگهداری می‌شود (منجونات و همکاران ۲۰۰۲). لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین و سایر اجزا موجود در زرده تخم قادرند با پروتئین‌های مایع منی ترکیب شده و کمپلکس‌هایی را تشکیل دهند (برگرون و همکاران ۲۰۰۶). به منظور کاهش مجاورت اسپرم با مایع منی، پوشش‌دارکردن اسپرم با زرده تخم مرغ یعنی جمع‌آوری منی در داخل لوله‌های حاوی بافر و زرده تخم مرغ و نهایتا حذف مایع منی توصیه شده است (دپائو و همکاران ۲۰۰۳). از طرفی بعد از شوک سرمایی افزودن پروتئین‌های مایع منی به اسپرم قوچ در فقدان حضور زرده تخم مرغ سبب بروز آثار ترمیمی شده است (باریوس و همکاران ۲۰۰۰). تاکنون مطالعه‌ای در خصوص بررسی اثر حذف زرده تخم مرغ و افزودن زرده تخم مرغ بعد از ذخیره-سازی منی قوچ انجام نشده است. لذا هدف مطالعه حاضر بررسی اثر افزودن مایع منی به اسپرم پوشش‌دارشده در حضور و عدم حضور زرده تخم مرغ بعد از٤٤ ساعت ذخیره‌سازی در ٤°C بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

این آزمایش با استفاده از چهار راس قوچ نژاد تالشی با میانگین وزنی ٥٠±٥ کیلوگرم از مرداد تا شهریور ماه سال ۱۳۹۰ در واحد دامداری دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. تغذیه دام‌ها براساس جدول کمیته ملی تحقیقات (NRC, 1985) روزانه ۱۳۰۰ گرم یونجه خشک، ٥٩٠ گرم جو، ٦٢٠ گرم کاه برنج به صورت جیره مخلوط شده در دو وعده خوراک، صبح و شب، در اختیار دام‌ها قرار گرفت. در طول آزمایش نمک و آجر لیسیدنی (مکمل مواد معدنی) به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار داده شد. نمونه‌های منی به صورت دوبار در هفته، به فاصله زمانی دو روز و به کمک واژن مصنوعی و حضور میش فحل، جمع‌آوری شد. در مجموع از ١٦ انزال در ٤ نوبت برای انجام این آزمایش استفاده شد. فحلی دائمی در میش با استفاده از روش استلفولگ و همکاران (۲۰۰۸) ایجاد شد. به صورت خلاصه، به مدت ۷ روز سیدر حاوی پروژسترون در واژن میش قرار داده شد. روز برداشت سیدر، ۱ میلی‌لیتر وتاسترول[1] (استرادایول بنزونات ۲ میلی‌گرم

[1]Vetasterol

Arhive of SID

www.SID.ir

در میلی‌لیتر) به صورت عضلانی تزریق شد. سپس هر ٤٨ ساعت ۰/۲ میلی‌لیتر وتاسترول برای ادامه فحلی تزریق شد. جهت پوشش‌دارکردن اسپرم، انزال دوم در لوله حاوی تریس -فرکتوز [۳/۲۵۸ گرم تریس-(هیدروکسی متیل)- آمینومتان، ۱/۸۷۰ گرم اسید سیتریک مونوهیدرات، ۰/۹۳ گرم فروکتوز و ۰/۵ میلی-لیتر 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.

جمع‌آوری مایع منی

انزال اول هر قوچ برای جمع‌آوری مایع منی مورد استفاده قرار گرفت. انزال‌های اول بدون رقیق‌سازی و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌های منی تجمیع شده و با قدرت g×۷۰۰ به مدت ۱۰دقیقه در دمای ٤°C سانتریفیوژ شدند. مایع‌فوقانی جدا شده و دوباره با قدرت g×۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤°C سانتریفیوژ شدند. به این ترتیب مایع‌فوقانی آن که همان مایع منی کاملا شفاف و عاری از هر گونه سلول بود جدا شده و در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

رقیق‌سازی، سردکردن، ذخیره‌سازی

ارزیابی اولیه از نظر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و غلظت اسپرم در منی در آزمایشگاه بر اساس توضیحات زیر انجام شد. نمونه‌هایی که تحرک پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم کمتر از ۷۰ درصد و غلظت اسپرم زیر ۲×۱۰^{۹} سلول در هر میلی‌لیتر داشتند حذف شدند. پس از ارزیابی اولیه نمونه‌های منی تجمیع و با قدرت g×۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ مایع‌رویی حذف شد. رسوب با استفاده از رقیق کننده تریس-گلوکز [۳/٦۳٤ گرم تریس-(هیدروکسی‌متیل)- آمینو متان، ۰/۵۰٤ گرم دی-گلوکز، ۱/۹۹٦ گرم اسید سیتریک مونوهیدرات و ۲۵mg/ml از جنتامایسین در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر،pH = ۷] حاوی ۲۰ درصد زرده تخم مرغ و ۰/٦۲۵ درصد اسید کاپروئیک (Merck, Germany) تا غلظت نهایی $۱/٦\times۱۰^{۹}$ اسپرم در هر میلی‌لیتر رقیق شد. منی رقیق شده به ۳ قسمت مساوی تقسیم شد. از آنجایی که ذخیره‌سازی در شرایط بی‌هوازی سبب کاهش تنش اکسیداتیو می‌شود (پاگل و همکاران ۲۰۰٦) لذا نمونه‌ها به داخل سرنگ کشیده شدند و سر سوزن به سرنگ متصل شده و با استفاده از پلی ونیل الکل سوراخ سوزن مسدود شد. به کمک دستگاه سرد کننده (Test Chamber EG53AH, KATO, Japan) دمای نمونه‌ها به صورت تدریجی با سرعت ۰/۲۵°Cدر دقیقه تا ٤°C سرد شد و نمونه‌ها در همین دما به مدت ٤٤ ساعت نگهداری شدند. پس از پایان مدت نگهداری، یکی از روش‌های جدا سازی رقیق‌کننده از اسپرم در هر قسمت انجام شد. در روش اول نمونه در ٤°C با قدرت g×۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع‌رویی برداشته شد (R)، در روش دوم نمونه در دمای ٤°C با قدرت g×۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و دوباره با مایع‌رویی مخلوط شد (M) و در روش سوم هیچ عملی انجام نشد و نمونه‌ها در دمای ٤°C نگهداری شدند (N). نمونه‌های به دست آمده از هر روش به سه قسمت مساوی تقسیم شده و بافر تریس حاوی صفر، ۲۰ و ٤۰ درصد مایع منی به صورت ۱:۱ (حجم/حجم) به آن‌ها اضافه شد. به این ترتیب غلظت نهایی اسپرم به ۸۰۰×۱۰^{٦} سلول در هر میلی‌لیتر و غلظت 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 ٤ ساعت در دمای ٤°C نگهداری شدند. در طول انجام تیمارهای آزمایش نمونه‌ها در دمای ٤°C نگهداری شدند. سپس نمونه‌های منی از نظر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، درصد زنده‌مانی و سلامت غشا آکروزوم اسپرم مورد بررسی قرار گرفتند. تمام مراحل برای ٤ مرتبه به صورت مستقل تکرار شد.

Arnive of SID

www.SID.ir

ارزیابی اسپرم

ارزیابی تحرک نمونه‌ها، با قرار دادن ۵ میکرولیتر از منی روی لام با دما ۳۷°C و گذاردن یک لامل بر روی آن انجام شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ اختلاف فاز با بزرگنمایی ٤۰۰× 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 (بوکاک و همکاران ۲۰۰۸).

برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم از محلول هایپواسموتیک (۰/۷۳۵ گرم سیترات سدیم دی‌هیدرات و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH=۷) استفاده شد (جیندران و همکاران ۱۹۹۲). ۵µl منی با ۵۰µl از محلول هایپواسموتیک مخلوط و درون انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤°C قرار داده شد. سپس ۲۰۰ عدد اسپرم حداقل در ۵ میدان دید زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ٤۰۰× 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.

برای ارزیابی زنده‌مانی اسپرم از رنگ هوخست بیس بنزامید H33258[1](AppliChem, Germany) بر اساس روش لئو و همکاران (۱۹۹۱) استفاده شد. بطور خلاصه حجم مساوی از نمونه و محلول ۲ درصد گلوتار آلدهید در بافر فسفات (۱۳۷mM سدیم کلرید، ۲/۷ mM پتاسیم کلرید، ۱/۸ mM سدیم هیدروژن فسفات، ۱/۵mM پتاسیم هیدروژن فسفات، pH=۷) مخلوط و ثابت شد. ۲۰µl از محلول رنگ هوخست بیس بنزامید (۲۰µg/ml از H33258 در ۱۵٤ mM سدیم کلرید و ۱۵ mM تری سدیم سیترات pH=۷) به نمونه اضافه شد و بعد از ۵ دقیقه در دمای اتاق ۵ µl ازنمونه روی لام قرار داد شده و با گذاشتن لامل بر روی آن، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر WU، با بزرگ‌نمایی٤۰۰×، ۲۰۰ 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 غشای آکروزوم، با استفاده از رنگ آلکسافلور[2](Molecular Probes, USA) و بر اساس روش واریسلی و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. از هر تیمار 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 ٤۸۸ (۱۰µg/ml) روی آن‌ها ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دما ۳۷°C، در محل تاریک و مرطوب نگهداری شدند. پس از این مرحله گسترش‌ها با استفاده از بافر فسفات (PBS) شسته شده، در شرایط نور بسیار کم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر WB، با بزرگنمایی٤۰۰×، تعداد ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی شد. آکروزوم‌های با رنگ یک‌دست، شفاف و با حاشیه مشخص به عنوان پاسخ مثبت (سالم) و آکروزوم‌های با رنگ پراکنده، و با حاشیه نامشخص به عنوان پاسخ منفی (آسیب دیده) در نظر گرفته شدند.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج

به منظور تعیین اثر سه روش مورد استفاده (R، M و N)، افزودن مقادیر صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد مایع منی و اثرات متقابل آنها بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشا پلاسمایی و سلامت غشا آکروزوم اسپرم پوشش‌دارشده، از آزمون فاکتوریل (۳×۳) در قالب طرح کاملا تصادفی با ۹ تیمار و ٤ تکرار استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایشی با استفاده از رویه GLM برنامه SAS (۱۹۹٦) 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.

[1]Hoechst bisbenzimide 33258 (H33258)

[2]Alexa Fluor-488 conjugated lectin PNA from *Arachis hypogaea* (peanut)

Arhive of SID

www.SID.ir

نتایج

نتایج نشان داد اثر متقابل روش‌های مورد استفاده و مقادیر مایع منی بر هیچ یک از فراسنجه‌های مورد بررسی معنی‌دار نبود ($P>0/05$). افزودن مقادیر صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد مایع منی بر اسپرم پوشش‌دارشده قوچ تالشی هیچ یک از فراسنجه‌های مورد بررسی معنی‌دار نبود (جدول ۱، $P>0/05$).

کمترین میزان تحرک پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم در روش R مشاهده شد (جدول ۲، $P>0/05$). بین روش‌های M و N از نظرتحرک پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P>0/05$). سلامت غشای پلاسمایی در روش N بیشتر از روش R بود ($P<0/05$). سلامت غشای پلاسمایی در روش M تفاوتی با روش N و R نشان نداد ($P>0/05$). روش‌ها اثری بر سلامت غشای آکروزوم نگذاشتند ($P>0/05$).

جدول ۱- اثر مقادیر مختلف مایع منی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشا پلاسمایی، سلامت غشا آکروزوم اسپرم پوشش‌دارشده قوچ پس از نگهداری اسپرم به مدت ۴۴ ساعت

مقادیر مایع منی (٪)	تحرک پیش‌رونده(٪)	زنده‌مانی (٪)	سلامت غشا پلاسمایی (٪)	سلامت غشا آکروزوم (٪)
صفر	۲۵/۰۰	٦٨/٣٣	۵۹/٤٢	۷۲/۸۳
۱۰	۲٦/٦۷	٦۵/٤٢	۵۸/۰۰	٦۹/۵۰
۲۰	۲۰/۰۰	٦٤/۸۳	۵۹/٤٢	٦٦/۵۸
خطای معیار میانگین (SEM)	۲/۱۵	۱/٤۹	۱/۹۷	۱/۷۳

جدول ۲- اثر روش‌های افزودن مایع منی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشا پلاسمایی، سلامت غشا آکروزوم پس از نگهداری اسپرم به مدت ۴۴ ساعت

روش عمل‌آوری*	تحرک پیش‌رونده(٪)	زنده‌مانی(٪)	سلامت غشا پلاسمایی(٪)	سلامت غشا آکروزوم(٪)
R	۱۰/۸۳^{b}	۵۷/۵۸^{b}	۵۲/۰۰^{b}	٦۹/۲۵^{a}
M	۳۰/۰۰^{a}	٦۹/٤۲^{a}	٦۱/۳۳^{ab}	۷۰/۰۰^{a}
N	۳۰/۸۳^{a}	۷۱/۵۸^{a}	٦۳/۵۰^{a}	٦۹/٦۷^{a}
خطای معیار میانگین (SEM)	۲/۱۵	۱/٤۹	۱/۹۷	۱/۷۳

$^{a-b}$: حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌داراست ($P<0/05$).

*R: روش انجام سانتریفیوژ و حذف مایع منی، M: روش انجام سانتریفیوژ بدون حذف زرده تخم مرغ و N: عدم انجام سانتریفیوژ و حذف زرده

بحث

نتایج نشان داد عمل سانتریفیوژ بدون حذف زرده تخم مرغ اثری بر فراسنجه‌های مورد بررسی اسپرم قوچ نداشت. ولی انجام سانتریفیوژ و حذف زرده تخم مرغ اثر مخربی بر فراسنجه‌های مورد بررسی در اسپرم گذاشت. مشخص شده است سانتریفیوژ کردن منی رقیق شده قوچ بعد از سرد کردن و بلافاصله قبل از انجماد بدون حذف زرده تخم مرغ اثری بر ماندگاری (گیل و همکاران ۲۰۰۰) و بارروری (گیل و همکاران ۲۰۰۲) منی ندارد. سانتریفیوژ باعث تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) می‌شود و پراکسیداسیون لیپیدی غشا اسپرم را افزایش می‌دهد (تویگ و همکاران ۱۹۹۸ و اولرو و همکاران ۱۹۹۷). همچنین افزایش دفعات و سرعت زیاد سانتریفیوژ می‌تواند باعث آسیب به DNA

Arhive of SID

www.SID.ir

اسپرم شود (ادمونت و همکاران ۲۰۱۲). آسیب به DNA اسپرم سبب کاهش نرخ بره‌زایی و نقص در جنین خواهد شد (لاو و کنی ۱۹۹۸). کاروتن موجود در زرده تخم مرغ اثر مطلوبی بر فعالیت متابولیکی اسپرم دارد (اسمیت و همکاران۱۹۵٤) و سبب حفاظت از غشا اسپرم در برابر اثرات مضر رادیکال‌های آزاد و شوک سرمایی می‌شود (پوردی ۲۰۰٦ و آبواگلا و ترادا ۲۰۰٤). به نظر می‌رسد بعد از ذخیره‌سازی منی در سرما حساسیت اسپرم قوچ نسبت به استرس‌های مکانیکی ناشی از سانتریفیوژ در مقایسه با منی تازه افزایش می‌یابد (مولر و همکاران ۱۹۹۹). سرما با تغییر در چیدمان لیپیدهای غشا سبب کاهش سیالیت لیپیدهای آن می‌شود (مولر و همکاران ۲۰۰۸). شاید به همین دلیل است که در عمل‌آوری منی اسب انجام عمل سانتریفیوژ در دمای محیط و با قدرت پایین توصیه شده است (ادمونت و همکاران ۲۰۱۲ و مورل و همکاران ۲۰۰۹). حضور زرده تخم مرغ طی ذخیره‌سازی در سرما مانع از خروج کلسترول از غشا اسپرم می‌شود (برگرون و همکاران ۲۰۰٤) و از طریق جایگزینی فسفاتیدیل کولین به جای فسفولیپیدهای خارج شده از غشا موجب پایداری غشای پلاسمایی اسپرم در طی مدت زمان ذخیره‌سازی آن می‌شود (ویت و اسکافرسومی ۲۰۰۷). بنابراین احتمالا حذف زرده تخم مرغ بعد از سانتریفیوژ سبب افزایش شدت آسیب‌های اکسیداتیو و فیزیکی ناشی از سانتریفیوژ شده است.

نتایج نشان داد، افزودن مایع منی بعد از ذخیره‌سازی در°C ٤ به مدت ٤٤ ساعت در حضور زرده تخم مرغ اثری بر ماندگاری اسپرم ندارد. گزارش شده است که افزودن زرده تخم مرغ به منی قوچ، نریان و گاو در زمان کاهش دما تا °C٥ سبب بهبود زنده‌مانی اسپرم می‌شود (مویو بلانکو و همکاران ۲۰۰۸). از طرفی مشخص شده است که در هنگام افزودن مایع منی به اسپرم رقیق شده توجه به غلظت زرده تخم مرغ موجود در محیط بسیار مهم است (روستائی علی‌مهر و شرفی ۲۰۱۳). افزودن ۲۰ درصد مایع منی (اومارا و همکاران ۲۰۰۷) و وزیکول‌های مایع منی (ال-حاج قاوی و همکاران ۲۰۰۷) بعد از یخ‌گشایی در حضور زرده تخم مرغ تغییری را در باروری اسپرم قوچ ایجاد نکرد. لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین (LDL) زرده تخم مرغ به عنوان یک عامل مداخله‌گر (ویشوانت و همکاران ۱۹۹۲) با پروتئین‌های مایع منی ترکیب می‌شوند و یا مانع اتصال آن‌ها به غشای پلاسمایی اسپرم خواهند شد (برگرون و همکاران ۲۰۰٤ و ۲۰۰۵). بنابراین حضور زرده تخم مرغ به عنوان یک ماده مداخله‌گر با پروتئین‌های مایع منی، احتمالا مانع از اثر پروتئین‌های مایع منی بر اسپرم شده است. لذا حذف زرده تخم مرغ در هنگام افزودن مایع منی و یا پروتئین‌های آن ضروری به نظر می‌رسد.

نتایج نشان داد حذف زرده و افزودن مایع منی بعد از ذخیره‌سازی در °C٤ به مدت ٤٤ ساعت اثری بر ماندگاری اسپرم نداشت. گزارش شده است شوک سرمایی سبب القا فسفریلاسیون تیروزین در پروتئین‌های غشا و کاهش ماندگاری اسپرم قوچ می‌شود و همچنین افزودن مایع منی به اسپرم تازه قبل از شوک سرمایی بدون حضور زرده تخم مرغ باعث کاهش فسفریلاسیون تیروزین پروتئین‌های غشا و بهبود سلامت آن و ماندگاری اسپرم قوچ می‌شود (پرز-پی و همکاران ۲۰۰۲). افزودن پروتئین‌های مایع منی به اسپرم تازه و شسته شده قوچ (dextran/swim up) بدون حضور زرده تخم مرغ سبب اثر ترمیمی در غشای پلاسمایی (کولاس و همکاران ۲۰۰۹ و بایروس و همکاران ۲۰۰۰)، افزایش مقاومت در برابر شوک سرمایی (کولاس و همکاران ۲۰۰۹)، بهبود تحرک اسپرم (ایوانوا-کیچوا و دیموو ۲۰۱۱) می‌شود. از طرفی مشخص شده است، حذف زرده تخم مرغ و رقیق‌کننده شیر بعد از یخ‌گشایی به منظور افزودن ۲۰ درصد مایع منی سبب بروز خسارت‌های شدید در اسپرم انزالی قوچ می‌شود (اومارا و همکاران ۲۰۰۷). بنابراین به نظر می

Arhive of SID
www.SID.ir

رسد آسیب ها ناشی از حذف سرما محافظ زرده تخم مرغ در دمای ٤°C به حدی جدی است که حضور پروتئین‌ها مایع منی نتوانسته سبب بروز آثار مطلوب شوند.

نتیجه

نتایج نشان داد حضور زرده تخم مرغ برای عمل‌آوری منی در دماهای پایین الزامی است و حذف آن سبب افزایش حساسیت اسپرم به آسیب های ناشی از انجام سانتریفیوژ می‌شود. بنابراین با توجه به اثر مداخله‌ای زرده تخم مرغ با پروتئین‌های مایع منی و افزایش حساسیت اسپرم قوچ به استرس‌های مکانیکی ناشی از عمل سانتریفیوژ طی ذخیره‌سازی در سرما، احتمالا بهره‌گیری از مایع منی و یا پروتئین‌های آن جهت بهبود عملکرد اسپرم قوچ در رقیق کننده‌های مرسوم که حاوی زرده تخم مرغ هستند ممکن نیست.

منابع مورد استفاده

Aboagla EM 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 JC, de la Fuente LF and dePaz 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 revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. Biology of Reproduction 63: 1531-1537.

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

Bergeron A, Creˆte 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.

Bergeron A, Villemure M, Lazure C and Manjunath P, 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. Molecular Reproduction and Development 71: 461-470.

Bucak MN, 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.

Colás C, Junquera C, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA and Muiño-Blanco T, 2009. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. Molecular Reproduction and Development 72(8):566-72.

De Leeuw AM, Den Daas GHE 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 IMC, Van Soom DM, Verberckmoes S and de Kruif A, 2003. Effect of sperm coating on survival and penetrating ability of in vitro stored bovine spermatozoa. Theriogenology 59: 1109-1122.

Edmond AJ, Brinsko SP, Love CC, Blanchard TL, Teague SR and Varner DD, 2012. Effect of centrifugal fractionation protocols on quality and recovery rate of equine sperm. Theriogenology 77: 959–966.

El-Hajj Ghaoui R, Thomson PC, Leahy T, Evans G and Maxwell WMC, 2007. Autologous whole ram seminal plasma and its vesicle-free fraction improve motility characteristics and membrane status but not in vivo fertility of frozen–thawed ram spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals 42: 541–549.

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.

Ivanova-Kicheva M and Dimov G, 2011. Influence of selected seminal plasma proteins on mitochondrial integrity and speed parameters of ram sperm stored at low temperature. Biotechnology & Biotechnological Equipment 25: 2591-2596.

Archive of SID

www.SID.ir

Jeyendran RS, Vanderven HH and Zaneveld LJ 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. Archives of Andrology 29: 105-116.

Kaabi M, Alvarez M, Anel E, Chamorro CA, Boixo JC, de Paz P and 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.

Love CC and Kenney RM, 1998. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. Theriogenology 52: 955–72.

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.

Morrell JM, Dalin AM and Rodriguez-Martinez H, 2009. Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: Yield, motility and survival. Equine Veterinary Journal 41: 53–8.

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

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

Müller K, Pomorski T, Müller P and Andreas H, 1999. Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. Journal of Cell Science 112: 11-20.

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

O'Meara CM, Donovan A, Hanrahan JP, Duffy P, Fair S, Evans A C O and Lonergan P, 2007. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. Theriogenology 67: 1262–1268.

Ollero M, Cebrian-Perez JA and Muiño-Blanco T. 1997. Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. Journal of Andrology 18: 732-9.

Pagl R, Aurich JE, 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.

Pérez-Pé R, Grasa P, Fernandez-Juan M, Peleato ML, Cebrián-Pérez JA and Muiño- Blanco T, 2002. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. Molecular Reproduction and Development 61: 226-233.

Purdy PH, 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research 63: 215-225.

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

Salamon S and Maxwell W, 2000.Storage of ram semen. Animal Reproduction Science, 62: 77-112.

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

Senger PL, 2003. Pathways of pregnancy and parturition.2nd ed. Cadmus Professional Communication.365 pages.

Smith JT, Mayer DT and Herman HA, 1954. A comparison of the ability of certain egg yolk diluents to maintain optimum osmotic conations during the storage of bull semen. Journal of Dairy Science 37: 684-690.

Stellflug JN, Cockett NE and Lewis GS, 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.

Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L and Aitken RJ, 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 comparision 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.

Vishwanath R, Shannon P and Curson B, 1992. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. Animal Reproduction Science 29: 185-194.

Archive of SID

www.SID.ir

Witte TS 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: 181-19.

Arhive of SID

www.SID.ir

Effect of adding seminal plasma on coated sperm of Taleshi ram in the presence of egg yolk and without it

AR Vaferi[1] and M Roostaei Ali-Mehr[2]

Received: December 22, 2012 Accepted: June 9, 2013
[1]MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[2]Assistant professor Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[*]Corresponding author: E mail: roostaei@guilan.ac.ir

Abstract
In order to study the effect of the presence of egg yolk and adding seminal plasma to coated sperm, the semen were collected from 4 Taleshi rams by using artificial vagina. To coat the sperm, semen was collected within the tube containing Tris-fructose-15% egg yolk. After the initial evaluation, the samples are mixed and centrifuged. After removing supernatant and diluting, samples were divided into 3 equal parts; they were cooled to 4°C and incubated for 44 hours. Three methods (R, M and N) were performed to add seminal plasma. In R method, sample was centrifuged and supernatant were removed. In M method, sample was centrifuged and mixed with the supernatant. In N method, nothing was done and sample was kept at 4°C. Sample, which obtained from each method, was split into three equal parts after that the amount of zero, 10 and 20% seminal plasma were added and aliquots incubated at 4°C. Sperm motility, functional membrane integrity, viability and acrosome integrity were estimated after 4 hours. The lowest of sperm motility (10.83%) and viability (57.58%) were observed by R method ($P<0.05$). The functional membrane integrity was higher in N method (61.33%) than R method (52%; $P<0.05$) and there was no difference between R method or N method and M method. The methods did not effect on the acrosome integrity. Therefore, removing egg yolk was not useful for coated ram spermatozoa after storage at 4°C.

Keywords: Egg yolk- Coated sperm- Seminal plasma

Archive of SID

www.SID.ir