Iranian Journal of Animal Science
Vol 47, No 4, Winter 2017 (481-487)
DOI: 10.22059/ijas.2017.138918.653396

علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۷، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۵ (ص ۴۸۷-۴۸۱)

تأثیر روش‌های مختلف سانتریفوژ بر کیفیت اسپرم اسب خزر پیش و پس از سرد کردن

هوشنگ نوری[۱]، آرمین توحیدی[۲*]، مجید بحرینی[۳] و طوبی ندری[٤]

۱، ۲ و ٤. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۳. دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۹/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۰)

چکیده

این تحقیق با هدف تعیین تأثیر روش‌های مختلف سانتریفوژ (دور و زمان سانتریفوژ) بر ویژگی‌های اسپرم اسب خزر انجام شد. در این پژوهش نمونه‌های منی از چهار سر اسب خزر بالغ و سالم با استفاده از واژن مصنوعی گردآوری و پس از آن در رقیق‌کننده بر پایهٔ فسفوکازئینات شیر رقیق شد. سپس نمونه‌های منی به هفت قسمت یکسان تقسیم و به هر یک از تیمارهای آزمایشی که شامل تیمار بدون سانتریفوژ (شاهد) و تیمارهای سانتریفوژشده (۵۰۰× g، ۱۰۰۰ × g و ۲۰۰۰ × g هرکدام با دو زمان ٤ و ۷ دقیقه سانتریفوژ) اختصاص یافت. ارزیابی کیفی منی پس از سانتریفوژ در زمان‌های ۰، ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از سردسازی انجام شد. در این پژوهش ویژگی‌های جنبایی اسپرم، زنده‌مانی و سلامت غشاء اسپرم ارزیابی شد. نتایج نشان داد در تیمارهای گروه ۲۰۰۰ × g جنبایی، زنده‌مانی و سلامت غشاء اسپرم کاهش یافت ($P \leq 0.05$). کیفیت اسپرم ذخیره‌شده در تیمارهای ۵۰۰ × g و ۱۰۰۰ × g در مقایسه با شاهد بهتر بود ($P \leq 0.05$). همچنین گروه‌های ۵۰۰ × g و ۱۰۰۰ × g درصد بازیافت پایین‌تری در مقایسه با گروه ۲۰۰۰ × g نشان دادند ($P \leq 0.05$). درمجموع در فرآیند سرد کردن بهترین کیفیت اسپرم از لحاظ ویژگی‌های کیفی اسپرم و درصد بازیافت (۷۵/۸۹٪) متعلق به تیمار ۱۰۰۰× g در مدت‌زمان هفت دقیقه بود.

واژه‌های کلیدی: ارزیابی کیفی، جنبانی، زنده‌مانی، سلامت، اسپرم.

Effects of different centrifugation protocols on pre and post-cooling sperm quality in Caspian horses

Houshang Nouri[1], Armin Towhidi[2*], Majid Bahreini[3] and Touba Nadri[4]

1, 2, 4. Former M.Sc. Student, Associate Professor and Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Veterinary Expert, Animal Breeding Center of Iran, Karaj, Iran

(Received: Dec. 20, 2015 - Accepted: Feb. 28, 2017)

ABSTRACT

This study aimed to determine the effects of different centrifuging protocols (different rotation and time) on Caspian horse sperm characteristics. In this study, semen samples from four healthy adult Caspian pony stalian were collected using an artificial vagina and then diluted in milk phosphocaseinat based extender. Then semen samples were divided into seven equal parts, which part assigned to treatments including centrifugation treatments (500×g, 1000×g and 2000×g each for 4 and 7 minutes) and without centrifuge (control). Cooling of treatments were done at 0, 24 and 48 hours after centrifugation. Sperm motion characteristics, viability and percentages of healthy sperm were assessed. The results showed that motility, viability and percentages of healthy sperm reduced in 2000×g treatments ($p<0.05$). Stored sperm in 500×g and 1000×g treatments had better quality compared to control group ($p<0.05$). In addition, compared to 2000×g treatment, in 500×g and 1000×g treatments a less recovery rate was observed ($p<0.05$). In conclusion, Caspian horse's semen in treatment with centrifuging for 7 minutes at 1000 g, showed better result.

Keywords: Healthy, matility, quality evaluation, sperm, viability.

* Corresponding author E-mail: atowhidi@ut.ac.ir Tel: +98 912 1404081

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

استفاده از روش‌های تولیدمثلی از جمله تلقیح مصنوعی و رویه‌های وابسته به آن شامل توسعهٔ رقیق‌کننده‌ها، سرد کردن و انجماد اسپرم برای افزونش و اصلاح نژاد اسب خزر ضروری است. استفاده از اسپرم سردشده و منجمد و نیز تلقیح مصنوعی امروزه جایگاه مناسبی در صنعت اسب دارد. مرسوم‌ترین روش تلقیح مصنوعی در اسب، استفاده از منی سردشده به علت درصد آبستنی بالای آن نسبت به اسپرم منجمد- ذوب شده است (Jasko *et al*., 1992). در فرآیند سرد کردن یا انجماد اسپرم اسب اگر میزان پلاسمای منی زیاد باشد، ویژگی‌های جنبایی اسپرم به‌شدت کاهش می‌یابد. درصورتی‌که میزان‌های کمتر پلاسمای منی تأثیر سودمندی بر تحرکت اسپرم‌ها داشته است (Jasko *et al*., 1991; Brinsko *et al*., 2000). از این‌رو کاهش میزان پلاسمای منی در فرآوری منی اسب برای بقاء و ماندگاری اسپرم، چه به‌صورت سرد شده یا منجمد ضروری است (Ritar *et al*., 1982). تأثیر زیانبار پلاسمای منی (از جمله رادیکال‌های آزاد اکسیژن) را می‌توان با رقیق کردن منی اسب با نسبت‌های بالای ۱:۴ یا ۱:۶ (رقیق‌کننده: اسپرم) کاهش داد (Varner *et al*., 1987). اما به دلیل اینکه تلقیح مصنوعی مادیان با حجم بالای منی رقیق‌شده که اسپرم‌های کمتری در هر میلی‌لیتر دارد. باعث کاهش درصد آبستنی مادیان می‌شود، از سانتریفوژ برای این منظور استفاده می‌شود.

بررسی‌ها نشان داده‌اند که سانتریفوژ منی اسب تأثیر مثبتی در حذف پلاسمای منی و ذخیره‌سازی اسپرم به‌صورت سردشده داشته است (Brinsko *et al*., 2000). اما اثرگذاری سانتریفوژ بر اسپرم اسب به‌صورت کامل ارزیابی نشده است. تأثیر سانتریفوژ بر اسپرم، حذف پلاسمای منی و رقیق‌سازی دوبارهٔ منی تحت تأثیر عامل‌های زیادی است. این عامل‌ها شامل: زمان سانتریفوژ، دور سانتریفوژ، رقیق‌سازی، میزان رقیق‌کنندهٔ منی و میزان باقی‌ماندهٔ پلاسمای منی است (Brinsko *et al*., 2000). دورهای سانتریفیوژی که در فرآوری منی اسب استفاده می‌شود، به‌طورمعمول ۶۵۰×g-۴۰۰ است که سبب از دست رفتن میزان شایان‌توجهی اسپرم در مایع رویی در لولهٔ تحت سانتریفوژ است (Cochran *et al*., 1984). از این‌رو هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی تأثیر دورهای سانتریفوژ و مدت‌زمان سانتریفوژ بر ویژگی‌های تحرک کل، زنده‌مانی و سلامت اسپرم اسب خزر بی‌درنگ پس از سانتریفوژ و همچنین پس از سرد کردن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت است.

مواد و روش‌ها

مکان آزمایش و حیوان‌های آزمایشی

در این پژوهش از چهار سر اسب خزر بالغ و سالم (با میانگین سنی ۱۰ سال) در مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور واقع در کرج استفاده شد. حیوان‌ها در مدت دورهٔ آزمایشی با جیرهٔ غذایی یکسان (از نظر میزان و کیفیت) تغذیه شدند.

گردآوری منی

پیش از اسپرم‌گیری قضیب اسب‌ها با استفاده از آب ۳۸ تا ۴۱ درجهٔ سلسیوس و پارچهٔ سفید تمیز و نرم شستشو شد. پس از گردآوری منی، نمونهٔ اخذشده به آزمایشگاه انتقال داده شد. بی‌درنگ منی تازه در دمای اتاق (۲۲°C) با رقیق‌کننده بر پایهٔ فسفوکازیینات شیر به نسبت ۱:۱ رقیق شد. به‌طوری‌که غلظت نهایی اسپرم در آن به ۵۰×۱۰^{۶} اسپرم در میلی‌لیتر برسد (Varner *et al*., 1987). منی به هفت قسمت یکسان تقسیم و در لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. هر لوله به یکی از هفت تیمار زیر اختصاص داده شد که شامل: ۱- تیمار بدون سانتریفوژ (شاهد) ۲- تیمار ۵۰۰×g در ۴دقیقه ۳- تیمار ۵۰۰×g در ۷دقیقه ۴- تیمار ۱۰۰۰×g در ۴ دقیقه ۵- تیمار ۱۰۰۰×g در ۷ دقیقه ۶- تیمار ۲۰۰۰×g در ۴ دقیقه ۷- تیمار ۲۰۰۰×gدر ۷ دقیقه بود. محلول بالایی لوله‌ها تیمارهای سانتریفوژشده، پس از سانتریفوژ با استفاده از پیپت خارج شد. سپس تیمارهای سانتریفوژشده و شاهد در سردخانه قرار داده شد (Kareskoski *et al*., 2006). برای انجام آزمون‌های تحرک کل، تحرک پیش‌رونده و تورم هایپواسموتیک[1] و تعیین درصد اسپرم‌های زنده و مرده در زمان ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت

1. HOST

Archive of SID

www.SID.ir

پس از سردسازی دو نمونهٔ ۲۵ میکرولیتری از هر تیمار جدا شد.

ارزیابی ویژگی‌های اسپرم

برای تعیین غلظت اسپرم از لام هموسایتومتر استفاده شد. ویژگی‌های تحرک کل و تحرک پیش‌روندهٔ هر یک از تیمارها، به کمک سامانهٔ رایانه‌ای ارزیابی اسپرم CASA version 12 (IVOS; Hamilton-Thorne (Biosciences, Beverly, MA)) انجام شد. فراسنجه‌های سامانهٔ CASA شامل ۳۰ فریم به‌دست‌آمده از شصت فریم در ثانیه؛ کمینهٔ کنتراست، ۳۰؛ کمینهٔ اندازهٔ یاخته، ۵ پیکسل؛ میانگین سرعت در مسیر (VAP)[1]، ۸۰ µm/s؛ VAP یاخته‌های پیش‌رونده، ۷۰µm/s؛ راستی مسیر طی‌شده (STR)[2]، ۸۰٪ و سرعت در مسیر مستقیم (VSL)[3]، ۰ µm/s بود.

زنده‌مانی

زنده‌مانی اسپرم اسب خزر به روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین ارزیابی شد. برای ارزیابی تیمارها، ۱۰µl از هر تیمار به‌وسیلهٔ نمونه‌بردار (سمپلر) روی یک لام گرم و تمیز قرار داده شد. سپس ۱۰µl از رنگ ائوزین- نیگروزین روی اسپرم ریخته شد و با هم مخلوط شدند. سپس گسترشی از مخلوط آن‌ها روی لام تهیه شد. از هر تیمار دویست اسپرم به‌وسیلهٔ میکروسکوپ با بزرگنمایی × ۱۰۰۰ شمارش شد. درصد اسپرم‌های رنگی شده (مرده) و رنگی نشده (زنده) محاسبه شد.

سلامت اسپرم

سلامت اسپرم با استفاده از آزمون تورم هایپواسموتیک سر اسپرم تعیین شد. آزمون تورم هایپواسموتیک بر پایهٔ اسمولاریتهٔ محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. اسمولاریتهٔ محیط‌هاست ۱۰۰ میلی‌اسمولار و اسمولاریتهٔ مورد نیاز برای اسپرم اسب ۳۲۰-۳۱۰ میلی‌اسمولار است. اسپرم با قرار گرفتن در محیط با اسمولاریتهٔ پایین به سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن گره می‌خورد. تنها اسپرم‌های زنده و دارای غشای سالم به این نوع محیط واکنش می‌دهند و اسپرم‌های مرده در این محیط هیچ واکنشی از خود نشان نمی‌دهند. در این پژوهش ۵۰۰µl محلول هایپواسموتیک با ۵۰µl نمونهٔ اسپرم از هر تیمار بی‌درنگ پس از سانتریفوژ و نیز پس از سرد شدن مخلوط شد و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس نگهداری (انکوبه) شد. سپس ۵µl از نمونهٔ نگهداری‌شده روی لام قرار داده شد و با قرار دادن لامل روی لام گسترده شد. بررسی میکروسکوپی با بزرگنمایی×۴۰ صورت گرفت. از هر تیمار، دویست اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های با دم گره‌خورده (اسپرم سالم) و اسپرم با دم گره نخورده محاسبه شد.

تعیین درصد بازیافت اسپرم پس از سانتریفوژ

برای تعیین درصد بازیافت، غلظت اسپرم در دو زمان پیش از سانتریفوژ و پس از سانتریفوژ محاسبه شد. سپس با استفاده از رابطهٔ زیر درصد بازیافت محاسبه شد.

درصد بازیافت =
(شمار اسپرم اولیه) / ۱۰۰ × (شمار اسپرم مایع رویی − شمار اسپرم اولیه)

مدل آماری طرح

داده‌های به‌دست‌آمده از هرکدام از تیمارها در پنج تکرار در قالب طرح کامل تصادفی و بر پایهٔ معادله مدل آماری زیر با استفاده از رویهٔ Proc GLM نرم‌افزار SAS تجزیه‌وتحلیل شدند.

$$y = \mu + \propto i + eij$$

Y: ویژگی‌های کمی و کیفی اسپرم، µ: میانگین جامعه، αi: اثر تیمار، eij: اثر عامل‌های باقی‌مانده.

مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSMeans انجام شد و اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

1. Average path velocity
2. Sperm track straightness
3. Straight line velocity

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

تأثیر زمان‌های مختلف سردسازی بر ویژگی‌های اسپرم اسب خزر

مقایسهٔ میانگین تأثیر زمان‌های مختلف سردسازی بر ویژگی‌های اسپرم اسب خزر در زمان‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ در جدول ۱ آمده است. بیشترین میانگین تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و تورم هایپواسموتیک مربوط به زمان ۰ است و با افزایش مدت‌زمان سردسازی کاهش یافته است (جدول ۱).

تحرک کل اسپرم پس از سرد شدن در دمای ۵ درجهٔ سلسیوس

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، تحرک کل اسپرم اسب خزر در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت سرد کردن در دمای ۵ درجهٔ سلسیوس در تیمارهای ۵۰۰×g در ۴ دقیقه، ۵۰۰×g در ۷ دقیقه، ۱۰۰۰×g در ۴ دقیقه، ۱۰۰۰×g در ۷ دقیقه، و ۲۰۰۰× g در ۴ دقیقه اختلاف معنی‌داری نداشت (P≤۰/۰۵)، اما این تیمارها با گروه شاهد و همچنین تیمار ۲۰۰۰×g در ۷ دقیقه اختلاف معنی‌داری نشان دادند (P≤۰/۰۵).

تحرک پیش‌روندهٔ اسپرم پس از سرد کردن در دمای ۵ درجهٔ سلسیوس

در مدت ۲۴ ساعت سرد کردن از نظر تحرک پیش‌رونده اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۵۰۰×g در ۴ دقیقه، ۵۰۰×g در ۷ دقیقه)، ۱۰۰۰×g در ۴ دقیقه، ۱۰۰۰×g در ۷ دقیقه، مشاهده نشد. اما این تیمارها اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد و همچنین تیمارهای ۲۰۰۰×g در ۴ دقیقه و ۲۰۰۰×g در ۷ دقیقه نشان دادند (P≤۰/۰۵) (جدول ۳).

جدول ۱. تأثیر (میانگین حداقل مربعات ± خطای معیار) زمان‌های مختلف سردسازی بر ویژگی‌های اسپرم اسب خزر

Table 1. Effect of (Lsmeans ± SEM) different times of cooling on characteristics of Caspian stallion's sperm

Time of cooling (Hour)	Total mobility (%)	Progressive motility (%)	Viability (%)	Hypo-osmotic swelling test (%)
0	85.31 [a]	55.40 [a]	69.71 [a]	72.22 [a]
24	76.31 [b]	47.25 [b]	63.45 [b]	65.60 [b]
48	74.22 [c]	41.37 [c]	57.22 [c]	56.31 [c]

abc: میانگین‌هایی که حرف‌های مشترک انگلیسی ندارند، اختلاف معنی‌دار دارند (P≤۰/۰۵).

abc: Means that do not have common letter are statistically significant (P ≤ 0.05).

جدول ۲. مقایسهٔ (میانگین ± خطای معیار) تحرک کل اسپرم اسب خزر در تیمارهای مختلف سانتریفوژ و سرد کردن

Table 2. Comparing (mean ± SEM) Caspian stallion's total sperm motility indifferent treatment of centrifuging and cooling

Treat (Minute × Rotation rate)	Hour 0	Hours 24	Hours 48
500×4	87.8 ± 3.42 [a]	84 ± 2 [a]	81.6 ±2.07 [a]
500×7	87.4 ± 1.34 [a]	83.2 ±3.70 [a]	80.2 ±3.96 [a]
1000×4	89 ± 1.87 [a]	83.6 ±2.07 [a]	79.6 ±2.07 [a]
1000×7	88 ± 0.70 [a]	86.2 ±0.83 [a]	80.2 ±1.30 [a]
2000×4	88.2 ± 2.04 [a]	86.2 ±1.09 [a]	81.4 ±.1.96 [a]
2000×7	69.6± 6.54 [b]	61.6±6.87 [b]	55.6 ±5.41 [b]
Without centrifugation	87.2 ± 2.28 [a]	70.4 ± 44.15 [b]	61±2.64 [b]

abc: میانگین‌هایی که حرف‌های مشترک انگلیسی ندارند، اختلاف معنی‌دار دارند (P≤۰/۰۵).

abc: Means that do not have common letter are statistically significant (P ≤ 0.05).

جدول۳. مقایسهٔ (میانگین ± خطای معیار) تحرک پیش‌روندهٔ اسپرم اسب خزر پس از سانتریفوژ و سرد کردن

Table 3. Comparing (mean ± SEM) Caspian stallion's sperm progressive motility after centrifugation and cooling

Treat (Minute × Rotation rate)	0 Hour	24 Hours	Hours
4×500	56.8± 4.32 [a]	49.6±3.84 [a]	44.8 ±3.42 [bc]
7×500	57.4± 3.91 [a]	53.2±4.81 [a]	47.6 ±5.07 [ab]
4×1000	56 ± 3.93 [a]	49.2±3.34 [a]	44.4 ±4.56 [bc]
7×1000	57.2± 3.27 [a]	52.4±3.50 [a]	51 ± 4.58 [bc]
4×2000	52.8 ±3.81 [a]	43.4±3.50 [b]	39.8±3.56 [c]
7×2000	51.8± 4.81 [a]	41±2.54 [b]	30.6±1.94 [d]
Without centrifugation	55.8±3.76 [a]	42±2.54 [b]	34.4 ± 3.43 [d]

abc: میانگین‌هایی که حرف‌های مشترک انگلیسی ندارند، اختلاف معنی‌دار دارند (P≤۰/۰۵).

abc: Means that do not have common letter are statistically significant (P ≤ 0.05).

Archive of SID

www.SID.ir

زنده‌مانی اسپرم اسب خزر پس از سانتریفوژ و پس از سرد کردن در دمای ۵ درجهٔ سلسیوس

همان‌طور که در جدول ۴ نشان داده شده است، زنده‌مانی اسپرم اسب خزر پس از سرد کردن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در تیمارهای ۵۰۰×g در ۴ دقیقه، ۵۰۰×g در ۷ دقیقه، ۱۰۰۰×g در ۴ دقیقه، ۱۰۰۰×g در ۷ دقیقه، و ۲۰۰۰×g در ۴ دقیقه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. پس از سرد کردن به مدت ۲۴ و ۴۸ساعت، زنده‌مانی تیمار ۲۰۰۰×g در ۷ دقیقه کاهش معنی‌داری در مقایسه با تیمار ۲۰۰۰×g در ۴ دقیقه نشان داد. همچنین پس از ۲۴ ساعت سرد کردن، زنده‌مانی اسپرم در تیمار ۲۰۰۰×g در ۷ دقیقه نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد.

سلامت غشاء اسپرم

جدول ۵ نتایج آزمون تورم هایپواسموتیک را نشان می‌دهد. تیمار ۱۰۰۰×g در ۷ دقیقه بالاترین درصد سلامت غشاء اسپرم پس از سانتریفوژ را به خود اختصاص داده است. اگرچه با تیمار شاهد (بدون سانتریفوژ) اختلاف معنی‌داری نشان نداد. همچنین بیشترین درصد سلامت غشاء اسپرم پس از ۲۴ ساعت سرد کردن مربوط به تیمار ۵۰۰×g در ۴ دقیقه است. که با اختلاف معنی‌داری از تیمار شاهد بالاتر است. پس از ۴۸ ساعت سرد کردن، تیمار ۱۰۰۰×g در ۷ دقیقه بیشترین درصد سلامت اسپرم را به خود اختصاص داد.

درصد بازیافت اسپرم پس از سانتریفوژ

همان‌طور که در جدول ۶ نشان داده شده است، درصد بازیافت اسپرم تحت تأثیر سانتریفوژ قرار گرفت. درصد بازیافت اسپرم در تیمارهای سانتریفوژشده در مقایسه با تیمار شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد.

جدول۴. مقایسهٔ (میانگین ± خطای معیار) زنده‌مانی اسپرم اسب خزر پس از سانتریفوژ و پس از سرد کردن

Table 4. Comparing (mean ± SEM) Caspian stallion's sperm viability after centrifugation and cooling

Treat (Minute × Rotation rate)	0Hour	Hours 24	Hours 48
4×500	74±3.74 [a]	67.6±4.82 [a]	65±6.40 [a]
7×500	74±4 [a]	67.4±5.45 [a]	63.2±35.63 [a]
4×1000	72.4± 7.82 [a]	66±10.36 [a]	61.2±12.27 [a]
7×1000	72.8±2.68 [a]	68.4±2.96 [a]	63.6±4.77 [a]
4×2000	72±4.06 [a]	66.8±6.41 [a]	58.6±7.36 [a]
7×2000	51.8±6.72 [b]	44.8±7.25 [b]	37.6±8.32 [b]
Without centrifugatio	71±2.44 [a]	63.2±1.30 [a]	51.4±1.15 [b]

abc: میانگین‌هایی که حرف‌های مشترک انگلیسی ندارند، اختلاف معنی‌دار دارند (P≤۰/۰۵).

abc: Means that do not have common letter are statistically significant ($P \leq 0.05$).

جدول۵. مقایسهٔ (میانگین ± خطای معیار) سلامت غشای اسپرم اسب خزر پس از سانتریفوژ و سرد کردن

Table 5. The comparing (mean ± SEM) Caspian stallion's sperm membrane integrity after centrifugation and cooling

Treat (Minute × Rotation rate)	Hour 0	24 Hours	48Hours
500×4	75.4±4.03 [ab]	70.4±5.59 [ab]	64±4.41 [ab]
500×7	77±3.93 [a]	73.2 ±4.56 [a]	66±5.14[a]
1000×4	74.2± 4.14 [ab]	69.4±2.88 [ab]	64±3.74 [ab]
1000×7	76.4±3.50 [ab]	72.2±4.43 [a]	67.2±1.92 [a]
2000×4	71.2±3.96 [b]	65.2±3.03 [b]	58.8± 1.64 [b]
2000×7	57.6±2.07 [c]	49.2±4.26 [c]	32.4±6.61 [c]
Without centrifugatio	72.8± 4.65 [ab]	59.6±12.21 [c]	41.8±8.01 [bc]

abc: میانگین‌هایی که حرف‌های مشترک انگلیسی ندارند، اختلاف معنی‌دار دارند (P≤۰/۰۵).

abc: Means that do not have common letter are statistically significant ($P \leq 0.05$).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۶. درصد بازیافت اسپرم اسب خزر پس از سانتریفوژ

Table 6. The Percentage of Caspian stallion's sperm recovered after centrifugation

Treat (Minute × Rotation rate)	Percent of recovery
Control	100[a]
4 × 500	44.49±3.66[f]
7 × 500	55.06±2.38[e]
4×1000	2.98± 62.4[d]
7 × 1000	75.89±2.14[c]
4 × 2000	78.48±1.56[c]
7 × 2000	89.53±4.31[b]

abc: میانگین‌هایی که حرف‌های مشترک انگلیسی ندارند، اختلاف معنی‌دار دارند (P≤۰/۰۵).

abc: Means that do not have common letter are statistically significant (P ≤ 0.05).

بحث

برخی از بررسی‌ها تأثیر منفی سانتریفوژ (آسیب به غشای اسپرم) بر تحرک اسپرم اسب را گزارش کرده‌اند (Cochran *et al*., 1984; Jasko *et al*., 1991) برخی دیگر تأثیر منفی از سانتریفوژ بر تحرکت و زنده‌مانی اسپرم گزارش نکرده‌اند (Ferre *et al*., 2004; Jasko *et al* 1992). در این پژوهش تحرک کل اسپرم اسب خزر پس از سرد کردن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۵ درجهٔ سلسیوس در تیمارهای ۱ تا ۵ اختلاف معنی‌داری نشان نداد، اما با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند (P≤۰/۰۵). همچنین تحرک پیش‌رونده تحت تأثیر سرد کردن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفت و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت سرد کردن، تیمار g×۱۰۰۰ دور در ۷ دقیقه بیشترین تحرک پیش‌رونده را به خود اختصاص داد. در پژوهشی منی رقیق‌شده را با دور g×۹۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کردند و کاهشی در تحرک اسپرم پس از سانتریفوژ گزارش نکردند (Ferre *et al*., 2004). بخشی از کاهش در تحرک اسپرم به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (reactive oxygen spicies: ROS) در پلاسمای منی برمی‌گردد (Parinaud *et al*., 1997). با افزایش زمان سرد کردن از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت، تحرک پیشروندهٔ اسپرم در همهٔ تیمارهای آزمایشی کاهش یافته است. با گذشت زمان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در پلاسمای منی افزایش می‌یابد. افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در پلاسمای منی سبب اکسایش (اکسیداسیون) اسیدهای چرب غشاء اسپرم شده و روانی غشاء کاهش می‌یابد. به دنبال کاهش روانی غشاء، تحرک اسپرم کاهش می‌یابد و می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب‌های پلاسمای منی (از جمله ROS) که تأثیر زیانباری بر تحرک اسپرم ذخیره‌شده دارند پس از سانتریفوژ به همراه پلاسمای منی حذف می‌شوند. از سوی دیگر تیمار چهار (۱۰۰۰ در ۷ دقیقه) بهترین وضعیت جنبایی را داشت. این نتایج نشان می‌دهد که سانتریفوژ تأثیر زیانبار چندانی بر ساختار اسپرم نداشته است. نقص در سلامت اسپرم نفوذ اسپرم به اووسیت را مختل می‌کند (Aitken, 1995). سانتریفوژ می‌تواند به غشاء پلاسمایی اسپرم اسب آسیب برساند (Aurich *et al*., 2005). سانتریفوژ با دور ۶۰۰ به مدت ده دقیقه و یا دور ۹۰۰ به مدت ده دقیقه (Pagl *et al*., 2006) سبب آسیب به زنده‌مانی و سلامت اسپرم شده است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد سانتریفوژ با دورهای بالاتر از ۵۰۰ (به‌جز تیمار g×۲۰۰۰ در ۷ دقیقه)، حذف پلاسمای منی و به دنبال آن رقیق کردن اسپرم با رقیق‌کنندهٔ تازه سبب آسیب به غشاء اسپرم اسب خزر پس از سانتریفوژ و نیز پس از سرد کردن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت نشده است. در این پژوهش درصد بازیافت اسپرم اسب خزر با افزایش نیروهای سانتریفوژ افزایش یافته است. درصد بازیافت اسپرم اسب خزر در تیمار g×۵۰۰ در زمان‌های ۴ و ۷ دقیقه به ترتیب ۴۴/۴۹ و ۵۵/۰۶ درصد کل یاخته‌های اسپرم پیش از سانتریفوژ بود. این میزان بازیافت در مقایسه با بررسی‌های دیگر با دورهای g×۴۰۰ به مدت ده دقیقه (۶۷٪) و g×۶۵۰ به مدت پانزده دقیقه (۷۰٪) اختلاف داشت (Cochran *et al*., 1984). تفاوت در درصد بازیافت این بررسی در مقایسه با این پژوهش را می‌توان با حجم مایع رویی حذف‌شده پس از سانتریفوژ توضیح داد. به نظر

Archive of SID

www.SID.ir

می‌رسد در این پژوهش، مایع رویی بیشتری در مقایسه با تحقیق Cochran *et al.* (1984) حذف شد، در نتیجه یاخته‌های بیشتری در مایع رویی حذف شده است که موجب کاهش درصد بازیافت شده است. علت دیگر اختلاف در درصد بازیافت بررسی‌های مختلف، احتمال دارد به دلیل روش‌های مختلف مورد استفاده برای شمارش یاخته باشد.

نتیجه‌گیری کلی

بر پایهٔ بررسی‌های پیشین، منی رقیق‌شدهٔ اسب با دورهای سانتریفوژ ۴۰۰×g و ۶۰۰×g سانتریفوژ می‌شود. اما نتایج این پژوهش نشان داد، می‌توان اسپرم اسب خزر را با دورهای بالاتر بدون تأثیر زیانبار بر اسپرم و با درصد بازیافت بالاتر سانتریفوژ کرد. همچنین باتوجه به اینکه، در تیمار بدون سانتریفوژ شمار یاختهٔ متحرک و اسپرم سالم کمتری مشاهده شد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که سانتریفوژ در فرآیند سرد کردن منی اسب خزر می‌تواند سودمند باشد.

سپاسگزاری

از همهٔ همکارانی که در مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور که ما را در اجرای این تحقیق یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Aitken, R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reproduction, Fertility and Development, 7(4), 659-668.
2. Aurich, C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 89(1), 65-75.
3. Brinsko, S. P., Crockett, E. C. & Squires, E. L. (2000). Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, 54(1), 129-136.
4. Cochran, J. D., Amann, R. P., Froman, D. P. & Pickett, B. W. (1984). Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, 22(1), 25-38.
5. Ferrer, M. S., Paccamonti, D., Eilts, B. E., Lyle, S. K., Aljarrah, A. H. & Devireddy, R. V. (2004). Improvement of sperm recovery rates after centrifugation of stallion semen. In: Proceeding of *Annu Conf SFT/ACT*.
6. Jasko, D. J., Hathaway, J. A., Schaltenbrand, V. L., Simper, W. D. & Squires, E. L. (1992). Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 37(6), 1241-1252.
7. Jasko, D. J., Moran, D. M., Farlin, M. E. & Squires, E. L. (1991). Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, 35(6), 1059-1067.
8. Jasko, D. J. (1992). Evaluation of stallion semen. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 8(1), 129-148.
9. Kareskoski, A. M., Reilas, T., Andersson, M. & Katila, T. (2006). Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 33-38.
10. Parinaud, J., Le Lannou, D., Vieitez, G., Griveau, J. F., Milhet, P. & Richoilley, G. (1997). Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit®) following ejaculation. *Human Reproduction*, 12(11), 2434-2436.
11. Pagl, R., Aurich, J. E., Müller-Schlösser, F., Kankofer, M. & 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(5), 1115-1122.
12. Ritar, A. J. & Salamon, S. (1982). Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 35(3), 305-312.
13. Varner, D. D., Blanchard, T. L., Love, C. L., Garcia, M. C. & Kenney, R. M. (1987). Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, 28(5), 709-723.

Archive of SID

www.SID.ir