

بررسی اثر زرده تخم مرغ و سرما بر ذخیره سازی اسپرم پوشش دار شده قوچ تالشی در ۵°C

آزاده محمدی نودهی^۱ - محمد روستائی علی مهر^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۱۱

چکیده

این بررسی به منظور تعیین اثر زرده تخم مرغ و سردکردن بر اسپرم پوشش دار شده قوچ انجام شد. منی از سه راس قوچ با استفاده از واژن مصنوعی متصل به لوله حاوی تریس فروکتوز-۱۵٪ زرده تخم مرغ جمع آوری شد. نمونه‌های تجمع شده به مدت ۱۰ دقیقه با قدرت $700 \times g$ سانتریفیوژ و مایع رو حذف شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از تریس گلوکز رفیق و جهت حذف زرده تخم مرغ و مایع منی مجدداً سانتریفیوژ شد. رسوب به دو بخش و هر بخش به پنج قسمت مساوی تقسیم شد و به هر قسمت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰٪ زرده تخم مرغ اضافه شد. نیمی از تیمارها به صورت تدریجی سرد شد و نیمی دیگر در معرض شوک سرما قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دما ۵ درجه سانتی گراد ذخیره شد. تحرک پیش رونده اسپرم، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی (هوخست بیس بنزامید ۳۳۲۵۸) و واکنش آکروزومی (آلکسافلور-۴۸۸) در ساعت صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ بررسی شد. نتایج نشان داد سلامت غشای پلاسمایی و آکروزومی اسپرم در تیمارهای حاوی زرده تخم مرغ تفاوت نداشت. در هر دو شرایط سردکردن زنده‌مانی اسپرم بین تیمارهای حاوی زرده تخم مرغ تفاوت نداشت. میزان تحرک پیش رونده اسپرم در ۱۵ و ۲۰٪ زرده تخم مرغ تفاوتی نداشت ولی بیشتر از مقدار آن در صفر و ۵٪ زرده تخم مرغ بود. بیشترین اختلاف معنی‌دار در تحرک پیش رونده بین مقدار صفر و ۲۰٪ زرده تخم مرغ مشاهده شد. در نتیجه به منظور ذخیره‌سازی اسپرم پوشش دار شده قوچ در دما ۵ درجه سانتی گراد استفاده از ۲۰٪ زرده تخم مرغ توصیه می‌شود.

واژه های کلیدی: پوشش دار کردن، زرده تخم مرغ، شوک سرما، قوچ تالشی

مقدمه

رفیق کننده حاوی زرده تخم مرغ روش مناسبی جهت جدا سازی سریع مایع منی است. در این روش مدت زمان مواجهه اسپرم و مایع منی از طریق جمع آوری اسپرم در لوله حاوی رفیق کننده تریس - زرده تخم مرغ به حداقل می‌رسد (۱۰).

از زمان جمع آوری منی تا تلقیح آن به دستگاه تناسلی ماده، اسپرم در معرض انواع مختلفی از عوامل مضر محیطی قرار می‌گیرد. لیپیدهای غشا پلاسمایی اسپرم پستانداران به دلیل وجود مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع به شدت به خسارت‌های ناشی از ترکیبات فعال اکسیژن^۴ (ROS) حساس است (۳۴). طی جفت گیری طبیعی اسپرم از ابتدا در شرایط بی‌هوازی قرار دارد و در نتیجه احتمال بروز خسارت توسط ROS و پراکسیداسیون لیپیدها کاهش می‌یابد (۶). بنابراین ذخیره سازی اسپرم در شرایط بی‌هوازی می‌تواند خسارت‌های ناشی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشا را کاهش دهد.

کاهش دما و شوک سرما طی ذخیره‌سازی از طریق اعمال تغییرات فیزیکی و بیوشیمیایی توانایی باروری اسپرم را کاهش می‌دهد

مایع منی مخلوطی از ترشحات بیضه، اپیدیدیم و غدد ضمیمه است که در انتقال اسپرم به دستگاه تناسلی ماده ایفای نقش می‌کند. پروتئین‌های موجود در مایع منی گاو با حفظ تحرک و زنده‌مانی اسپرم (۳) سبب سهولت ظرفیت پذیری (۱۹) و بهبود باروری (۲۲) اسپرم می‌شوند. از طرفی مطالعات نشان داده است که مایع منی برای ذخیره سازی اسپرم اسب و گاو (۴۲) مضر است. مایع منی گاو حاوی گروهی از پروتئین‌ها به نام BSP^۳ است که طی انزال به کولین فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم متصل می‌شوند و خروج کلسترول و فسفولیپید را از غشا تحریک می‌کنند (۲۰). در نتیجه حضور BSP سبب افزایش حساسیت اسپرم به خسارت‌های ناشی از کاهش دما طی ذخیره سازی می‌شود (۱۹). پوشش‌دار کردن اسپرم با

۱ و ۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار فیزیولوژی دامپزشکی، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

*- نویسنده مسئول: (Email: roostaei@guilan.ac.ir)

3- Bovine seminal plasma

4- Reactive Oxygen Species

روبی حذف شد و ۱ میلی لیتر رقیق کننده تریس گلوکز [۳/۶۳۴] گرم تریس-(هیدروکسی متیل)-آمینومتان، ۱/۹۹۶ گرم اسیدسیتریک-مونوهیدرات و ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر از جنتامایسین در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، pH=۷] به رسوب اضافه و به آرامی مخلوط شد و سانتریفیوژ دوم با همان شرایط انجام شد و رسوب با استفاده از رقیق کننده تریس گلوکز تا غلظت 1×10^9 در میلی لیتر رقیق شد. نمونه‌ها به دو بخش و هر بخش به پنج قسمت مساوی تقسیم شد. هر قسمت (در دو بخش) با استفاده از رقیق کننده تریس گلوکز حاوی ۰/۶۲۵ درصد اسید کاپروئیک (Merck, Germany) و صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ یا ۴۰ درصد زرده تخم مرغ به صورت ۱:۱ (حجم/حجم) رقیق شد تا غلظت نهایی اسپرم به 5×10^8 ، اسید کاپروئیک ۰/۳۱۲۵ درصد و زرده تخم مرغ به صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد رسید. جهت ایجاد شرایط بی‌هوازی نمونه‌ها به داخل سرنگ کشیده شدند و سر سوزن به سرنگ متصل شد و با استفاده از پلی ونیل الکل سوراخ سوزن مسدود شد. سپس تیمارهای بخش اول به وسیله آب و یخ (5°C) به صورت ناگهانی (شوکه سرما) و تیمارهای بخش دوم به کمک دستگاه سرد کننده (Test Chamber EG53AH, KATO, Japan) به صورت تدریجی (۰/۲۵) درجه سانتی گراد در دقیقه) تا ۵ سانتی گراد سرد شدند. هر دو بخش به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۵ سانتی گراد نگهداری شدند. تحرک پیش رونده اسپرم، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا آکروزوم در ساعت صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ پس از سرد سازی بررسی شد. تمام مراحل آزمایش برای ۵ مرتبه به صورت مستقل تکرار شد.

ارزیابی اسپرم

ارزیابی تحرک نمونه‌ها، با قرار دادن ۵ میکرولیتر از منی روی لام با دما ۳۷ سانتی گراد و گذاردن یک لامل بر روی آن انجام شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ اختلاف فاز با بزرگنمایی $\times 400$ تحرک اسپرم، با اختلاف ۱۰ درصد در ۳ میدان دید تخمین زده و در انتها میانگین حاصل از این ۳ تخمین به عنوان درصد تحرک پیش-رونده ثبت شد (۷).

برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم از محلول هایپواسموتیک (۰/۷۳۵) گرم سترات سدیم دی‌هیدرات و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، pH=۷) استفاده شد (۱۴ و ۱۸). ۵ میکرولیتر منی با ۵۰ میکرولیتر از محلول هایپواسموتیک مخلوط و درون انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 37°C قرار داده شد. سپس حداقل ۱۰۰ یا حداکثر ۲۰۰ عدد اسپرم حداقل در ۵ میدان دید زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 400$ بررسی شد. اسپرم‌های دارای دم متورم به عنوان پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌های دارای دم صاف به عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی ناسالم) در نظر گرفته شدند.

(۱۷). روش‌های مختلفی جهت کاهش خسارت‌های ناشی از شوکه سرما طی ذخیره سازی پیشنهاد شده است. کنترل سرعت سرد شدن و استفاده از زرده تخم مرغ از جمله ابزار مقابله با آسیب‌های شوکه سرما هستند. به همین دلیل زرده تخم مرغ به عنوان ترکیب اصلی جهت تهیه رقیق کننده‌های منی مطرح است (۱۹). تا کنون اثر زرده تخم مرغ بر اسپرم پوشش‌دار شده قوچ متعاقب شوکه سرما و ذخیره سازی در سرما مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین هدف از این تحقیق تعیین بهترین مقدار زرده تخم مرغ جهت سرد کردن و ذخیره سازی اسپرم پوشش‌دار شده قوچ در سرما (5°C) است.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

این آزمایش با استفاده از سه راس قوچ نژاد تالشی با میانگین وزنی ۴۰ کیلوگرم با سن ۳-۴ سال از خرداد تا مرداد ماه ۱۳۹۰ در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. روزانه ۱۳۰۰ گرم یونجه خشک، ۵۹۰ گرم جو، ۶۲۰ گرم کاه در دو وعده خوراک صبح و شب در اختیار دام‌ها قرار گرفت. در طول آزمایش نمک و آجریسیدنی (مکمل مواد معدنی) به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار داده شد. نمونه‌های منی دوبار در هفته به فاصله دو روز و به کمک واژن مصنوعی و حضور میش فحل جمع آوری شد. به منظور ایجاد فحلی دائمی در میش به صورت خلاصه، به مدت ۷ روز سیدر حاوی پروژسترون در واژن میش قرار داده شد. در زمان برداشت سیدر، ۱ میلی لیتر وتاسترول^۱ (استرادیول بنزوات ۲ میلی گرم در میلی لیتر) به صورت عضلانی تزریق شد. سپس هر ۴۸ ساعت ۰/۲ میلی لیتر وتاسترول برای ادامه فحلی تزریق شد (۳۳). جهت پوشش‌دار کردن اسپرم انزال دوم در لوله حاوی رقیق کننده تریس فروکتوز [۳/۲۵۸] گرم تریس-(هیدروکسی متیل)-آمینومتان، ۱/۸۷۰ گرم اسید سیتریک مونوهیدرات، ۰/۹۳ گرم فروکتوز و ۰/۵ میلی لیتر جنتامایسین (۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، pH=۷] با ۱۵ درصد زرده تخم مرغ (حجم/حجم) جمع آوری و به وسیله فلاکس عایق حاوی آب 37°C به آزمایشگاه منتقل شد. در مجموع تعداد ۲۰ انزال در ۵ نوبت جمع آوری شد.

رقیق سازی، سرد کردن و ذخیره سازی

در آزمایشگاه نمونه‌های منی از نظر تحرک پیش رونده و غلظت بر اساس توضیحات زیر مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌هایی که تحرک پیش رونده کمتر از ۸۰ درصد و غلظت کمتر از $2/5 \times 10^9$ داشتند، از آزمایش حذف شدند. نمونه‌های منی تجمیع و با قدرت $70 \times g$ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ مایع

1- Vetasterol

مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون توکی صورت گرفت و تفاوت‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد اثر متقابل مقادیر مختلف زرده تخم مرغ و روش سرد کردن بر زنده‌مانی اسپرم معنی‌دار بود (جدول ۱، $P < 0.05$). زنده‌مانی اسپرم در تمام مقادیر زرده تخم مرغ طی کاهش تدریجی دما به صورت معنی‌داری نسبت به کاهش ناگهانی دما بیشتر بود ($P < 0.05$). بیشترین زنده‌مانی اسپرم در تیمارهای حاوی زرده تخم مرغ در شرایط کاهش تدریجی دما به دست آمد ($P < 0.05$). کمترین زنده‌مانی اسپرم متعلق به تیمار بدون زرده تخم مرغ در شرایط کاهش ناگهانی دما بود ($P < 0.05$). طی کاهش تدریجی و ناگهانی دما، بین تیمارهای حاوی زرده تخم مرغ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$). زنده‌مانی در تیمار فاقد زرده تخم مرغ، در شرایط کاهش تدریجی دما، بیشتر از تمام تیمارها در شرایط کاهش ناگهانی دما بود ($P < 0.05$).

جدول ۱- اثر زرده تخم مرغ و سرما بر زنده‌مانی اسپرم

زنده مانی	(Lsmeans±SE)	
	روش سرد کردن	سطوح زرده تخم مرغ (درصد)
۷۱/۲۰۰±۱/۹۳۳ ^b	تدریجی	۰
۷۹/۹۰۰±۱/۹۳۳ ^a		۵
۷۷/۴۰۰±۱/۹۳۳ ^a		۱۰
۷۹/۴۰۰±۱/۹۳۳ ^a		۱۵
۷۹/۳۵۰±۱/۹۳۳ ^a		۲۰
۵۰/۲۵۰±۱/۹۳۳ ^d	ناگهانی	۰
۶۱/۴۰۰±۱/۹۳۳ ^c		۵
۶۵/۵۰۰±۱/۹۳۳ ^c		۱۰
۶۵/۰۰۰±۱/۹۳۳ ^c		۱۵
۶۵/۵۵۰±۱/۹۳۳ ^c		۲۰

a,b- میانگین حداقل مربعات هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0.05$)

نتایج نشان داد که افزودن زرده تخم مرغ به صورت معنی‌داری منجر به بهبود زنده‌مانی اسپرم در شرایط سرد کردن تدریجی یا ناگهانی شد. همچنین، حضور زرده تخم مرغ شدت خسارات ناشی از سرد کردن ناگهانی را کاهش داد ولی مانع بروز آن نشد. گزارش شده است که افزودن زرده تخم مرغ به منی قوچ (۱۳) در زمان کاهش دما تا ۵ سانتی گراد سبب بهبود زنده‌مانی اسپرم می‌شود. مشخص شده است که فسفولیپیدهای و لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین زرده تخم مرغ (LDL-EY) می‌توانند اثر حفاظتی خود را به صورت مستقیم از طریق جایگزین شدن در غشا (۳۵) و یا با ایجاد لایه‌ای در سطح غشا (۲۵) اعمال کنند. همچنین گزارش شده است LDL-EY می‌تواند به

برای ارزیابی زنده‌مانی اسپرم از رنگ هوخست بیس بنزامید^۱ H33258 (AppliChem, Germany) استفاده شد (۹). به طور خلاصه ۱۰ میکرولیتر از تیمارها با ۱۰ میکرولیتر از محلول ۲٪ گلوکار آلدهید در بافر فسفات (۱۳۷ mM سدیم کلرید، ۲/۷ mM پتاسیم کلرید، ۸/۱ mM سدیم هیدروژن فسفات، ۱/۵ mM پتاسیم هیدروژن فسفات، pH=۷) مخلوط و فیکس شد. ۲۰ میکرولیتر از محلول رنگ هوخست بیس بنزامید (۲۰ میکروگرم در میلی لیتر از H33258 در ۰/۱۵۴ M/L سدیم کلرید و ۰/۱۵ M/L بافر تری سدیم سیترات pH=۷) به نمونه اضافه شد و بعد از ۳ تا ۵ دقیقه در دمای اتاق ۵ از نمونه روی لام قرار داد شده و با گذاشتن لامل بر روی آن، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر WU با بزرگنمایی ×۴۰۰، ۲۰۰ عدد اسپرم در شرایط نور بسیار کم بررسی شد. اسپرم‌های با تالو آب‌ی رنگ به عنوان پاسخ منفی (مرده) و اسپرم‌های بدون رنگ به عنوان پاسخ مثبت (زنده) در نظر گرفته شدند.

ارزیابی سلامتی غشا آکروزوم، با استفاده از رنگ آکسافلور^۲ PNA-۴۸۸ (Molecular Probes, USA) انجام شد (۳۸). به طور خلاصه از نمونه روی لام گسترش تهیه شد. گسترش‌ها پس از خشک شدن با استفاده از متانول مطلق فیکس و در دمای اتاق خشک شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از رنگ آکسافلور ۴۸۸ (۱۰ میکروگرم در میلی لیتر) روی آن‌ها ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دما ۳۷°C، 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 بزرگنمایی ×۴۰۰ تعداد ۱۰۰ یا ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی شدند و 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 مقادیر مختلف زرده تخم مرغ (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ درصد)، روش سرد کردن (کاهش تدریجی دما و کاهش ناگهانی دما) و اثرات متقابل آنها بر سلامت غشا پلاسمایی، سلامت غشا آکروزوم، تحرک پیش رونده و زنده‌مانی اسپرم پوشش‌دار شده قوچ از آزمون فاکتوریل (۵×۲) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و ۵ تکرار به صورت اندازه‌گیری‌های تکرار شده در زمان (صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی در دما ۵°C) استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایشی با استفاده از رویه Mixed برنامه SAS انجام شد.

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

بیشتر از رقیق کننده حاوی ۱۰ درصد زرده بود (۱۱). از طرفی بررسی اثر سطوح صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد زرده تخم مرغ بر اسپرم گاو طی ۳ و ۷ روز ذخیره سازی در دما 5°C نشان داد افزودن زرده تخم مرغ منجر به حفظ بهتر تحرک پیش رونده شد (۳۲). بنابراین به نظر می‌رسد که زرده تخم مرغ سبب حفظ عملکرد حرکتی اسپرم طی ذخیره سازی می‌شود.

زرده تخم مرغ حاوی مقدار زیاد کلسیم در حدود mg/g $17/1 \pm 27/1$ است (۴۴). حرکات موجی دم اسپرم تحت تاثیر غلظت یون کلسیم قرار دارد (۴۵). اسپرم ظرفیت بالایی برای دریافت کلسیم موجود در محیط دارد (۴). مشخص شده است وجود کربوکسیلیک اسیدهای زنجیر بلند دریافت کلسیم توسط اسپرم را کاهش می‌دهد در نتیجه سبب تاخیر در پیری سلول، افزایش ماندگاری و کاهش تحرک اسپرم می‌شود (۳۹). اسید کاپروئیک مورد استفاده در بررسی حاضر یک کربوکسیلیک اسید است که به صورت مساوی در تیمارها مورد استفاده قرار گرفت. بنابراین افزایش مقدار زرده تخم مرغ احتمالاً از طریق افزایش غلظت کلسیم و کاهش اثر ممانعت کننده اسید کاپروئیک در جذب کلسیم سبب افزایش تحرک اسپرم شد.

نتایج نشان داد که افزودن زرده تخم مرغ سلامت غشا پلاسمایی و آکروزومی اسپرم پوشش‌دار شده قوچ را بهبود داد. این نتایج با مطالعات انجام شده روی اسپرم انرالی قوچ (۲۳ و ۲۹) و آهوی قرمز (۱۲) مطابقت دارد. همچنین نشان داده شده است که زرده تخم مرغ سبب بهبود سلامت غشا پلاسمایی اسپرم گربه (۱۵)، غشا آکروزوم اسپرم اپیدیدیمی و انزالی گربه (۱۶) و سلامت غشا پلاسمایی اسپرم خوک (۲۸) در شرایط ذخیره سازی در سرما می‌شود. مقدار ترکیبات آنتی اکسیدانی در سیتوپلاسم اسپرم ناچیز است در نتیجه این سلول نسبت به پراکسیداسیون لیپیدها حساس است (۱). ترکیبات فعال اکسیژن در منی گاو (۳۱) و قوچ (۳۶) به وسیله سلول‌های مرده تولید می‌شوند. از طرفی مشخص شده است ترکیبات حاوی کیلات (مانند فسوتین، سرولوپلاسمین، اوالبومین و اوترنسفرین) موجود در زرده تخم مرغ با اتصال به یون‌های فلزی آزاد مانع تولید ROS می‌شوند. همچنین پروتئینی شبیه به سوپراکسید دیس‌موتاز خارج سلولی و پروتئین دیگری شبیه به گلوکوتائین پراکسیداز پلاسمایی در زرده تخم مرغ شناسایی شده است (۲۱). بنابراین زرده تخم مرغ احتمالاً از طریق کاهش خسارت‌های ناشی از ترکیبات فعال اکسیژن از غشا پلاسمایی اسپرم محافظت می‌کند.

نتایج نشان داد اثر سرعت سرد کردن بر تحرک پیش رونده، سلامت غشا پلاسمایی و سلامت غشا آکروزوم اسپرم پوشش‌دار شده قوچ معنی‌دار بود (جدول ۳، $P < 0/05$). تحرک پیش رونده، سلامت غشا پلاسمایی و سلامت غشا آکروزوم، در شرایط سرد کردن تدریجی به صورت معنی‌داری نسبت به شرایط سرد کردن ناگهانی بیشتر بود ($P < 0/05$).

طور غیر مستقیم در حفاظت از اسپرم ایفا نقش کند و با اتصال به پروتئین‌های مایع منی گاو و یا اشغال محل جایگزینی آن‌ها روی غشا مانع اتصال پروتئین‌های مایع منی به غشا اسپرم شود و خروج فسفولیپید و کلسترول را از غشای اسپرم کاهش دهد (۵). خروج لیپیدها از غشا سبب افزایش حساسیت اسپرم در برابر تغییرات القا شده در زمان سرد سازی می‌شود (۴۳). بنابراین بهبود زنده‌مانی اسپرم در حضور زرده تخم مرغ طی ذخیره سازی در سرما احتمالاً به دلیل آثار حفاظتی LDL-EY و فسفولیپیدهای موجود در آن است. بعلاوه، نتایج بررسی حاضر نشان داد افزودن بیشتر از ۵ درصد زرده تخم مرغ در شرایط سرد سازی تدریجی و ناگهانی اثر مفیدی بر زنده‌مانی اسپرم ندارد. میزان خروج لیپیدها از غشای اسپرم وابسته به غلظت و زمان مواجهه اسپرم با این پروتئین‌های مایع منی است (۱۹). احتمالاً دلیل عدم تفاوت در زنده‌مانی اسپرم در سطوح مختلف زرده تخم مرغ در شرایط سرد سازی تدریجی و ناگهانی ناشی از مجاورت زود هنگام زرده تخم مرغ و اسپرم در هنگام جمع‌آوری منی و حذف مایع منی باشد.

نتایج نشان داد که اثر زرده تخم مرغ بر تحرک پیش رونده، سلامت غشا پلاسمایی و سلامت غشا آکروزوم معنی‌دار بود (جدول ۲، $P < 0/05$). کمترین میزان تحرک پیش رونده در مقدار صفر درصد زرده تخم مرغ مشاهده شد ($P < 0/05$). تحرک پیش رونده در حضور ۲۰ درصد زرده تخم مرغ به صورت معنی‌داری بیشتر از مقدار ۱۰ درصد زرده تخم مرغ بود ($P < 0/05$). تحرک پیش رونده در مقدار ۱۰ و ۱۵ درصد زرده تخم مرغ تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0/05$). کمترین میزان سلامت غشا پلاسمایی و سلامت غشا آکروزوم در مقدار صفر درصد زرده تخم مرغ مشاهده شد ($P < 0/05$) و در سایر مقادیر زرده تخم مرغ تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0/05$).

نتایج نشان داد میزان تحرک پیش رونده اسپرم در حضور ۱۵ و ۲۰ درصد زرده تخم مرغ تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ولی بیشتر از مقدار آن در حضور صفر و ۵ درصد زرده تخم مرغ بود و بیشترین تفاوت معنی‌دار بین مقدار صفر و ۲۰ درصد زرده تخم مرغ مشاهده شد ($P < 0/01$). بنابراین احتمالاً بهترین نتیجه در سطح ۲۰ درصد زرده تخم مرغ به دست آمده است. بررسی‌های انجام شده بر اسپرم قوچ نشان داد وجود زرده تخم مرغ در رقیق کننده منجر به افزایش تحرک اسپرم انزالی قوچ می‌شود (۴۱). گزارش شده است در هنگام ذخیره سازی در دما ۵ سانتی‌گراد افزودن ۲۰ درصد زرده تخم مرغ به اسپرم انزالی خوک (۲۸) و اسپرم اپیدیدیمی و انزالی گربه (۱۶) سبب بهبود تحرک پیش رونده اسپرم می‌شود. همچنین نتایج حاصل از بررسی اثر سطوح ۱۰ و ۲۰ درصد زرده تخم مرغ بر ذخیره سازی اسپرم انزالی سگ در دما 5°C نیز نشان داد تحرک پیش رونده در رقیق کننده حاوی ۲۰ درصد زرده تخم مرغ به صورت معنی‌داری

جدول ۲- اثر زرده تخم مرغ بر تحرک پیش رونده، سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی، سلامت غشا آکروزوم اسپرم (Lsmeans±SE)

سطوح زرده تخم مرغ	تحرک پیش رونده	سلامت غشا پلاسمایی	زنده‌مانی	سلامت غشا آکروزوم
۰	۳۱/۷۵۰±۳/۳۶ ^d	۵۳/۷۰۰±۳/۳۲ ^b	۶۲/۲۲۵±۲/۶۳ ^b	۶۰/۹۷۵±۱/۴۴ ^b
۵	۴۲/۲۵۰±۳/۴۳ ^c	۶۱/۸۵۰±۲/۸۸ ^a	۷۰/۶۵۰±۲/۳۰ ^a	۶۹/۳۰۰±۱/۸۳ ^a
۱۰	۴۸/۲۵۰±۳/۷۵ ^{bc}	۶۴/۸۰۰±۲/۴۲ ^a	۷۱/۴۵۰±۲/۲۶ ^a	۷۲/۸۰۰±۱/۶۴ ^a
۱۵	۵۴/۷۵۰±۳/۴۳ ^{ab}	۶۵/۸۲۵±۳/۰۲ ^a	۷۲/۲۰۰±۲/۰۷ ^a	۷۳/۱۰۰±۱/۵۲ ^a
۲۰	۵۹/۷۵۰±۳/۱۵ ^a	۶۷/۱۷۵±۲/۳۲ ^a	۷۲/۴۵۰±۱/۷۳ ^a	۷۳/۱۲۵±۱/۴۹ ^a

a,b- میانگین حداقل مربعات هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار هستند (P < 0.05)

جدول ۳- اثر سرما بر تحرک پیش رونده، سلامت غشای پلاسمایی، سلامت غشا آکروزوم اسپرم (Lsmeans±SE)

روش سرد کردن	تحرک پیش رونده	سلامت غشا پلاسمایی	سلامت غشا آکروزوم
تدریجی	۶۰/۸۰±۲/۱۱ ^a	۷۴/۳۰۰±۱/۸۸ ^a	۷۴/۵۹۰±۰/۹۴ ^a
ناگهانی	۳۳/۹۰±۱/۸۳ ^b	۵۱/۰۴۰±۱/۶۱ ^b	۶۵/۱۳۰±۱/۰۵ ^b

a,b- میانگین های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار هستند (P < 0.05)

به اثبات رسیده است (۲) ولی تا کنون اثر شوک سرما بر اسپرم پوشش دار شده قوچ مطالعه نشده است. قابل توجه است که در هنگام جمع آوری نمونه اسپرم پوشش دار شده، منی بلافاصله بعد از انزال وارد رقیق کننده حاوی زرده تخم مرغ می‌شود در نتیجه نمی‌توان به طور همزمان نمونه انزالی و پوشش دار شده را از یک انزال تهیه کرد. از طرفی مشخص شده است که خصوصیات کمی و کیفی انزال اول با انزال دوم تفاوت دارد (۲۴). در مطالعه حاضر به دلیل محدودیت ذکر شده مقایسه اسپرم انزالی و پوشش دار شده انجام نشد. نتایج نشان داد تحرک پیش رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا آکروزوم با گذشت زمان به طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۴، P < 0.05). تحرک پیش رونده اسپرم قوچ بعد از ذخیره سازی به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب در حدود ۴۲ و ۲۸ درصد کاهش یافت. مشخص شده است ذخیره سازی اسپرم انزالی قوچ به مدت ۳۰ ساعت در مجاورت ۲۰ درصد زرده تخم مرغ سبب حفظ تحرک اسپرم تا ۷۰ درصد می‌شود (۲۳). گذشت زمان با ایجاد ترکیبات فعال اکسیژن، اسید لاکتیک و سایر متابولیت‌های مضر می‌تواند سبب تخریب غشا پلاسمایی و DNA شود (۴۰).

تحرک پیش رونده اسپرم به شدت تحت تاثیر سرعت کاهش دما قرار گرفت و تقریباً به نصف رسید. کاهش سریع دما بخصوص از ۱۵ سانتی گراد تا حدود صفر درجه سانتی گراد منجر به بروز تغییرات برگشت ناپذیر در اسپرم اکثر گونه‌ها بخصوص قوچ می‌شود (۲۵). اسپرم قوچ پس از بروز شوک سرما به دلیل تخریب غشای پلاسمایی و خروج ترکیبات داخل سلولی توانایی بازیافت کامل فعالیت متابولیکی و تحرک را از دست می‌دهد (۲۶). مقادیر کم کلسترول در غشا پلاسمایی اسپرم قوچ (سلول $300 \mu\text{g}/10^9$) احتمالاً دلیل حساسیت این سلول به کاهش ناگهانی دما است (۸). کلسترول از طریق تنظیم سیالیت زنجیره اسیدهای چرب فسفولیپیدهای غشا منجر به پایداری غشا پلاسمایی سلول طی کاهش دما می‌شود (۳۷). به دنبال شوک سرما غلظت داخل سلولی کلسیم افزایش می‌یابد (۳۰). به نظر می‌رسد که شوک سرما از طریق افزایش غلظت داخل سلولی کلسیم تا سطح مورد نیاز برای بروز واکنش آکروزومی منجر به تخریب آکروزوم اسپرم خواهد شد (۲۷). بنابراین شوک سرما با آسیب به ساختارهای اسپرم قوچ سبب کاهش ماندگاری آن می‌شود و به نظر می‌رسد روش پوشش دار کردن اسپرم نتوانست از بروز خسارات شوک سرما ممانعت نماید.

اگرچه آثار مخرب شوک سرما بر فراسنجه‌های اسپرم انزالی قوچ

جدول ۴- اثر زمان ذخیره سازی بر تحرک پیش رونده، سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا آکروزوم اسپرم (Lsmeans±SE)

زمان	تحرک پیش رونده	سلامت غشا پلاسمایی	زنده‌مانی	سلامت غشا آکروزوم
۰	۶۵/۰۰۰±۲/۹۵ ^a	۷۵/۲۰۰±۱/۸۶ ^a	۷۹/۰۶۰±۱/۵۱ ^a	۷۷/۳۶۰±۱/۲۱ ^a
۲۴	۵۳/۴۰۰±۲/۸۶ ^b	۶۶/۵۴۰±۲/۲۶ ^b	۷۳/۳۸۰±۱/۶۳ ^b	۷۳/۰۰۰±۱/۲۳ ^b
۴۸	۴۲/۴۰۰±۲/۷۹ ^c	۵۹/۲۰۰±۲/۲۵ ^c	۶۸/۰۲۰±۱/۹۸ ^c	۶۷/۷۸۰±۱/۳۳ ^c
۷۲	۲۸/۶۰۰±۲/۶۳ ^d	۴۹/۷۴۰±۲/۵۲ ^d	۵۸/۷۲۰±۱/۸۸ ^d	۶۱/۳۰۰±۱/۴۸ ^d

a,b- میانگین حداقل مربعات هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار هستند (P < 0.05)

و فقط سبب تعدیل آن خواهد شد. همچنین نتایج نشان داد که احتمالاً با استفاده از ۲۰ درصد زرده تخم مرغ به همراه ۰/۳۱۲۵ درصد اسید کاپروئیک می‌توان اسپرم پوشش‌دار شده قوچ را تا ۴۸ ساعت در دما ۵ سانتی‌گراد ذخیره کرد.

در نتیجه با توجه به نحوه کاهش تحرک پیش رونده اسپرم طی زمان احتمالاً می‌توان اسپرم پوشش‌دار شده قوچ را تا مدت ۴۸ ساعت در ۵ سانتی‌گراد ذخیره کرد.

نتیجه گیری

زرده تخم مرغ مانع از بروز خسارات ناشی از شوک سرما نمی‌شود

منابع

- 1- Alvarez, J.G., and B. T. Storey. 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23: 77-90.
- 2- Ashrafi, I., H. Kohram, H. Najjian, M. Poorhamdollah, and H. Mirzakhani. 2011. Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. *Afr. J. Biotechnol.* 10(44): 8965-8969.
- 3- Baas, J. W., P. C. Molan, and P. Shannon. 1983. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 68: 275-280.
- 4- Babcock, F., J. P. Singh, and H. A. Lardy. 1979. Alternation of membrane permeability to calcium ions during maturation bovin spermatozoa. *Dev. Biol.* 69: 85-93.
- 5- Bergeron, A., and P. Manjunath. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev.* 73: 1338-1344.
- 6- Bilodeau, J. F., S. Blanchette, C. Gagnon, and M. A. Sirard. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology.* 56: 275-286.
- 7- Bucak, M. N., S. Sariozkan, P. B.Tuncer, P. A.Ulutas, and H. I. Akcadag. 2009. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation, and antioxidant activities in angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Res.* 81: 90-95.
- 8- Darin-Bennett, A., and I. G. White. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology.* 14: 466-70.
- 9- De Leeuw, A. M., G. H. E. Den Daas, and H. Woelders. 1991. The fix vital stain method simultaneous determination of viability and acrosomal and status of bovine spermatozoa. *J. Androl.* 12: 112-118.DE
- 10- De pauw, I. M. C., A. Van soom, D. Maes, S. Verberckmoes, and A. De Kruijff. 2003. Effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of invitro stored bovine spermatozoa. *Theriogenology.* 59: 1109- 1122.
- 11- Doradoa, J., M. J. Gálvez, M. R. Murabitoa, A. Muñoz-Serranob, and M. Hidalgo. 2011. Identification of sperm subpopulations in canine ejaculates: Effects of cold storage and egg yolk concentration. *J. Anim. Sci.* 127: 106-113.
- 12- Ferná ndez-Santos, M. R., M. C. Estesó, A. J. Soler¹, V. Montoro¹, and Garde, J. J. 2006. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Reprod Dom Anim.* 41: 114-118.
- 13- Fiser, P. S., and R. W. Fairfull. 1986. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology.* 23: 518-524.
- 14- García-Artiga, C. 1994. Test de endósmosis en ovino. In: 7th International Meeting on Animal Reproduction, Murcia, Spain, pp. 77-81.
- 15- Harris, R. F., C. E. Pop, M. C. Gomez, S. P. Leibo, and B. L. Dresser. 2001. Storage of domestic cat spermatozoa for extended periods at 4°C. *Theriogenology.* 55: 308.
- 16- Hermansson, U., and E. Axne´r. 2007. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4°C. *Theriogenology.* 67: 1239-1248.
- 17- Holt, W. V., and V. North. 1986. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 78: 447-457.
- 18- Jeyendran, R. S., H. H. Van-der-Ven, and L. J. Zaneveld. 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch. Androl.* 29: 105-116.
- 19- Manjunath, P., and I. The´rien. 2002. Role of seminal plasma phospholipid binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol.* 53: 109-119.
- 20- Manjunath, P., M. R. Sairam, and J. Uma. 1987. Purification of four gelatin binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci. Reports.* 7: 231-238.
- 21- Mann, K., and M. Mann. 2008. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics.* 8: 178-191.

- 22- Moura, A., H. Koc, D. Chapman, and G. Killian. 2006. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: A proteomic approach. *J. Androl.* 27: 201–211.
- 23- Paulenz, H., L. Soderquist, R. Perez-Pe, and V. Berg. 2003. Effect of different extender and storage temperature on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology.* 57: 823-836.
- 24- Perez-Pe, R., B. Barrios, T. Muino-Blanco, and J. A. Cebrian. 2001. Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 760: 113–21.
- 25- Quinn, P. J., P. Y. Chow, and I. J. White. 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil.* 60: 403–407.
- 26- Quinn, P. J., I. J. White, and K. W. Cleland. 1969. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J. Reprod. Fertil.* 18: 209-220.
- 27- Robertson, L., and P. F. Watson. 1986. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J. Reprod. Fertil.* 11: 177-185.
- 28- Rusu, A. V., V. Miclea, and M. Zahan. 2011. Egg yolk protective effect in boar spermatozoa cooled at 5°C. *Anim. Sci. Biotech.* 44 (1): 447-452.
- 29- Salamon, S., and W. M. C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 77-111.
- 30- Shams-Borham, G., and R. A. P. Harrison. 1981. Production, characterization and use of ionophore-induced, calcium-dependent acrosome reaction in ram spermatozoa. *Gamete Res.* 4: 407-432.
- 31- Shannon, P., and B. Curson. 1982. Kinetics of the aromatic L-amino acid oxidase from dead bovine spermatozoa and the effect of catalase on fertility of diluted bovine semen stored at 5°C and ambient temperatures. *J. Reprod. Fertil.* 64:463–7.
- 32- Situmorang, P. 2002. The effects of inclusion of exogenous phospholipid in Tris diluent containing a different level of egg yolk on the viability of bull spermatozoa. *J. I.T.V.* 7(3): 181-187.
- 33- Stellflug, J. N., N. E. Cockett, and G. S. Lewis. 2008. The influence of breeding intensity on above- and below average sexual performance rams in single and multiple sire breeding environments. *Anim. Reprod. Sci.* 104: 248-256.
- 34- Storey, B. T. 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 203–214.
- 35- Trimeche, A., A. M. Anton, P. Renard, G. Gandemer, and D. Tainturie. 1996. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology.* 34: 385–393.
- 36- Upreti, G. C., K. Jensen, R. Munday, and J. F. Smith. 1994. Studies on ram spermatozoal aromatic amino acid oxidase. In: *Proceedings of the Australian Society for Reproductive Biology.* 26: Brisbane, Australia. 115.
- 37- Van Hoeven, R. P., P. Emmelot, J. H. Krol, and E. P. M. Oomen-Meulemans. 1975. Studies on plasma membranes. XXII. Fatty acid profiles of lipid classes in plasma membranes of rat and mouse livers and hepatomas. *Biochim. Biophys. Acta.* 380: 1-11.
- 38- Varisly, O., C. Uguz, C. Agca, and Y. Agca. 2009. Motility and acrosomal integrity comparison between electroejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 256-268.
- 39- Vijayaraghavan, S., and A. Hoskinse. 1989. Quantitation of bovine cytoplasmic calcium with quin-2 and fura-2 evidence external calcium does not have direct access to the sperm cytoplasm. *Cell Calcium.* 10(4):241-53.
- 40- Wahjuningsih., Hermanto, Nuryadi, Agus Budiarto, Panji Bhintoro. 2012. Effect of sperm concentration and length of storage at 5°C on motility of goat spermatozoa. *World Academy of Science, Engineering and Technology.* 66:1099-10101.
- 41- Watson, P. F., and I. C. A. Martin. 1975. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. *Aust. J. Biol. Sci.* 28: 145-52.
- 42- Way, A. L., L. C. J. Griel, and G. J. Killian. 2000. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *J. Androl.* 21: 213–219.
- 43- Witte, T. S., and S. Schafer-Somi. 2007. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 102: 181–193.
- 44- Witte, T. S., S. Schafer-Somi, A. Kuchar, E. Mostl, C. Iben, and C. Aurich. 2009. Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 293–305.
- 45- Yanagimachi, R. 1988. Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York: 135–185.