دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

تأثیر سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس بر کیفیت اسپرم قوچ زل در شرایط سردسازی و انجماد

مهناز احمدی همدانی[۱]، یوسف جعفری آهنگری[۲] و سعید زره‌داران[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسوول: mahmadih@yahoo.com)
۲- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- دانشیار، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۳۱

چکیده

هدف از این مطالعه، به کارگیری سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ بر کیفیت اسپرم قوچ زل در شرایط پیش و پس از انجماد بود. منی از ۴ راس قوچ سالم و بالغ با استفاده از شوک الکتریکی اخذ و نمونه‌های مناسب با رقیق‌کننده تریس به نسبت ۱ به ۴ مخلوط و پس از رسیدن به دمای ۵ درجه سانتی‌گراد، ارزیابی شدند. پایوت‌های نیم میلی‌لیتری با منی رقیق شده پر و ابتدا روی بخار ازت مایع منجمد و پس از آن در ازت مایع نگهداری شدند. پس از ۱۰ روز، یخ‌گشایی پایوت‌ها انجام گرفت و ویژگی‌های مورفولوژیک، زنده‌مانی، تحرک و حرکت پیش‌رونده اسپرماتوزوا بررسی شد. این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار شامل سطوح ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ و ۹ تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که تأثیر زرده تخم‌مرغ بر درصد زنده‌مانی، تحرک، حرکت پیش‌رونده، اسپرم طبیعی و درصد بازیابی اسپرم معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵)، اما با توجه به بیشتر بودن کیفیت اسپرماتوزوا در سطح ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ و تأمین منبع انرژی به منظور ادامه حیات، علیرغم معنی‌دار نبودن آن، در صورت مقرون به صرفه بودن قیمت تخم‌مرغ، می‌توان از سطح ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس برای حفظ و نگهداری طولانی مدت اسپرم قوچ زل، استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: کیفیت اسپرم، زرده تخم‌مرغ، قوچ زل

مقدمه

عمل‌آوری و انجماد اسپرم بیشتر پستانداران مستلزم گذراندن دو مرحله می‌باشد. طی مرحله اول که دورهٔ خنک کردن (سردسازی) نامیده می‌شود، دمای منی رقیق شده از دمای ۳۵ - ۳۰ درجه به ۵ درجه سانتی‌گراد و در مرحله دوم که دوره منجمد کردن می‌باشد، دمای منی رقیق شده از ۵ درجه به ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد در نیتروژن مایع، کاهش داده می‌شود (۳۳) که این کاهش درجه حرارت منی، باعث کاهش نرخ متابولیسم و افزایش طول عمر باروری اسپرماتوزوا شود (۳۵،۲۲). اما اسپرم زمانی که دمای آن به مقدار قابل ملاحظه‌ای از دمای

Archive of SID

www.SID.ir

بدن کمتر می‌شود، دچار شوک سرمایی می‌شود که واضح‌ترین علامت آن، از دست رفتن تحرک اسپرماتوزوا است (۱۰). همچنین، شوک سرمایی سبب تغییراتی در نفوذپذیری و ترکیبات لیپیدی غشاء سلول می‌شود، به طوری که مقدار سیّالیّت غشا و ترکیبات آن را کاهش می‌دهد (۷). در واقع، تغییرات دمایی طی فرآیند عمل‌آوری، انجماد و نیز یخ‌گشایی، باعث وارد شدن آسیب‌های ساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی به اسپرماتوزوئیدها می‌شود و به دنبال آن، نسبت سپرماتوزوئیدهای زنده و متحرک و در پی آن قدرت باروری کاهش پیدا می‌کند (۱۰). بنابراین، به منظور کاهش آسیب‌های حاصل از انجماد، از محافظت‌کننده‌های انجمادی در رقیق‌کننده استفاده می‌شود (۲۸). یکی از اجزای معمول رقیق‌کننده‌ها، زرده تخم‌مرغ است که از اسپرم در برابر شوک سرمایی محافظت می‌کند (۲) که لیپوپروتئین‌ها و لیسیتین موجود در فسفولیپیدهای آن را، عامل محافظت‌کننده اسپرم محسوب می‌کنند (۴،۶). اما مکانیسم دقیق زرده تخم‌مرغ که چگونه به زنده‌مانی اسپرم طی فرآیندهای انجمادی (شوک سرمایی، انجماد- یخ‌گشایی) کمک می‌کند، هنوز ناشناخته باقی مانده است. چندین فرضیه در این باره ارایه شده است. فرضیات اولیه بیانگر این مطلب است که لیپوپروتئین‌ها با دانسیته کم (LDL) با غشای اسپرم همکاری نموده و حفاظتی را برای اسپرم از راه استحکام بخشیدن به غشاء فراهم می‌کنند (۲۳،۱۶). دومین فرضیه بیان کننده این ست که فسفولیپیدهای موجود در LDL، لایه محافظتی بر سطح غشای اسپرم ایجاد می‌کنند (۳۰). نظریه سوم بیانگر آن است که LDL با پپتیدهای کاتیونی زیانبار در اسپرم که با غشای اسپرم باند می‌شوند، رقابت می‌کند (۳۷). اخیراً نیز کشف شده است که خانواده‌ای از پروتئین‌های باند شونده با لیپید به نامBSP[1] در پلاسمای منی گاو وجود دارد که همولوگ‌های آن در گونه‌های دیگر از جمله قوچ موجود است که با LDL، اثر متقابل برقرار می‌کند و به نظر می‌رسد که تأثیر معنی‌داری بر یکپارچگی غشای اسپرم حفاظت شده داشته باشد (۶). آلوارز و همکاران (۳)، سطوح مختلف LDL را روی اسپرم قوچ آزمایش و مشاهده نمودند که ۸ درصد LDL، کیفیت اسپرماتوزوا را بهبود می‌بخشد. بنابراین، با استفاده از یک رقیق‌کننده مناسب با ترکیبات محافظت‌کننده، می‌توان بر مشکل افت باروری ناشی از کاهش درصد اسپرماتوزوای زنده، متحرک و طبیعی در پی انجماد، غلبه نمود و گام موثری در تکنیک تلقیح مصنوعی برداشت.

هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس بر زنده‌مانی، تحرک، حرکت پیش‌رونده و مورفولوژی اسپرم پیش و پس از انجماد و تعیین بهترین سطح آن در حفاظت و نگهداری بلندمدت اسپرم قوچ زل بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در ایستگاه تحقیقات علوم دام و آزمایشگاه فیزیولوژی گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

1- Bovine Seminal Plasma

Archive of SID

www.SID.ir

در فصل بهار سال ۱۳۸۸ انجام گرفت. از ۴ رأس قوچ زل ۳ تا ۴ ساله به وزن ۵±۵۰ کیلوگرم استفاده شد. حیوانات مورد آزمایش در شرایط طبیعی و جدا از میش‌ها نگهداری شدند. قوچ‌ها فزون بر جیره معمول، روزانه به طور جداگانه هرکدام مقدار ۵۰۰ گرم دانه جو نیز دریافت نمودند. فزون بر آن، آب تازه، نمک و مواد معدنی در دسترس آنها قرار داده شده بود. اسپرم‌گیری با استفاده از دستگاه شوک الکتریکی صورت گرفت. برای اسپرم‌گیری، ابتدا قوچ‌ها مقید شده و سپس میله پلاستیکی حامل الکترود به ژل استریل لیزکننده، آغشته و از طریق مقعد وارد راست روده حیوان شد. ارزیابی اولیه بر اساس رنگ و کیفیت ظاهری نمونه‌های اسپرم انجام شد. در هر روز اسپرم‌گیری، نمونه‌های اسپرم به رنگ کرمی ضعیف تا کرمی غلیظ و با حرکت موجی بیشتر از ۳ انتخاب شد. کیفیت نمونه‌های اسپرم جمع‌آوری شده در جدول ۱ ذکر شده است. نمونه‌های منی گرفته شده، در صورت مناسب بودن با یکدیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مخلوط شدند. نمونه‌های منی به ۳ قسمت مساوی تقسیم شدند و به نسبت ۱ به ۴، اسپرم به رقیق‌کننده تریس اضافه شد. ترکیب رقیق‌کننده تریس به جز در مورد زرده تخم‌مرغ برای تمام تیمارهای آزمایشی مشابه بود. ترکیب رقیق‌کننده تریس در این آزمایش شامل تریس، فروکتوز و اسید سیتریک به ترتیب (۳/۸۷، ۰/۵ و ۱/۹ گرم)، گلیسرول ۵ درصد (V/V)، پنی‌سیلین ۱۰۰۰۰ واحد بین‌المللی (IU)، استرپتومایسین ۰/۱ گرم و آب مقطر تا ۱۰۰ میلی‌لیتر بود. غلظت‌های مختلف زرده تخم‌مرغ ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد، به عنوان تیمارهای آزمایشی مورد استفاده قرار گرفتند (۱۳). به‌منظور تعیین کیفیت زرده تخم‌مرغ، پس از جداسازی زرده از سفیده تخم‌مرغ با کاغذ صافی، زرده تخم‌مرغ‌ها به آزمایشگاه منتقل و با استفاده از کیت‌های تجاری موجود و با دستگاه اتوآنالیزور Metro lab 3500 plus با روش فتومتری، میانگین تری‌گلیسرید، کلسترول، LDL و HDL ده عدد زرده تخم‌مرغ، اندازه‌گیری شد (۳۸). سپس با توجه به اینکه، اضافه نمودن گلیسرول در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد، هیچ گونه مزیتی بر اضافه کردن آن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد ندارد، رقیق‌سازی به صورت یک مرحله‌ای انجام شد (۱۳). رقیق‌کننده تریس مورد استفاده همراه با نمونه‌های منی طی مراحل رقیق‌سازی در حمام آب گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند تا اختلاف دمایی با منی نداشته باشند و به منظور تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های موجود در رقیق‌کننده، نمونه‌های رقیق‌شده به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم نگهداری شدند، سپس نمونه‌ها در یخچال قرار داده شدند تا دمای آن در مدت ۲ تا ۳ ساعت به ۵ درجه سانتی‌گراد کاهش یابند. بخشی از نمونه‌های رقیق‌شده پس از رسیدن به دمای ۵ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شدند و بخشی از آن به داخل پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری پر شدند و انتهای آنها برای جلوگیری از ورود هوا توسط پلی وینیل الکل مسدود گشتند. سپس پایوت‌های دارای اسپرم روی بخار ازت مایع به مدت ۱۰ دقیقه منجمد شدند. پس از انجماد، پایوت‌ها به کانتینرهای

Archive of SID

www.SID.ir

دارای ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پایوت‌های دارای اسپرم منجمد، پس از ۱۰ روز از ازت مایع خارج و پس از قرار دادن در حمام آب گرم (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد)، یخ‌گشایی شدند. ارزیابی ویژگی‌های حیاتی اسپرم شامل تعیین درصد اسپرم زنده و ویژگی‌های مورفولوژیک با رنگ‌آمیزی سلول و شمارش میکروسکوپی انجام شد. به منظور تعیین درصد تحرک اسپرم، یک قطره منی و یک قطره سرم فیزیولوژی روی لام از پیش گرم شده قرار داده، سپس روی آن لامل گذاشته تا نمونه‌ها به‌طور یکنواخت گسترش یابند. با مشاهده مستقیم و شمارش سلول‌های اسپرم دارای حرکت در میدان دید میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰x، تعداد اسپرم متحرک و تعداد کل اسپرم شمارش و درصد اسپرم متحرک را محاسبه نمودیم و برای تعیین حرکت پیش‌رونده، تعداد اسپرم‌های دارای حرکت رو به جلو و یا دارای مسیر مستقیم روی خط راست که دم آنها دارای حرکت شناگری بود، با شمارش چشمی توسط میکروسکوب نوری با بزرگنمایی ۴۰X، ارزیابی شدند. برای اندازه‌گیری درصد اسپرم‌های زنده از محلول رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. با توجه به سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها، درصد سلول‌های زنده و مرده در میدان دید میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰x شمارش شدند (۱۳). برای رنگ‌آمیزی، یک قطره اسپرم رقیق‌شده با یک قطره رنگ ائوزین- نیگروزین را مخلوط نموده و پس از ۲ دقیقه، گستره‌ای روی لام تهیه تا در مجاورت هوا خشک شود. تعداد سلولهای اسپرماتوزوایی که رنگ قرمز گرفته را، به عنوان مرده و تعداد اسپرم‌هایی که به رنگ سفید دیده شد، به عنوان زنده، در نظر گرفته شد (۱۹). برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم، ناهنجاری‌های اولیه چون سر جدا شده غیرطبیعی، دم پیچ خورده اصلی، قطره سیتوپلاسمی نزدیک، نقص آکروزوم و ناهنجاری‌های ثانویه از جمله، سر جدا شده طبیعی، قطره سیتوپلاسمی دور، دم لوپ خمیده، سر باریک، سر متورم، سر کوچک و آکروزوم جداشده، با بزرگنمایی ۴۰X شمارش گردید و با شمارش ۱۰۰ اسپرم در هر لام، درصد اسپرم‌های ناهنجار تعیین شد (۴۱). درصد بازیابی از نسبت درصد اسپرم زنده، متحرک و حرکت پیش‌رونده پس از انجماد به پیش از انجماد به دست آمد. این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS آنالیز شدند (۳۴). داده‌های حاصل از هر مرحله آزمایش مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و میانگین داده‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند و به‌دلیل درصدی بودن داده‌ها در این پژوهش، از آزمون نرمالیته استفاده شد و چون دارای توزیع نرمال بودند، از تبدیل زاویه‌ای، استفاده نشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- ارزیابی خصوصیات اسپرم پس از جمع‌آوری

زنده مانی	حرکت موجی	تحرک	حرکت پیش‌رونده	ناهنجاری اولیه	ناهنجاری ثانویه	مجموع ناهنجاری‌ها	اسپرم طبیعی
۹۱/۲	۵	۸۷/۱	۸۲/۱	۸/۱	۰/۷۱	۸/۸۰	۹۱/۲

نتایج و بحث

LDL و لیسیتین موجود در فسفولیپیدهای زرده تخم‌مرغ با باند شدن با پروتئین‌های BSP موجود در پلاسمای منی، خروج کلسترول و فسفولیپیدهای غشای اسپرم را به حداقل می‌رسانند و به این شیوه اثرات مثبتی بر ذخیره‌سازی اسپرم به صورت مایع و منجمد بر جای می‌گذارند (۶). که در این رابطه، فیسر و فیرفول (۱۴) طی آزمایشی بیان نمودند که افزودن زرده تخم‌مرغ به رقیق‌کننده، اثر مفیدی در تحرک اسپرم قوچ طی سردسازی تا دمای ۵ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد دارد.

در پژوهش حاضر، به کارگیری سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ نتوانست تأثیرمعنی‌داری بر زنده‌مانی، تحرک، حرکت پیش‌رونده و ناهنجاری‌های مورفولوژیک اسپرماتوزوآ در شرایط پیش و پس از انجماد داشته باشد (جداول ۲ و ۳). اما بیشترین مقدار این صفات و کمترین مقدار ناهنجاری‌ها در شرایط پس از انجماد در سطح ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ به ترتیب با میانگین (۳۶/۶±۳)، (۳۳±۳/۱)، (۲۸±۳/۲) و (۱۴/۶۶±۲/۷) درصد حاصل شد (جدول ۳). سطوح به کار رفته زرده تخم‌مرغ بر بازیابی خصوصیات حیاتی اسپرماتوزوا نیز، اثر معنی‌داری نداشت (جدول ۴).

در این پژوهش، ارزیابی ویژگی‌های حیاتی سلول اسپرماتوزوآ در پیش از انجماد، برای کنترل شرایط اسپرم به‌منظور ادامه فرآیند انجماد و یخ‌گشایی صورت گرفت که در صورت کیفیت نامطلوب اسپرماتوزوآ، از ادامه روند انجماد، صرف نظر شود.

نتایج این پژوهش با گزارش‌های پورسل و همکاران (۲۹) و جعفری و همکاران (۲۰) مطابقت داشت که، اثر معنی‌داری را در استفاده از سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ بر ویژگی‌های حیاتی اسپرماتوزوا در شرایط پیش از انجماد مشاهده نکردند.

همچنین نتایج این پژوهش با پژوهش‌های گیل و همکاران (۱۷) و مارکوجیمنز و همکاران (۲۴) نیز در شرایط پس از انجماد، مطابقت داشت. اما با پژوهش‌های اولرو و همکاران (۲۷) و عبدالحکیم و همکاران (۱) مغایرت داشت که علت آن را می‌توان به تفاوت در ترکیبات رقیق‌کننده، نسبت رقیق‌سازی، نوع حیوان، نوع نژاد و یا به کارگیری سطوحی متفاوت از سطوح زرده تخم‌مرغ به کار رفته در این پژوهش، نسبت داد.

نوع رقیق‌کننده نیز می‌تواند از عوامل تاثیرگذار در نتایج باشد، زیرا به کارگیری غلظت‌های مختلف زرده در رقیق‌کننده شیر، با توجه به وجود پروتئین‌های کازئین شیر که

Archive of SID

www.SID.ir

سبب حفاظت اسپرم در برابر شوک سرمایی می‌شود (۶)، شاید نتایج متفاوت‌تری در مقایسه با به کارگیری سطوح مختلف زرده در رقیق‌کننده تریس بر جای گذارد. همچنین دالساندرو و مارتموسی (۹) بیان نموده‌اند که رقیق‌کننده شیر، اثرات مفید زرده تخم‌مرغ را تقویت می‌نماید.

جدول ۲- بررسی تأثیر سطوح مختلف زرده در شرایط سردسازی تا ۵ درجه سانتی‌گراد بر ویژگی‌های اسپرم

زرده تخم‌مرغ (٪)	زنده‌مانی (٪)	تحرک (٪)	حرکت پیش‌رونده (٪)	ناهنجاری‌های مورفولوژیک (٪)	اسپرم طبیعی (٪)
۱۰	۸۱/۸	۷۶	۷۱	۸/۶	۹۱/۴
۱۵	۸۱	۷۸	۷۳	۱۰/۳	۸۹/۷
۲۰	۸۲/۶	۷۸	۷۴	۸/۳	۹۱/۷
SEM	± ۱/۵	±۱/۶۷	± ۱/۶۸	± ۲/۳	± ۲/۳

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

جدول ۳- بررسی تأثیر سطوح مختلف زرده در شرایط پس از انجماد-یخگشایی بر ویژگی‌های اسپرم

زرده تخم‌مرغ (٪)	زنده مانی (٪)	تحرک (٪)	حرکت پیش‌رونده (٪)	ناهنجاری‌های مورفولوژیک (٪)	اسپرم طبیعی (٪)
۱۰	۳۳/۶	۲۹	۲۴	۱۵/۳	۸۴/۷
۱۵	۳۵	۳۱	۲۶	۱۵/۳	۸۴/۷
۲۰	۳۶/۶	۳۳	۲۸	۱۴/۶۶	۸۵/۴۴
SEM	± ۳	± ۳/۱	± ۳/۲	± ۲/۷	± ۲/۷

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

جدول ۴- بررسی تأثیر سطوح مختلف زرده تخم مرغ بر درصدبازیابی خصوصیات منی

درصد زرده	بازیابی زنده مانی (٪)	بازیابی تحرک (٪)	بازیابی حرکت پیش‌رونده (٪)
۱۰	۴۱/۰۸	۳۷/۲۴	۳۲/۲۴
۱۵	۴۳/۱۱	۴۰/۷۳	۳۶/۵۴
۲۰	۴۴/۴۹	۴۲/۵	۳۲/۲۴
SEM	± ۳/۳	± ۳/۵	± ۳/۶

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

دونگ و همکاران (۱۱) طی آزمایشی، سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ را در رقیق‌کننده منی به کار بردند و اختلاف معنی‌داری را در خصوصیات حیاتی اسپرم به دست نیاوردند. آنها همچنین افزودن زرده به منی را از ۱ تا ۵ ساعت به تعویق انداختند و تفاوت معنی‌داری را بر کیفیت اسپرم پس از انجماد مشاهده نکردند و بیان نمودند که در معرض قرارگرفتن اسپرماتوزوا با پروتئین‌های پلاسمای منی، اثرات نامطلوب بسیار ناچیزی بر کیفیت آن گذاشته است و حضور زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده، اثر معنی‌داری بر اسپرم داشته، اما جزئیات آن، همچون مقدار زرده تخم‌مرغ و چگونگی اضافه نمودن زرده، تأثیر کمی بر بازده انجمادی اسپرم می‌گذارد.

Archive of SID

www.SID.ir

در پژوهش حاضر نیز ممکن است پروتئین‌های پلاسمای منی تاثیر نامطلوب کمی بر اسپرم قوچ بر جای گذاشته باشد، زیرا اثرات زیانبار این پروتئین‌ها، به غلظت آنها بستگی دارد. مقدار این پروتئین‌ها در پلاسمای منی اسپرم قوچ (۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) است در حالی که در برخی حیوانات همچون گاو (۳۹/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) است و به دلیل مقادیر زیاد این پروتئین، به مقدار بیشتری از LDL یا فسفاتیدیل‌کولین ممکن است نیاز باشد و تفاوت در مقدار این پروتئین‌ها می‌تواند یک پیچیدگی در ذخیره‌سازی اسپرم ایجاد کند (۶).

سالامون و ماکس‌ول (۳۲) بیان نمودند که اثر حفاظتی زرده تخم‌مرغ بر اسپرماتوزوای قوچ، در طی انجماد نسبت به گاو کمتر است. هلت و همکاران (۱۸) نیز مکانیسم حفاظتی زرده تخم‌مرغ را بر انجماد اسپرم، ضعیف بیان نمودند و گزارش نمودند، تغییرات در زرده تخم‌مرغ با موادی خاص همچون سدیم تریتانول لائوریل سولفات می‌تواند، توانایی حفاظتی زرده تخم‌مرغ را در برخی گونه‌ها از جمله قوچ، به طور معنی‌داری بهبود بخشد. یکی دیگر از عوامل مؤثر در نتایج تحقیق حاضر، تفاوت در کیفیت زرده تخم‌مرغ این آزمایش در مقایسه با آزمایشات پژوهشگران دیگران است. وی پینگ و همکاران (۴۰) بیان نمودند که تخم‌مرغ‌های محلی نسبت به صنعتی، کلسترول بیشتری دارند. برگرون و منجوناث (۶) گزارش نمودند که ممکن است، کلسترول زرده تخم‌مرغ، جایگزین کلسترول از دست رفته غشای سلول طی سردسازی یا مواجهه با شوک سرمایی شود. ترکیبات لیپیدی زرده تخم‌مرغ همچنین می‌تواند تحت‌تاثیر نوع نژاد مرغ، سن مرغ، ژنتیک و تغذیه مرغ قرار گیرد (۲۱،۸). کوبوس و همکاران (۸)، ترکیبات زرده دو نوع نژاد مرغ را مورد بررسی قرار دادند و تفاوت معنی‌داری را در ترکیب اسیدهای چرب لیپیدهای زرده به دست آوردند. اسیدهای چرب بلند زنجیر با چند پیوند دوگانه (C_{16}، C_{18} و C_{20}) جزء اسیدهای چربی می‌باشند که تحت‌تأثیر نژاد مرغ قرار می‌گیرند. هر چه مقدار اسیدهای چرب غیراشباع زرده در رقیق‌کننده بیشتر باشد، می‌توانند سبب سیالیت بیشتر غشای اسپرم می‌شوند، اما به دلیل حساس بودن اسپرم قوچ به پراکسیدها و رادیکال‌های آزاد، دچار پراکسیداسیون لیپید می‌گردند (۲۵). همچنین، میزان LDL از عواملی است که کیفیت زرده تخم‌مرغ را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد و افزایش آن، سبب می‌شود که در هنگام تجزیه شدن طی شوک سرمایی، فسفولیپیدهای آن آزاد و جایگزین فسفولیپیدهای آسیب دیده شود (۶). بنابراین، کیفیت زرده تخم‌مرغ و اجزای تشکیل‌دهنده آن می‌تواند از عواملی باشند که در بررسی غلظت‌های مختلف زرده تخم‌مرغ بر ویژگی‌های حیاتی اسپرماتوزوا تأثیرگذار باشند. در این پژوهش، کیفیت زرده تخم‌مرغ به کار گرفته شده، در جدول ۵ ذکر شده است، اما متأسفانه به دلیل نبود اطلاعات و عدم آزمایشات در خصوص کیفیت زرده تخم‌مرغ مورد استفاده توسط پژوهشگران دیگر، امکان مقایسه ترکیبات زرده وجود نداشت.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- میانگین ترکیبات زرده تخم‌مرغ بر ویژگی‌های اسپرم

پرنده	تری گلیسرید (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	کلسترول (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	LDL (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	HDL (میلی‌گرم بر دسی لیتر)
مرغ	۲۷۴۰۰	۲۰۳۰	۴۰	۳۲۰

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

همچنین، شوک‌های حرارتی طی فرآیندهای سردسازی و انجماد، موجب تغییراتی در مورفولوژی اسپرماتوزوا، آسیب به اکروزوم و آسیب میتوکندریایی می‌شوند. بنابراین، پس از انجماد درصد اندکی از اسپرم‌ها دارای غشای سالم و فعالیت طبیعی میتوکندری هستند (۱۵). در پژوهش مذکور وجود زرده تخم‌مرغ تا حدود زیادی مانع از شوک‌های سرمایی و انجمادی شد، اما سطوح مختلف آن تأثیر معنی‌داری بر ناهنجاری‌های مورفولوژیک در شرایط قبل و پس از انجماد نداشت. علت آن را شاید بتوان به آسیب‌های ایجاد شده در سلول، قبل از اضافه نمودن رقیق‌کننده دانست، زیرا جمع‌آوری اسپرم با شوک الکتریکی و فرآیند رقیق‌سازی منی می‌تواند آسیب‌های غیرقابل برگشتی (۶) را در سلول ایجاد کند که دیگر به کارگیری سطوح مختلف زرده، نتواند برای رفع ناهنجاری‌ها برآید. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج جعفری آهنگری (۲۰) مطابقت و با نتایج سونمز و دمیرسی (۳۶) و واتسون و مارتین (۳۹)، مغایرت داشت که یکی از دلایل تفاوت این پژوهش با گزارشات برخی نویسندگان، مشکلات ارزیابی مورفولوژی اسپرماتوزوآ، موردی بودن و تغییرپذیری آن است که تفسیر دقیق و مقایسه نتایج بین آزمایشات را مشکل می‌سازد. مورفولوژی اسپرم تحت‌تأثیر فاکتورهای مختلفی چون روش‌های جابجایی منی، تهیه گسترش و از همه مهم‌تر به مهارت شخص ارزیاب بستگی دارد (۳۱).

از سویی برخی از ناهنجاری‌ها طی فرآیند انجماد- ذوب ایجاد می‌شوند که تشخیص آنها از راه مشاهده مستقیم سلول‌ها با میکروسکوپ نوری، امکان‌پذیر نمی‌باشد و احتمالاً به کارگیری محافظت‌کننده به کار رفته در این پژوهش، بر حفاظت از این آسیب‌ها، مؤثر واقع شده است از جمله:

- تخریب قطعه میانی اسپرم طی فرآیند انجماد که اثر منفی بر متابولیسم دارد، زیرا ساختارهای میتوکندریای اسپرم در این بخش قرار دارند (۱۲).
- حذف پروتئین‌های غشا و کاهش کربوهیدرات‌های سطح غشای سلولی (۱۷).
- آسیب‌های مکانیکی به اسکلت سلولی سلول در اثر تشکیل گاز طی انجماد (۵).

همچنین به‌نظر می‌رسد که این محافظت‌کننده بیشتر بر یکپارچگی آکروزوم و غشای پلاسمایی نقش دارد، که در پژوهش مذکور مورد مطالعه قرار نگرفته است و هدف، بررسی اثرات سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ بر ناهنجاری‌های ثانویه از جمله قطره سیتوپلاسمی، ناهنجاری‌های سر اسپرم (سر باریک، سرهای طبیعی کوچک، سر متورم، جدا شدن قطعه‌ای از سر)، دم لوپ،

Archive of SID

www.SID.ir

خمیدگی وسط دم و سرجدا شده بوده است (۴۱). کـه بـررسی مجمـوع این ناهنجـاری‌ها، توسط تعـداد بسیار محدودی از پژوهشگران صورت گرفته است که امکان مقایسه نتایج حاصل را با مشاهدات دیگران محدود می‌سازد. در این پژوهش بر نسبت بازیابی زنده‌مانی، تحرک، حرکت پیش‌رونده اسپرماتوزوا با افزایش سطح زرده تخم‌مرغ افزوده گردید و وجود ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس در مقایسه با سطوح دیگر زرده تخم‌مرغ، شرایط مناسب‌تری برای ماندگاری اسپرم ایجاد نمود، هر چند که این اختلاف معنی‌دار نبود. مولینیا و همکاران (۲۶) مشاهده نمودند که درصد بازیابی اسپرماتوزوا با اضافه نمودن ۱۸/۵ درصد زرده تخم‌مرغ در مقایسه با ۴/۵ درصد، بهبود یافت.

با توجه به اینکه، مهمترین احتیاج سلول اسپرم به انرژی، به منظور تحرک است و اضافه نمودن منابع انرژی‌زا نظیر قندها، علاوه بر تأمین این احتیاج سلول، سبب تمدید حیات اسپرم می‌گردد و زرده تخم‌مرغ حاوی مقداری گلوکز و دیگر قندها و ترکیبات قابل سوخت و ساز اسپرم است و از راه خنثی نمودن اسید لاکتیک تولیدی از راه گلیکولیز، به عنوان یک منبع ذخیره غذایی عمل می‌نماید (۲۲) و با توجه به بیشتر بودن کیفیت اسپرماتوزوا در سطح ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ، علیرغم معنی‌دار نبودن آن، در صورت مقرون به صرفه بودن قیمت تخم‌مرغ، می‌توان از سطح ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس برای حفظ و نگهداری طولانی مدت اسپرم قوچ زل استفاده نمود.

منابع

1. Abdelhakeam, A.A., E.F. Graham and I.A. Vazquez. 2004. Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. Cryobiology, 28: 36-42.
2. Aisen, E.G., H.L. Alvarez, A. Venturino and J.J. Garde. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. Theriogenology, 53: 1053-1061.
3. Alvarez, M., D. Castro, J. Muro, F. Martinez-Pastor, M. Mata-Campuzano, C. García, L. Anel and P. de Paz. 2008. Effect of Different LDL Concentrations in the Freezing Extender on Semen Quality of Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. Biology of Reproduction, 78: 114-259.
4. Amirat, L., D. Tainturier, L. Jeanneau, C. Thorin, O. Gerard, J.L. Courtens and M. Anton. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. Theriogenolog, 61: 895-907.
5. Andrabi, S.M.H. 2008. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull Spermatozoa. Reproduction of Dominant Animal, 10: 1-18. (Review)
6. Bergeron, A. and P. Manjunath. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Molecular Reproduction and Development, 73: 1338-1344.

Archive of SID

www.SID.ir

5. Andrabi, S.M.H. 2008. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull Spermatozoa. Reproduction of Dominant Animal, 10: 1-18. (Review)
6. Bergeron, A. and P. Manjunath. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Molecular Reproduction and Development, 73: 1338-1344.
7. Blesbois, E., I. Grasseau and F. Seigneurin. 2005. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. Reproduction, 129: 371-378.
8. Cobos, A., L. Dela Hoz, M.I. Cambero and J.A. Ordonez. 1994. Dietary modification and hen strain dependence of egg yolk lipids. Food Research International, 28: 71-76.
9. D'alessandro, A.C. and G. Martemucci. 2005. Post-thaw survival and acrosome integrity of spermatozoa of Leccese rams frozen in different seasons with a milk-egg yolk extender. Italian Journal of Animal Science, 4: 139-148.
10. Dhami, A.J. and S.B. Kodagali. 1990. Freezability, enzyme leakage and fertility of buffalo spermatozoa in relation to the quality of semen ejaculates and extenders. Theriogenology, 34: 853-863.
11. Dong, Q., L.M. Correa and C.A. Vandevoort. 2009. Rhesus monkey sperm cryopreservation with TEST-yolk extender in the absence of permeable. Cryobiology, 58: 20-27.
12. Douard, V., D. Hermier, M. Magistrini, C. Labbe and E. Blesbois. 2004. Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology, 61: 1-13.
13. Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworth, Sydney. 194 pp.
14. 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: 24-518.
15. Forouzanfar, M., M. Fazilati, F.Moulavi, M. Hajian S.A. Salehi, A. Rabiei and M.H. Nasr-Esfahani. 2009. Investigation of different glycerol and Egg Yolk concentration on freezing Bakhtiari Ram Semen. Journal of Iranian Anatomical Sciences, 5: 17-25. (In Persian)
16. Foulkes, J.A., D. Sweasey and R.G. Goodey. 1980. Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. Journal of Reproduction Fertility, 60: 165-169.
17. Gil, J., N, Lundeheimb, L, Söderquista and H. Rodríguez-Martínez. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology, 59: 1241-1255.
18. Holt, W.V., M.F. Head and R.D. North. 1992. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. Biology of Reproduction, 46: 1086-1094.
19. Jafari, Ahangari,Y. 2010. Breeding of Sheep. Published by Hammihan, 205 pp. (In Persian)
20. Jafari, Ahangari,Y., M. Ahmadi Hamedani and S.R. Hassani. 2010. Effect of various concentrations of egg yolk on Dallagh ram semen characteristics at 5^0C. Proceedings of the 28th Biennial Conference of the Australian Society of Animal Production. 88 pp. (In Persian)

Archive of SID

www.SID.ir

20. Jafari, Ahangari,Y., M. Ahmadi Hamedani and S.R. Hassani. 2010. Effect of various concentrations of egg yolk on Dallagh ram semen characteristics at 5^0C. Proceedings of the 28th Biennial Conference of the Australian Society of Animal Production. 88 pp. (In Persian)
21. Kuksis, A. 1992. Yolk lipids. Biochimy Biophysic Acta, 25: 22-205.
22. Latifian, F. 1998. Cryopreservation Of Bull Semen In Treated Semi- Skimmed Milk. M.Sc. Thesis. Islamic Azad University, Isfahan Branch, 163 pp.
23. MacDonald, B.J. and J.A. Foulkes. 1981. A spectrofluorometric investigation,using 1-anilinonaphthalen-8-sulphonate, of the interaction between washed bovine spermatozoa and seminal plasma or egg-yolk lipoprotein. Journal of Reproduction Fertility, 63: 407-414.
24. Marco-Jime´nez, F., S. Puchades, E. Moce, M.P. Viudes-de-Cartro, J.S. Vicente and M. Rodriguez. 2004. Use of powdered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. Reproduction of Dominant Animal, 39: 438-441.
25. Maxwell, W.M.C. and C. Stojanov. 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. Reproduction of Fertility Development, 8: 1013-1020.
26. Molinia, F.C., A.G. Evansa and W.M.C. Maxwell. 1994. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing Ram spermatozoa. Theriogenology, 42: 849-858.
27. Ollero, M., R. Perez-Pe, T. Muiño-Blanco and J.A. Cebrian-Perez. 1998. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. Cryobiology, 37:1-12.
28. Purdy, P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research, 6: 215-225.
29. Pursel, V.G.L., A. Johnson and L.L. Sci-iulman. 1972. Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. Journal of Animal Science, 37: 528-531.
30. Quinn, P.J., P.Y. Chow and I.G. White. 1980. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. Journal of Reproduction Fertility, 60: 403-407.
31. Rijsselaere, T., A.V. Soom, G. Hoflack, D. Maes and A. deKruif. 2004. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer. Theriogenology, 62: 1292-1306.
32. Salamon, S. and W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science, 62: 77-111.
33. Salamon, S. and W.M.C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination (review). Animal Reproduction Science, 37: 185-249.
34. SAS. 2001. Users Guide Statistics, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
35. Soleymani, A. 2000. Study the Possibility of Freezing Semen of Baluchi Ram Using Different Extender. M.Sc. Thesis. Islamic Azad University, Isfahan Branch, 110 pp.
36. Sonmez, M. and E. Demirci. 2004. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportion of glycerol. Turkish Journal of Veterinary Animal Science, 28: 893-899.

Archive of SID

www.SID.ir

37. Vishwanath, R., P. Shannon and B. Curson. 1992. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm Animal Reproduction Science, 29: 185-194.
38. Vorlov, L., E. Sieglov, R. Karp kov and V. Kopfiiva. 2001. Cholesterol content in eggs during the laying period. Acta Veterinary Brno, 70: 387-390.
39. Watson, P.F. and I.C. Martin. 1975. Effect of egg yolk, glycerol and the freezing on viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. Australian Journal of Biological Sciences, 28: 153-159.
40. Wei-Ping, Y., Z. Xiao-Jun and H.U. Yu-Mei. 2009. Comparison on content of cholesterol from different kinds of eggs in the yolks. Animal Husbandary and feed Science, 6-71.
41. Zamiri, M. 2008. Reproductive Physiology. Published by Haghshenas, 448 pp. (In Persian)

Archive of SID

www.SID.ir

The Effect of Various Levels of Egg Yolk on Quality of Zel Ram Spermatozoa in Cooling and Freezing Conditions

Mahnaz Ahmadi Hamedani[1], Yusef Jafari Ahangari[2] and Saeid Zerehdaran[3]

1- Graduated M.Sc., Gorgan Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding author: mahmadih@yahoo.com)
2- Associate Professor, Gorgan Agricultural Sciences and Natural Resources University
3- Associate Professor, Ferdowsi University of Mashhad
Received: November 3, 2010 Accepted: June 21, 2011

Abstract

The objective of this study was to investigate the effect of different levels of egg yolk on quality of Zel ram spermatozoa in pre and post freezing conditions. Semen samples were collected from 4 healthy and mature rams using an electro-ejaculator and suitable samples were mixed with Tris extender in a ratio of 1:4 semen and samples were assessed, after cooled to 5^{-0}C. Then, 0.5 ml of straws were filled with diluted semen. At first, straws were frozen on liquid nitrogen vapor, then kept in liquid nitrogen and after 10 days straws were thawed to investigation of morphological characteristics, viability, motility and progressive motility of spermatozoa. This experiment was carried out on the basis of completely randomized design with 3 treatments include levels of egg yolk 10, 15 and 20% and 9 replications. Results showed that the effect of egg yolk on viability, motility, progressive motility, normal spermatozoa and recovery percentage of spermatozoa were not significant (P>0.05), but the higher quality of spermatozoa and supply of energy source given in 20% egg yolk for lifespan, despite the absence of significant, if price of egg yolk is economical, 20% egg yolk can be used in Tris extender for maintaining and long term storage of Zel ram spermatozoa.

Keywords: Sperm quality, Egg yolk, Zel ram

Archive of SID

www.SID.ir