اثر آلبومین گاوی بر ویژگی‌های کیفی مایع منی بز مهابادی پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی

حمیدرضا نائیجیان[۱*]، حمید کهرام[۲] و احمد زارع‌شحنه[۳]

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۵

خلاصه

هدف از این پژوهش، مطالعه اثر غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در رقیق‌کننده پایه تریس- زرده تخم‌مرغ- فروکتوز (همراه با ۵ درصد گلیسرول) اسپرم‌ها، پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی بود. نمونه‌های منی توسط واژن مصنوعی از ۴ رأس بز نر بالغ، هفته‌ای ۲ بار جمع‌آوری شد. نمونه‌های منی رقیق شده در معرض بخار ازت منجمد و در تانک حاوی ازت مایع ذخیره شدند. یخ‌گشایی پایوت‌های حاوی اسپرم در آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. تحرک و تحرک پیشرونده اسپرم با کمک سیستم آنالیز رایانه‌ای اسپرم اندازه‌گیری شد. سلامت غشاء، درصد اسپرم‌های زنده، مورفولوژی وحالت آکروزومی اسپرم‌ها نیز اندازه‌گیری شد. داده‌های حاصل این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی و بر اساس مدل آماری $y_{ijk}= \mu+a_i+e_{ij}$ صورت گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که، رقیق‌کننده اسپرم بز حاوی ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیترآلبومین سرم گاوی در مقایسه با گروه شاهد موجب بهبود در میزان تحرک، تحرک پیشرونده و اسپرم‌های زنده می‌شود ($p<۰/۰۵$). سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی اثرمعنی‌داری روی سلامت غشاء، مورفولوژی و حالت آکروزوم اسپرم‌ها نداشتند ($p>۰/۰۵$). مطابق با نتایج این پژوهش به نظر می‌رسد که افزودن سطوح ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم آلبومین سرم گاوی به رقیق‌کننده‌های انجماد اسپرم بز مهابادی باعث بهبود معنی‌دار پارامترهای اسپرم از جمله تحرک و درصد اسپرم‌های زنده می‌شود.

کلمات کلیدی: آلبومین گاوی، مایع منی منجمد شده، بز مهابادی

مقدمه

انجماد منی پستانداران، تحولی اساسی در نگهداری منی و حفاظت از انجماد سلول اسپرم به وجود آورده و راهی برای حفظ پروتوپلاسم سلول جنسی می‌باشد که می‌تواند با حفظ DNA گونه‌ها، در دامپروری، آبزی‌پروری و حفظ تنوع زیستی کاربرد زیادی داشته باشد و بانک‌های ذخیره اسپرم می‌توانند همراه با دیگر تکنولوژی‌های تولیدمثلی، در بهبود نژادها و حفاظت گونه‌های وحشی و بومی درحال انقراض، نقش مهمی داشته باشند. همچنین با انجماد اسپرم، امکان قرنطینه کردن آن، انتقال به فاصله‌های خیلی دور، کنترل بیماری‌ها و حفظ بانک‌های ژنتیکی ممکن می‌گردد. با استفاده از انجماد اسپرم‌ها و تکنیک‌های تولیدمثلی، بسیاری از مشکلات باروری حیوانات آزمایشگاهی، دامی و انسانی قابل حل می‌باشد (Leboeuf et al. 2000). به طور کلی، کیفیت اسپرم یخ‌گشایی شده از روی فاکتورهای مهمی مانند تحرک (Purdi 2006)، درصد اسپرم‌های زنده و سلامت آکروزوم آنها ارزیابی می‌شود. در زمان انجماد سلول‌های اسپرم، عوامل متعددی مانند؛ پلاسمای منی، ترکیب شیمیایی رقیق‌کننده، نوع و غلظت حفاظت‌کننده‌های انجمادی، دمای نگهداری، میزان سردسازی، دوره متعادل‌سازی، روش انجماد و یخ‌گشایی، گروه‌های واکنش اکسیژنی (ROS) و تعادل بین این عوامل می‌تواند بر

[۱*] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
E-mail: hamid_naijian@ut.ac.ir (نویسنده مسئول)
[۲] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
[۳] استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

کیفیت اسپرم‌های منجمد مؤثر باشد (Leboeuf et al. 2000). آلبومین سرم گاوی می‌تواند اسپرم‌ها را در برابر آسیب شوک سرمایی در زمان فرایند ذوب شدن محافظت نماید (Choi et al. 2003). مطالعات نشان می‌دهد که آلبومین سرم گاوی می‌تواند میزان تحرک و درصد اسپرم‌های زنده قوچ را در رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰ و ۱۵ درصد آلبومین سرم گاوی به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش دهد. آلبومین به عنوان یک ملکول درشت می‌تواند به غشاء پلاسمایی اسپرم وارد شده و علاوه بر افزایش پایداری غشاء به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مانع پرکسیداسیون لیپیدهای غشایی گردد (Matsuoka et al. 2006). آزمایشات مختلف نشان می‌دهد که آلبومین سرم گاوی سبب کاهش میزان پرکسیداسیون لیپیدی اسپرم‌های خرگوش گردیده است. بنابراین آلبومین می‌تواند به عنوان یک محافظت کننده اسپرم‌ها در حالت انجماد عمل نماید (Crabo et al. 1972). یکی از مهمترین خصوصیات آلبومین سرم گاوی این است که به عنوان حذف کننده یا مهار کننده رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط واکنش اکسیژنی و واکنش‌های اکسیداتیوی فعالیت می‌نماید و باعث افزایش استحکام غشای سلول‌های اسپرمی از پرکسیداسیون لیپیدی و شوک حرارتی در طول فرایند انجماد و یخ‌گشایی منی عمل می‌کند (Kreider et al. 1985). نظر به اینکه از ترکیب سطوح مختلف این آنتی‌اکسیدان در انجماد اسپرم بز استفاده نشده است، هدف از این پژوهش بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در فرآیند نگهداری اسپرم به صورت منجمد و تاثیر آن بر پارامترهای مربوط به منی بز مهابادی می‌باشد.

مواد و روش کار

در این تحقیق از منی ۴ رأس بز نژاد مهابادی استفاده گردید. بزهای نر با سن ۴-۳ سال (متوسط وزن ۵۰-۶۵ کیلوگرم) در ایستگاه پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (واقع در جنوب غربی کرج) نگهداری شدند. جمع‌آوری منی بزهای آموزش دیده به صورت هفته‌ای ۲ بار و در فصل غیرتولید مثلی (اواخر خرداد تا اواسط تیر ماه) صورت گرفت. منی‌های جمع‌آوری شده بلافاصله به آزمایشگاه مرکز اصلاح نژاد دام کشور منتقل گردید و بررسی‌های اولیه روی منی انجام گردید. نمونه‌های منی به وسیله مهبل مصنوعی از بزهای مورد آزمایش جمع‌آوری شدند. برای جلوگیری از ایجاد شوک سرمایی به اسپرم‌ها، نمونه‌های منی تا زمان انتقال به آزمایشگاه، درون آب $37^{\circ}C$-۳۵ نگهداری و پس از اتمام نمونه‌گیری به سرعت، به آزمایشگاه منتقل و در آب گرم با دمای $37^{\circ}C$ قرار داده شدند. حجم انزال‌ها بین ۰/۷۵ تا ۲ میلی‌لیتر، میزان غلظت به طور متوسط $2/5\times10^{9}$ اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک بیشتر از ۷۰ درصد و تعداد اسپرم غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد، در هر انزال به عنوان اسپرم طبیعی محاسبه گردید. از نمونه‌های منی هر دام به یک مقدار مساوی در یک لوله آزمایش مجزا ریخته و با توجه به احتمال اثرات متقابل بین نمونه‌ها، نمونه‌های منی با هم مخلوط شده و این نمونه‌های مخلوط شده نیز از نظر رنگ و تحرک تقریبی ارزیابی مجدد گردید، تا از سلامت نمونه برای انجماد اطمینان حاصل شود. برای ساخت رقیق‌کننده از یک محیط بر پایه تریس استفاده گردید. محیط پایه مورد استفاده شامل تریس (۳۰/۷ گرم در لیتر)، سیتریک اسید (۱۶/۴گرم در لیتر)، فروکتوز (۱۲/۶گرم در لیتر)، زرده تخم‌مرغ (۱۵٪)، مقدار گلیسرول ۵ درصد (V/V) و جنتامایسین (۰/۶ گرم/لیتر) بود. اسمولاریتی محیط پایه ۴۲۵ میلی‌اسمولار و pH آن ۶/۸ تنظیم شد. تیمارهای آزمایشی حاوی ۵ سطح (۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) آلبومین سرم گاوی بوده‌اند. رقیق‌کننده بدون آلبومین سرم گاوی به عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت (Bucak et al. 2009).

انجماد

برای انجماد، ابتدا نمونه‌های آزمایشی در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری بسته‌بندی شده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از طی دوره تعادل، پایوت‌ها در فاصله ۴ سانتی‌متری به مدت ۱۵ دقیقه در معرض بخار ازت مایع منجمد و سپس در ازت مایع غوطه‌ور شده و برای نگهداری به تانک ازت منتقل شدند (Bucak et al. 2007).

ذوب منی

برای ذوب منی، پس از خارج کردن پایوت‌های حاوی منی از ازت، پایوت‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه در داخل آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده وسپس پایوت‌ها به داخل لوله‌های اپندورف تخلیه شدند (Ijaz et al. 2009).

ارزیابی اسپرم‌ها پس از ذوب شدن

تحرک

اولین پارامتر ارزیابی در این تحقیق بررسی تحرک اسپرم پس از ذوب شدن بود. به این منظور ۳ پایوت از هر گروه تیماری با روشی که در بالا توضیح داده شد ذوب شده و به داخل لوله‌های اپیندورف انتقال داده شدند. سپس با استفاده از سمپلر متغیر و با برداشتن ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام و گذاشتن یک لامل تمیز روی آن، لام مورد نظر با استفاده از سیستم آنالیز اسپرم کامپیوتری (CASA) بررسی شد. پس از بررسی نمونه‌های اسپرم به وسیله نرم‌افزار CASA، میزان تحرک اسپرم‌ها ثبت گردید. در این آزمایش پارامترهای ارزیابی تحرک مانند درصد کل اسپرم‌های متحرک و درصد اسپرم‌های پیش‌رونده محاسبه گردید (Bucak et al. 2010).

سلامت غشاء

در این مطالعه برای بررسی سلامت غشاء اسپرم‌ها از محلول هیپواسموتیک استفاده شد. محیط هیپواسموتیک بر اساس اسمولاریتی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. در این آزمایش از محیط با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی‌اسمولار استفاده گردید. فشار اسمزی طبیعی برای اسپرم‌های بز ۴۲۵ میلی‌اسمولار در لیتر می‌باشد. بنابراین اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به سرعت واکنش نشان می‌دهد. واکنش اسپرم‌ها به محیط هیپواسمول به صورت تورم دم می‌باشد. در این حالت اسپرم‌هایی که غشاء پلاسمایی سالمی دارند به محلول واکنش داده ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. در واقع پس از انجام این تست اسپرم‌های با دم گره خورده به عنوان اسپرم‌های زنده و اسپرم‌هایی که دم آنها صاف است به عنوان اسپرم مرده تلقی می‌شوند. در تحقیق حاضر آزمایش تورم هیپواسمتیک مطابق با روش Revell و Mrode (۱۹۹۴) انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از اسپرم ذوب شده با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هیپواسموتیک که حاوی فروکتوز (۹گرم در لیتر) و سیترات سدیم (۴/۹گرم در لیتر) بود مخلوط گردید سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل ۳ قطره (۱۰µl) از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. بررسی میکروسکوپی با استفاده از یک صفحه داغ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ صورت گرفت. در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های دارای غشای یک‌پارچه محاسبه شد (Holt 2000, Purdi 2006).

رنگ‌آمیزی حیاتی

برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین- نیگروزین استفاده گردید. مواد تشکیل دهنده این محیط شامل رنگ ائوزین (۱۶/۷گرم در لیتر)، رنگ نیگروزین (۱۰۰ گرم در لیتر) و سیترات سدیم (۲۹گرم در لیتر) می‌باشد. اساس این رنگ‌آمیزی بدین صورت است که رنگ ائوزین به داخل اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند در حالی که اسپرم‌های زنده

رنگ نمی‌گیرند. برای انجام این رنگ‌آمیزی، ۲۰µl از نمونه اسپرم را برداشته و روی لام قرار گرفت (۱۰). ۲۰µl از رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین برداشته و روی نمونه ریخته و با سر سمپلر به آرامی نمونه را هم‌زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ۳۰ ثانیه ۲۰µl از نمونه را برداشته و بر گوشه لام دیگری گذاشته و با یک لام دیگر روی لام به آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن، لام را زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ قرار داده و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کم رنگ به خود گرفته یا تنها بخشی از گردن آنها رنگ گرفته بود به عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شد (Evans and Maxwell 1987).

مورفولوژی

برای ارزیابی اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱ سی‌سی محلول هانکوک که شامل فرمالین ۳۷٪ (۶۲/۵ میلی‌لیتر)، محلول سالین (۱۵۰ میلی‌لیتر)، محلول بافر (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دو بار تقطیر (۵۰۰ میلی‌لیتر) می‌باشد، افزوده شده و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شده و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوا زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه شده است. میانگین سه مشاهده به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شده است (Schafer and Holzmann 2000).

آزمایش ارزیابی آکروزوم

ارزیابی آکروزوم بعد از فرایند ذوب شدن از این جهت بسیار مهم است که آسیب‌های ناشی از فرایند ذوب ممکن است واکنش آکروزوم را در بعضی از اسپرم‌ها تحریک کرده باشد و یا ناحیه آکروزوم آنها آسیب دیده باشد که در این صورت قادر به اتصال به تخمک نیستند و در نتیجه علی‌رغم داشتن تحرک، نابارور می‌باشند. برای ارزیابی حالت آکروزومی در اسپرم روش‌های متفاوتی وجود دارند که اساس اکثر آنها رنگ‌آمیزی با رنگ‌های فلورسنت می‌باشد. در تحقیق حاضر از روش اندازه‌گیری کلروتتراسایکلین فلورسنت استفاده شد که به روش CTC معروف است. انجام این تست مطابق با روش Perez و همکاران در سال ۱۹۹۶ صورت گرفت. برای رنگ‌آمیزی کلروتتراسایکلین به ۳ محلول نیاز است. محلول CTC که حاوی کلروتتراسایکلین، تریس، سدیم کلراید و سیستئین است و مقادیر آنها در جدول ۱ گزارش شده‌اند. محلول دوم در این رنگ‌آمیزی، محلول Fixing است که شامل گلوتارآلدهید ۱ درصد در بافر تریس می‌باشد. این محلول محدودیت زمانی ندارد و می‌توان از آن برای مدت طولانی استفاده نمود. این محلول نیز مانند محلول CTC باید دارای pH ۷/۴ باشد. محلول سوم که محلول Mounting می‌باشد شامل ۰/۲۲M تری‌اتیلن‌دی‌آمین در یک محیط حاوی ۱۰ درصد فسفات بافر سالین و ۹۰ درصد گلیسرول است. اولین قدم در رنگ‌آمیزی، آماده‌سازی اسپرم است. منی پس از ذوب حاوی پلاسمای منی و رقیق‌کننده می‌باشد که می‌تواند مانع از تاثیر رنگ روی اسپرم شود. بنابراین خارج کردن پلاسمای منی و رقیق‌کننده بسیار مهم می‌باشد. به منظور حذف پلاسمای منی و رقیق‌کننده، پس از ذوب منی محتوی رقیق‌کننده ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ، در ۱۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از حذف مایع رویی و به منظور شستشوی مجدد، مقدار ۳ میلی‌لیتر محلول فسفات بافر سالین به لوله اضافه شد و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی حذف شد و پلت به ترتیب زیر رنگ‌آمیزی شد (Perez et al. 1996).

۱- ۲۰ میکرولیتر از محلول CTC در یک اتاق تاریک روی لام قرار داده شد. نور رنگ فلورسنت را از بین می‌برد.

۲- ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم را به آرامی به محلول CTC روی لام اضافه نموده و سریعاً با استفاده از نوک سمپلر با محلول CTC مخلوط شد.

۳- ۱۵ ثانیه بعد از مخلوط شدن سوسپانسیون اسپرم با محلول CTC، ۵ میکرولیتر از محلول Fixing را به آن اضافه نموده و با نوک سمپلر به آرامی مخلوط شد.

۴- بعد از مخلوط شدن کامل محلول Fixing با مخلوط اسپرم و محلول CTC، ۳ میکرولیتر از محلول Mounting به آن اضافه شد.

۵- یک لامل بزرگ روی آن قرار داده و سپس لام و لامل را بین دو دستمال کاغذی فشار داده تا مایعات اضافی خارج شود و اسپرم‌ها در یک لایه قرار گیرند سپس دور تا دور لام و لامل را با لاک ناخن پوشانده و در جای تاریک در ^{o}C ۴ قرار داده شد. تمامی لام‌های رنگ‌آمیزی شده حداکثر تا ۲ ساعت پس از رنگ‌آمیزی خوانده شد. با استفاده از بررسی‌های میکروسکوپ فلورسنت، سه الگوی فلورسانت در اسپرم‌ها قابل مشاهده است:

الگوی F: فلورسانت روشن در کل سر یا تنها در ناحیه بعد از آکروزوم (اسپرم ظرفیت‌یابی نشده).

الگوی B: فلورسانت روشن تنها در ناحیه آکروزوم (اسپرم ظرفیت‌یابی شده).

الگوی AR: بدون فلورسانت در ناحیه سر و یا تنها فلورسانت در ناحیه استوایی (واکنش آکروزومی شده).

از هر تیمار حد اقل ۳ لام تهیه شد و حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر لام با درشت‌نمایی ۴۰ میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند.

جدول ۱: اجزای مواد تشکیل دهنده محیط CTC جهت ارزیابی حالت آکروزومی

مواد	مقدار (میلی‌مولار)
تریس	۲۰
سدیم کلراید	۱۳۰
ال سیستئین	۵
کلروتتراسایکلین فلورسنت	۰/۷۵
PH	۷/۴

تحلیل آماری

این آزمایش ۵ مرتبه تکرار شد. داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی و بر اساس مدل‌های آماری زیر به کمک رویه Proc GLM نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین‌ها به روش دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند.

$$y_{ijk}= \mu + a_i + e_{ij}$$

نتایج

نتایج صفات تولید مثلی در جدول ۲ نشان داده شده است، رقیق‌کننده حاوی سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی نسبت به شاهد باعث تغییر صفات تحرک، تحرک پیشرونده و درصد اسپرم‌های زنده پس از انجماد و یخ‌گشایی می‌شود. در بین غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی سطوح ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم باعث افزایش معنی‌دار در میزان تحرک، درصد اسپرم‌های پیشرونده و اسپرم‌های زنده در مقایسه با گروه شاهد و سایر غلظت‌های آلبومین سرم گاوی شده است ($p<۰/۰۵$). همچنین نتایج حاصل از آنالیز داده‌های آزمایش یکپارچگی غشاء و مورفولوژی نشان می‌دهد که هیچ اختلاف معنی‌داری در بین هیچ یک از غلظت‌های آلبومین سرم گاوی مشاهده نشده است ($p>۰/۰۵$).

جدول ۲: اثر آلبومین سرم گاوی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بر ویژگی‌های کیفی منی بز مهابادی پس از انجماد- یخ‌گشایی

صفات تولید مثلی (درصد)	شاهد (۰)	۲/۵	۵	۱۰	۱۵	۲۰	سطح معنی‌داری	SEM
تحرک	۴۶/۲۰^{c}	۴۹/۰۰^{bc}	۴۹/۸۰^{bc}	۵۵/۴۰^{a}	۵۳/۴۰^{ab}	۴۷/۴۰^{c}	۰/۰۵	۱/۸۱
پیشرونده	۲۳/۶۰^{b}	۲۷/۰۰^{b}	۲۷/۲۰^{b}	۳۳/۴۰^{a}	۲۸/۴۰^{ab}	۲۵/۰۰^{b}	۰/۰۵	۱/۸۰
اسپرم زنده	۵۱/۶۰^{c}	۵۳/۲۰^{c}	۵۴/۸۰^{bc}	۶۳/۸۰^{a}	۶۰/۶۰^{ab}	۵۴/۸۰^{bc}	۰/۰۵	۲/۰۷
سلامت غشاء	۴۳/۸۰	۴۵/۸۰	۴۵/۸۰	۴۷/۸۰	۴۶/۶۰	۴۵/۴۰	۰/۷۹	۱/۹۲
اسپرم ناهنجار	۲۵/۸۸	۲۲/۶۲	۱۹/۷۲	۲۰/۷۸	۲۰/۵۲	۱۹/۷۲	۰/۲۰	۱/۸۹

حروف بالانویس غیر مشابه نشان دهنده تفاوت میانگین سطوح (با سطح احتمال ۵ درصد) در هر ردیف می‌باشد.

نتایج میانگین الگوهای آکروزومی اسپرم پس از ذوب با استفاده از رنگ‌آمیزی کلروتتراسایکلین در جدول ۳ نشان داده شده است. مقایسه الگوهای F، B و AR در بین تیمارهای آزمایشی نشان داد که غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی در محیط انجماد اسپرم تاثیری روی حالت آکروزومی اسپرم‌ها نداشته است و اختلاف بین هیچ‌کدام از تیمارها از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (p>۰/۰۵).

جدول ۳: اثر آلبومین سرم گاوی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) برحالت آکروزومی اسپرم منجمد بز مهابادی پس از یخ‌گشایی

تیمار	الگوهای آکروزومی		
	F	B	AR
شاهد	۱۶/۰۳	۶۲/۲۷	۲۱/۷۰
۲/۵	۱۷/۰۷	۶۳/۳۲	۱۹/۶۱
۵	۱۷/۱۰	۶۴/۴۴	۱۸/۴۶
۱۰	۱۸/۰۹	۶۴/۵۲	۱۷/۳۹
۱۵	۱۸/۰۶	۶۴/۴۶	۱۷/۴۸
۲۰	۱۷/۰۶	۶۳/۸۲	۱۹/۱۲

بحث

تحرک، درصد اسپرم زنده و سلامت آکروزوم اسپرم فاکتورهای تعیین کننده در کیفیت اسپرم پس از ذوب می‌باشند (Holt et al. 2000). تنش‌های ناشی از فرآیند ذوب می‌توانند باعث آسیب‌های متعددی در ساختار اسپرم شوند که در نتیجه آن غشای پلاسمایی، سیتوپلاسم و نیز ساختار ژنومی اسپرم‌ها به شدت آسیب می‌بیند و در نهایت می‌تواند باعث کاهش سلامت غشای پلاسمایی و آکروزومی، تحرک، باروری و تعداد اسپرم‌های زنده شود (Leboeuf et al. 2000). آلبومین سرم گاوی به عنوان یک بخش رقیق کننده در فرآیند انجماد می‌تواند کریستاله شدن آب درون سلولی در اسپرم را در مراحل مختلف ذوب شدن کاهش دهد (Usal and Bucak 2007). آلبومین در مطالعات مختلفی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان که ساز و کارهای آن هنوز شناخته نشده است مورد بررسی قرار گرفته است و ثابت شده است که می‌تواند مانع از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی گردد. در تحقیق حاضر مشاهده گردید که سطوح ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم آلبومین سرم گاوی در رقیق‌کننده‌های انجماد بز می‌تواند به طور معنی‌داری باعث بهبود کیفیت اسپرم بز پس از فرایند ذوب گردد. نتایج این آزمایش با گزارش ماتسوکا و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد، آنها اثر سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی روی انجماد اسپرم قوچ را بررسی کردند و مشاهده کردند که میزان تحرک پیشرونده در سطوح ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم نسبت به سایر سطوح بالاتر می‌باشد (Matsuoka et al. 2006). همچنین هیداکی و همکاران (۲۰۰۶) اثرات سطوح مختلف آلبومین در اسپرم بز را بررسی کردند و مشاهده کردند که میزان آلبومین در سطح ۵ درصد به طور معنی‌داری سبب بهبود تحرک و سلامت آکروزم می‌گردد و پیشنهاد دادند که ممکن است

سطوح بالاتر از ۵ درصد باعث ایجاد پاسخ بهتری می‌گردد. این پیشنهاد با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. با این حال نتایج حاصل از مطالعه حاضر با مطالعات دیگر تفاوت‌هایی دارد. مثلاً در تحقیقی که اثر سطوح مختلف آلبومین بر کیفیت اسپرم قوچ بررسی شد، گزارش داده شده است که بیشترین میزان تحرک و اسپرم زنده در تیمار ۲۰ درصد آلبومین سرم گاوی مشاهده شد (Usal and Bucak 2007). این درحالی بود که مطالعه مذکور در فصل تولیدمثلی انجام گردیده و رقیق‌کننده حاوی ۱۰ درصد زرده تخم مرغ بود. آزمایش‌ها نشان می‌دهند که cAMP نقش مهمی در تحرک دم اسپرم دارد و احتمالاً آلبومین سرم گاوی از طریق فسفریلاسیون پروتئین تایروزین روی تحرک سلول‌های اسپرم عمل می‌نماید (Dow and Bavister 1989). در گزارش دیگری آمده است که ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی در بافر یون فسفات پتاسیم، باعث تحرک رو به جلوی اسپرم اپیدیدیمی خرگوش شده که دلیل جلوگیری از کاهش تحرک را به بازدارندگی پراکسیداسیون لیپیدها توسط آلبومین سرم گاوی نسبت دادند (Alvarez and Storey 1983). آزمایشات دیگر نشان می‌دهد که محیط‌های حاوی آلبومین سرم گاوی بهتر از محیط‌های فاقد آلبومین سرم گاوی باعث بهبود درصد تحرک و میزان تحرک پیشرونده اسپرم‌های اسب می‌گردد (Klem et al 1986).

در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شده است که آلبومین سرم گاوی با تغییر در ترکیب لیپیدهای غشای سلولی، به ویژه با کاهش نسبت کلسترول به فسفولیپید در غشای پلاسمایی اسپرم منجر به نفوذپذیری یون‌های کلسیم به درون غشای پلاسمایی اسپرم شده و در نتیجه منجر به شروع واکنش آکروزومی و مرگ اسپرم می‌گردد (Usal and Bucak 2007). همچنین طی تحقیقی دیده شده است که ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی در اسپرم اسب موجب کاهش نفوذپذیری غشاء شده است (Choi et al 2003). اما آن چه که لازم است اشاره شود این است که آلبومین سرم گاوی در غلظت‌های بالا ممکن است از طریق بروز لیپید پراکسیداسیون و نفوذپذیر کردن غشاء، موجب کاهش اسپرم‌های زنده و متحرک شده که پایین بودن کیفیت اسپرم در سطوح بالاتر از ۱۰ و ۱۵ درصد، ممکن است به این دلیل بوده باشد (Kreider et al. 1985). لذا در این خصوص بایستی تحقیقات بیشتری درباره اثر آلبومین سرم گاوی با در نظر گرفتن مکانیسم اثر آن در بروز لیپید پراکسیداسیون صورت گیرد (Harrison et al. 1982, Dow and Bavister 1989).

نتیجه‌گیری کلی

افزودن آلبومین سرم گاوی در سطح ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در رقیق‌کننده بر پایه تریس باعث بهبود معنی‌دار کیفیت اسپرم بز مهابادی بعد از فرایند ذوب شدن می‌شود.

منابع

Alvarez J.O. and Storey B.T. (1983). Taurine, hypotaunne, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. Biological Reproduction, 29: 548-555.

Bakst M.R. and Cecil H.C. (1992). Effect of bovine serum albumin on motility and fecundity of turkey spermatozoa before and after storage. Journal of Reproduction and Fertility, 94: 287-293.

Bucak M.N., Atessahin A., Varıslı O., Yuce A., Tekin N. and Akcay A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine andhyaluronan on ram semenMicroscopic and oxidative stress parameters afterfreeze–thawing process. Theriogenology, 67:1060–1067.

Bucak M.N., Sarıözkan S., Tuncer P.B., Sakinand F. and Kulaksız R. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircusancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. Small Ruminant Research, 89: 24-30.

Bucak M.N., Tuncer P.B., Sarıözkan S., Ulutas P.A., Çoyan K., Baspınar N. et al. (2009). Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. Research in Veterinary Science, 87: 468–472.

Choi Y.H., Landim-Alvarenga F.C., Seidel G.E. and Squires E.L. (2003). Effect of capacitation of stallion sperm with polyvi-nylalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine zona-free or partially zona-removed equine oocytes. Journal of Animal Science, 81: 2080–2087.

Crabo B.G., Brown K.I. and Graham E.F. (1972). Effect of some buffers on storage and freezing of boar spermatozoa. Journal of Animal Science, 35: 377–382.

Dott H.M., Harrison R.A. and Foster G.C. (1979). The maintenanceof motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal andepididymal plasma. Journal of Reproduction and Fertility, 55: 113–124.

Dow M.P.D. and Bavister B.D. (1989). Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation in vitro. Gamete Research, 23: 171-180.

Evans G. and Maxwell W.M.C. (1987). Handling and examination semen. In:Maxwell WMC, editor. Salamon's artificial insemination ofsheep and goat. Sydney: Butterworths, PP: 93–106.

Harrison R.A.P. Dott H.M. and Foster G.C. (1978). Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simplemedium. Journal of Reproduction and Fertility, 52: 65-73.

Harrison R.A.P. Dott H.M. and Foster G.C. (1982). Bovine serum albumin, sperm motility and the dilution effect. Journal experimental Zoology, 222: 81-88.

Holt W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science, 62: 3-22.

Ijaz A., Hussain A., Aleem M., Yousaf M.S. and Rehman H. (2009). Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-ravi buffalo. Theriogenology, 71:1326-1329.

Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P. and Maxwell W.M. (2000). Storage of boar semen. Animal Reproduction Science, 62: 143–172.

Klem M.E., Kreider J.L., Pruitt J.B. and Potter G.D. (1986). Motility and fertility of equine spermatozoa extended in bovine serum albumin and sucrose. Theriogenology, 26: 569-576.

Kreider J.L., Tindall W.C. and Potter G.D. (1985). Inclusion of bovine serum albumin in semen extenders to enhance maintenance of stallion sperm viability. Theriogenology, 23: 399-408.

Leboeuf B., Restall B. and Salamon S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. Animal Reproduction Science, 62: 113-141.

Matsuoka T., Imai H., Kohno H. and Fukui Y. (2006). Effects of bovine serum albumine and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. Journal of Reproduction and Development, 52: 675-83.

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

Neill J.M. and Olds-Clarke P. (1987). A computer-assisted assay for mouse sperm hyperacti-vation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. Gamete Research, 18: 121-140.

Paulenz H., Soltun K., Adnoy T., Berg K.A. and Soderquist L. (2005). Effect of different extenders on sperm viability of buck semen stored at room temperature. Small Ruminant Research, 59: 89–94.

Perez L.J., Valcarcel A., Heras M.A., Moses D.F. and Baldassarre H. (1996). In vitro capacitation andinduction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. Theriogenology, 45: 1037–46.

Purdi P.H. (2006). A review on goat cryopreservation. Small Ruminant Research. 63, 215-225.

Pursel V.G. and Graham E.F. (1967). Phospholipids of bovine spermatozoa and seminal plasma. Journal of Reproduction and Fertility, 14: 203–211.

Revell S.G. and Mrode R.A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science, 36: 77–86.

Romero-Arredondo A. and Seidel G.E. (1994). Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. Theriogenology, 41: 383–394.

Schafer S. and Holzmann A. (2000). The use of transmigration and spermac stain toevaluate epididymal cat spermatozoa. Animal Reproduction Science, 59: 201–211.

Usal O. and Bucak M.N. (2007). Effects of oxidized glutathion, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. Acta Veterinary, 76: 383-390.

Usal O., Korkmaz T. and Tosun H. (2005). Effect of bovine serum albumine on freezing of canine semen. Indian Veterinary Journal, 82: 97-98.

The effect of bovine albumin on Mahabadi goat semen quality after freezing-thawing

Naijian H.R.[1], Kohram H.[2] and Zare Shahneh A.[3]

Received: 22.07.2012 Accepted: 25.12.2012

Abstract

The study was conducted to investigate the effects of various concentrations of bovine serum albumin (0, 2.5, 5, 10, 15 and 20 mg/ml) in extenders based on tris and egg yolk on the Mahabadi goat spermatozoa after freezing-thawing. Semen samples were collected by an artificial vagina, twice a week from four matured goat. The extender containing semen was frozen in liquid nitrogen and then was store until using for assessment. semen was thawed at 37°C and then motility and progressive motility were assessed by CASA. Membrane integrity, viability, morphology and acrosome status were assessed too. The results of this experiment showed that extender containing 10 and 15 mg bovine serum albumin significantly improved motility, progressive motility and viability compare to control treatment ($P<0.05$). Membrane integrity, morphology and acrosome status were not affected significantly by the different level of bovine serum albumin ($P>0.05$). It can be conclude that adding 10 and 15 mg bovine serum albumin in to goat extender is suitable for preservation of sperm and its fertility.

Key words: Bovine albumin, Frozen semen, Mahabadi goat

1- MSc Graduated in Animal Physiology, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3- Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran