علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۴ (ص ۱۳۹-۱۳۳)

اثر آلبومین سرم گاوی بر کیفیت اسپرم اسبچهٔ خزر طی سردسازی

وحید قدیمی[۱] و مهدی ژندی[۲*]
۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۱۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۲/۲۱)

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر آلبومین سرم گاوی در رقیق‌کنندهٔ منی اسبچه در شرایط سرد بود. نمونه‌های منی پس از جمع‌آوری با هم مخلوط و به چهار بخش مساوی تقسیم شدند. هر قسمت با یکی از رقیق‌کننده‌های زیر رقیق شد: ۱. رقیق‌کننده‌های فاقد آلبومین سرم گاوی (BSA-0)؛ ۲. رقیق‌کننده‌های حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA-5)؛ ۳. رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA-10) و ۴. رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA-15). پس از ۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی، اثر رقیق‌کننده‌های مختلف بر جنبایی، زنده‌مانی، فعالیت غشا و سطح مالوندی‌آلدهاید (MDA) ارزیابی شد. نتایج نشان دادند که جنبایی کل در ساعت ۴۸ در رقیق‌کننده‌های BSA-5 و BSA-10 در مقایسه با رقیق‌کننده‌های BSA-0 و BSA15 به‌طور معناداری بیشتر بود. رقیق‌کنندهٔ BSA-10 در مقایسه با رقیق‌کنندهٔ BSA-0 و BSA-15 به حفظ جنبایی پیش‌روندهٔ بالاتری منجر شد. فعالیت غشا در رقیق‌کنندهٔ BSA-15 در ساعت ۴۸ در مقایسه با سایر رقیق‌کننده‌ها به‌طور معناداری کاهش یافت. زنده‌مانی در رقیق‌کنندهٔ BSA-15 در مقایسه با سایر رقیق‌کننده‌ها به‌طور معناداری کاهش یافت. در نتیجه رقیق‌کنندهٔ BSA-15 در مقایسه با سایر رقیق‌کننده‌ها در ساعت ۴۸ اثر محافظتی کمتری بر جنبایی کل و فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم داشت.

واژه‌های کلیدی: **آلبومین سرم گاوی، اسبچهٔ خزر، اسپرم، سردسازی.**

مقدمه

در دهه‌های اخیر استفاده از منی سردشده در تلقیح مصنوعی اسب رو به افزایش است. منی ذخیره‌شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد، همانند منی تازه توانایی لقاح خود را حفظ می‌کند (Francl *et al.*, 1987)، اما به هنگام ذخیره‌سازی به مدت ۴۸ ساعت، جنبایی و نرخ باروری آن کاهش می‌یابد (Jasko *et al.*, 1992). در چند دههٔ اخیر، تنش اکسیداتیو در فراوری اسپرم به‌عنوان عاملی مهم در تخریب عملکرد شناخته شده است (Ball, 2008). با وجود این، محققان دریافته‌اند که اهمیت تنش اکسیداتیو در عملکرد اسپرم‌های طبیعی و غیرطبیعی بیشتر مشهود بوده است. مشخص شده است که رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در عملکرد طبیعی اسپرم دارد و احتمالاً عدم تعادل در تولید و حذف رادیکال‌های آزاد آثار تخریبی شدید بر اسپرم دارد (Cocchia *et al.*, 2011).

سلول‌های دارای تنفس هوازی، مواد و آنزیم‌های لازم برای واکنش اکسیداتیو را دارند با وجود این درصد آنزیم‌های دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی در اسپرم به‌نسبت کم است و در نتیجه این سلول‌ها

* تلفن: ۰۲۶-۳۲۲۴۸۰۸۲، ۰۹۱۲۷۶۸۸۰۵۱
E-mail: mzhandi@ut.ac.ir

مستعد واکنش‌های اکسیداتیو هستند (Foote *et al.*, 2002). آنتی‌اکسیدان‌ها به‌منظور کاهش تشکیل رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش طول عمر اسپرم به رقیق‌کنندهٔ منی اضافه می‌شوند (Aitken, 1995). در زمینهٔ تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر فراسنجه‌های اسپرم تاکنون پژوهش‌های بسیاری صورت گرفته است (Zhandi & Ghadimi, 2015; Ghadimi *et al*., 2014). در مطالعه‌ای گزارش شد که در بین آنتی‌اکسیدان‌های هیپوتائورین، تائورین، گلوتاتیون و گزانتارنیک اسید، تنها گزانتارنیک اسید در حفظ جنبایی اسپرم نریان طی ذخیره‌سازی در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت مؤثر بود (Denniston *et al.*, 2000). نشان داده شده است که آلبومین سرم گاوی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و قابلیت آمیخته‌شدن به تعدادی از رقیق‌کننده‌ها را دارد. همچنین در پژوهشی دیگر گزارش شد که تأثیرات این ماده با توجه به غلظت‌های آن متفاوت است، به‌طوری‌که اسپرم گاومیش در رقیق‌کنندهٔ حاوی ۱۰ و ۱۵ درصد BSA در مقایسه با مقدار ۰/۵، ۱ و ۵ درصد بیشترین جنبایی و زنده‌مانی را پس از سردسازی و فرایند یخ‌گشایی دارد (El-Kon, 2011). در نتیجه با توجه به اثر آنتی‌اکسیدانی آلبومین سرم گاوی (BSA) در نگهداری اسپرم در شرایط مختلف، هدف از این تحقیق بررسی تأثیرات افزودن BSA به رقیق‌کنندهٔ اسپرم اسبچهٔ خزر به‌منظور افزایش مدت‌زمان نگهداری اسپرم در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد با کمترین آسیب است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این آزمایش از ۳ سر اسبچهٔ خزر بالغ با میانگین سنی ۱۰-۸ سال استفاده شد که از جیرهٔ غذایی یکسان استفاده می‌کردند. اسبچه‌ها در مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور در کرج نگهداری می‌شدند.

جمع‌آوری اسپرم

نمونه‌ها دوبار در هفته و با استفاده از واژن مصنوعی مدل میسوری گرفته شد و به آزمایشگاه مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور انتقال داده شد و بخش ژل منی نریان‌ها با استفاده از فیلتر جدا شد. نمونه‌های منی که برای آزمایش انتخاب شدند (با ویژگی داشتن حداقل ۷۰ درصد اسپرم جنبا و کمتر از ۲۰ درصد سلول‌های غیرطبیعی)، برای از بین بردن اثر انفرادی اسبچه‌ها، با هم مخلوط و به چهار بخش تقسیم شدند.

آماده‌سازی رقیق‌کننده‌ها

هریک از چهار قسمت نمونهٔ منی با یکی از رقیق‌کننده‌های زیر رقیق شدند: ۱. رقیق‌کننده‌های فاقد آلبومین سرم گاوی (BSA-0)؛ ۲. رقیق‌کننده‌های حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA-5)؛ ۳. رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA-10) و ۴. رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA-15).

فراوری اسپرم‌ها برای سردکردن

اسپرم‌ها با استفاده از رقیق‌کنندهٔ INRA82 و شیر بدون چربی که با نسبت ۱:۱ (یک بخش اسپرم: یک بخش رقیق‌کننده) تهیه شده بود، در دو نوبت رقیق شدند. مرحلهٔ اول رقیق‌سازی قبل از سانتریفیوژکردن و مرحلهٔ دوم به هنگام افزودن رقیق‌کنندهٔ حاوی غلظت‌های مختلف BSA به نمونهٔ منی انجام گرفت که در نهایت غلظت اسپرم به ۲۵×۱۰^{۶} اسپرم در هر میلی‌لیتر رسید. نمونه‌های رقیق‌شده در سردخانه در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند.

ارزیابی نمونه‌ها

نمونه‌ها از لحاظ جنبایی و جنبایی پیش‌رونده، درصد اسپرم‌های زنده، یکپارچگی غشای پلاسمایی و مقدار پراکسیداسیون لیپیدی در زمان‌های ۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از سردسازی ارزیابی شدند.

جنبایی

برای تعیین جنبایی اسپرم از سیستم آنالیز رایانه‌ای (IVOS; Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly,

MA) استفاده شد. نمونهٔ منی در لام لجا (Leja) که از قبل گرم شده بود، قرار گرفت و زیر میکروسکوپ (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) بررسی شد.

زنده‌مانی

برای تعیین زنده‌مانی از روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. ۴ میکرولیتر رنگ (۰/۶۷ گرم ائوزین، ۱۰ گرم نیگروزین، ۰/۹ گرم سدیم کلرید) روی لام گرم ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس ۴ میکرولیتر نمونهٔ اسپرم به‌آرامی به رنگ افزوده شد و پس از گذشت زمانی نزدیک به ۱۰ ثانیه با استفاده از یک لامل و با زاویه‌ای بین ۳۰ تا ۴۰ درجه، گسترش تهیه شد. تعداد اسپرم‌های زنده و مرده با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ×۴۰۰ و شمارش ۲۰۰ اسپرم بررسی شدند. اسپرم‌هایی که به‌طور جزئی یا کامل رنگ ارغوانی گرفته بودند، مرده و اسپرم‌هایی که از ورود رنگ به داخل خود ممانعت کرده بودند، زنده در نظر گرفته شدند.

فعالیت غشای پلاسمایی

برای ارزیابی فعالیت غشای پلاسمایی از تست تورم هایپواسموتیک (هاس) استفاده شد. برای این آزمایش ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر محلول هایپواسموتیک (۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات سدیم، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) با ۲۵ میکرولیتر از هر نمونه اسپرم بلافاصله بعد از سانتریفیوژ، مخلوط شد و ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، نمونه با ملایمت مخلوط شد. سپس ۴ میکرولیتر از مخلوط عمل‌آوری‌شده روی لام از قبل گرم‌شده قرار گرفت و با لامل پوشانده شد و با میکروسکوپ (×۴۰۰) بررسی شد.

پراکسیداسیون لیپید

برای تخمین مقدار پراکسیداسیون لیپیدی از روش اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهاید (MDA) استفاده شد. اندازه‌گیری غلظت MDA با تیوباربیوتوریک اسید (TBA) از رایج‌ترین روش‌های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدهاست. در این روش، یک مولکول MDA با دو مولکول TBA واکنش می‌دهد و فراوردهٔ این واکنش، مولکولی صورتی‌رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد. ۱ میلی‌لیتر از هر نمونهٔ منی با ۱ میلی‌لیتر EDTA، ۱ میلی‌لیتر بوتیلید هیدروکسی تولوئن (BHT) و ۲ میلی‌لیتر تتراکلرواستیک اسید (TCA) با هم مخلوط و داخل لوله‌های مخروطی ریخته شدند. لولهٔ مخروطی در ۱۲۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژشدن، ۱ میلی‌لیتر از محلول بالای لولهٔ مخروطی با ۱ میلی‌لیتر TBA در میکروتیوب، آمیخته شد. لولهٔ مخروطی برای مدت ۲۰ دقیقه در صفحهٔ گرم ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند و سپس جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر (با اسپکتروفتومتر) اندازه‌گیری شد. جذب نوری نمونه‌های مختلف یادداشت شدند و در پایان، غلظت MDA (نانومول در میلی‌لیتر منی) محاسبه شد.

آنالیز آماری

داده‌ها برای جنبایی و جنبایی پیش‌رونده، درصد اسپرم‌های زنده، یکپارچگی غشای پلاسمایی و مقدار پراکسیداسیون لیپیدی با استفاده از برنامهٔ آماری SAS، رویهٔ Mixed آنالیز شدند و سطح اختلاف معناداری $p<۰/۰۵$ درنظر گرفته شد و داده‌ها به‌صورت حداقل میانگین مربعات ± انحراف معیار میانگین بیان شدند.

نتایج

جنبایی کل اسپرم

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اثر تیمار بر جنبایی کل معنادار نبود ولی اثرات زمان و برهم‌کنش زمان و تیمار بر این فراسنجه معنادار بود. همچنین نتایج نشان می‌دهد که رقیق‌کنندهٔ BSA-15، در مقایسه با سایر رقیق‌کننده‌ها در زمان ۲۴ ساعت پس از آغاز فرایند سردسازی، جنبایی کل را به‌طور معناداری بالاتر نگه‌داشته است ولی در زمان ۴۸، رقیق‌کننده‌های BSA-5 و BSA-10 در مقایسه با سایر رقیق‌کننده‌ها به‌طور معناداری جنبایی کل را بالاتر نگه‌داشته است (جدول ۱).

جدول ۱. اثر آلبومین سرم گاوی بر جنبایی کل اسپرم اسبچهٔ خزر پس از ۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی
(حداقل میانگین مربعات ± انحراف معیار میانگین)

تیمار	زمان‌های سپری‌شده پس از شروع سردسازی (ساعت)			SEM
	۲	۲۴	۴۸	
BSA-0	۷۰/۸[a]	۶۸/۰۳[bB]	۳۳/۱۸[cB]	۱۲/۱
BSA-5	۷۰/۹۳[a]	۶۷/۳۵[bB]	۳۵/۴۵[cA]	۱۱/۲۸
BSA-10	۷۱/۴۵[a]	۶۸[bB]	۳۵/۵۸[cA]	۱۱/۴۳
BSA-15	۷۱/۹۸[a]	۷۰/۴[aA]	۳۲/۳۸[bB]	۱۲/۹۴
SEM	۰/۲۷	۰/۶۷	۰/۸۱	

abc در هر ردیف اعدادی که حروف انگلیسی مشترک دارند دارای اختلاف معناداری نیستند.

ABC در هر ستون اعدادی که حروف انگلیسی مشترک دارند دارای اختلاف معناداری نیستند.

BSA-0: رقیق‌کننده‌های فاقد آلبومین سرم گاوی

BSA-5: رقیق‌کننده‌های حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی

BSA-10: رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی

BSA-15: رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی

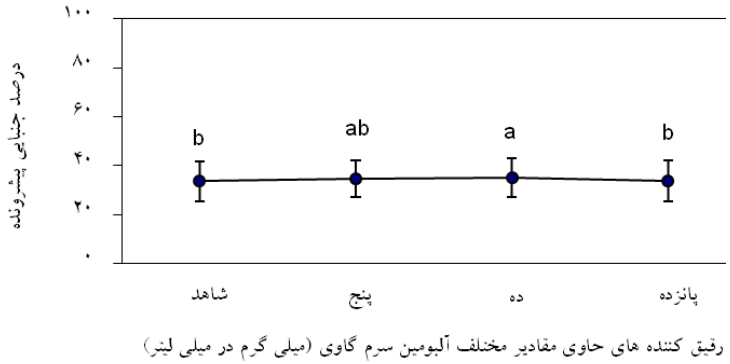
جنبایی پیش‌روندهٔ اسپرم

بر طبق نتایج تحقیق حاضر، اثر تیمار (شکل ۱) و زمان (جدول ۲) بر جنبایی پیش‌رونده معنادار بود ولی اثر برهم‌کنش زمان و تیمار بر این فراسنجه معنادار نبود.

جدول ۲. جنبایی پیش‌روندهٔ اسپرم اسبچهٔ خزر در زمان‌های مختلف پس از فرایند سردسازی
(حداقل میانگین مربعات ± انحراف معیار میانگین)

فراسنجه	زمان پس از آغاز فرایند سردسازی (ساعت)		
	۲	۲۴	۴۸
جنبایی پیش‌رونده	۴۳/۸۱[a]	۴۰/۵۶[b]	۱۸/۳۸[c]
SEM	۰/۳	۰/۵۷	۰/۵۹

abc اعدادی که حرف انگلیسی مشترک دارند دارای اختلاف معناداری نیستند.



شکل ۱. اثر اصلی رقیق‌کننده‌های مختلف بر درصد جنبایی پیش‌روندهٔ اسپرم اسبچهٔ خزر
(حداقل میانگین مربعات ± انحراف معیار میانگین)

زنده‌مانی اسپرم

در نتایج تحقیق حاضر اثر تیمار (شکل ۲) و زمان (جدول ۴) بر زنده‌مانی معنادار بود، ولی اثر برهم‌کنش زمان و تیمار بر این فراسنجه معنادار نبود.

یکپارچگی غشای اسپرم

در نتایج تحقیق حاضر اثر تیمار بر یکپارچگی غشای اسپرم معنادار نبود ولی اثر زمان و اثر برهم‌کنش تیمار و زمان بر این فراسنجه معنادار بود.

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، در همهٔ تیمارها، یکپارچگی غشای اسپرم با گذشت زمان کاهش معناداری پیدا کرده است. همچنین نتایج نشان می‌دهد که رقیق‌کنندهٔ BSA-15، به‌طور معناداری کمتر از سایر رقیق‌کننده‌ها در حفظ یکپارچگی غشا مؤثر بوده است.

جدول ۳. اثر آلبومین سرم گاوی بر یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم اسبچهٔ خزر پس از ۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی (حداقل میانگین مربعات ± انحراف معیار میانگین)

تیمار	زمان‌های سپری‌شده پس از شروع سردسازی (ساعت)			SEM
	۲	۲۴	۴۸	
BSA -0	۶۷/۴۲^{a}	۶۲/۱۳^{b}	۳۱/۶۷^{cA}	۱۱/۱۴
BSA -5	۶۶/۸۸^{a}	۶۳/۷۳^{b}	۳۳/۹۷^{cA}	۱۰/۴۹
BSA -10	۶۸/۱۸^{a}	۶۳/۱۶^{b}	۳۳/۲۶^{cA}	۱۰/۹
BSA -15	۶۷/۰۸^{a}	۶۳/۴۱^{b}	۲۸/۶۳^{cB}	۱۲/۲۵
SEM	۰/۲۹	۰/۳۵	۱/۱۹	

abc در هر ردیف اعدادی که حروف انگلیسی مشترک دارند دارای اختلاف معناداری نیستند.

ABC در هر ستون اعدادی که حروف انگلیسی مشترک دارند دارای اختلاف معناداری نیستند.

BSA-0: رقیق‌کننده‌های فاقد آلبومین سرم گاوی

BSA-5: رقیق‌کننده‌های حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی

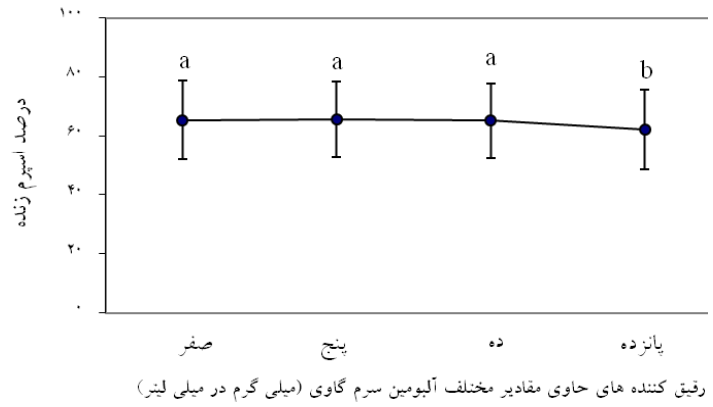
BSA-10: رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی

BSA-15: رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی

جدول ۴. زنده‌مانی اسپرم اسبچهٔ خزر در زمان‌های مختلف پس از فرایند سردسازی (حداقل میانگین مربعات ± انحراف معیار میانگین)

فراسنجه	زمان پس از آغاز فرایند سردسازی (ساعت)		
	۲	۲۴	۴۸
زنده‌مانی	۷۹/۰۹^{a}	۷۶/۱۵^{b}	۳۸/۳۸^{c}
SEM	۰/۵۹	۰/۷۸	۱/۱۷

abc اعدادی که حرف انگلیسی مشترک دارند دارای اختلاف معناداری نیستند.



شکل ۲. اثر اصلی رقیق‌کننده‌های مختلف بر درصد زنده‌مانی اسپرم اسبچهٔ خزر (حداقل میانگین مربعات ± انحراف معیار میانگین)

مقدار تولید مالون دی‌آلدهاید

در نتایج تحقیق حاضر اثر زمان (جدول ۵) بر مقدار تولید مالون دی‌آلدهاید معنادار بود، ولی اثر تیمار و اثر برهم‌کنش زمان و تیمار بر این فراسنجه معنادار نبود.

جدول ۵. مقدار تولید مالون دی‌آلدهاید اسپرم اسبچهٔ خزر پس از فرایند سردسازی
(حداقل میانگین مربعات ± انحراف معیار میانگین)

فراسنجه	زمان پس از آغاز فرایند سردسازی (ساعت)		
	۲	۲۴	۴۸
مقدار مالون دی‌آلدهاید	۲/۰۳[c]	۳/۵۳[b]	۴/۴۱[a]
SEM	۰/۰۲	۰/۱۱	۰/۲۱

abc اعدادی که حرف انگلیسی مشترک دارند دارای اختلاف معناداری نیستند.

بحث

یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های آلبومین سرم گاوی مهار رادیکال‌های آزاد تولیدشده در اثر تنش اکسیداتیو و محافظت از یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول اسپرم از شوک سرمایی با مهار این رادیکال‌های آزاد و در نتیجه حفظ یکپارچگی غشای پلاسمایی از پراکسیداسیون لیپیدی است (Uysal & Bucak, 2007). اثر افزودن آلبومین سرم گاوی به رقیق‌کنندهٔ منی در گونه‌های مختلف (Maxwell & Stojanov, 1996; Kubovicova *et al.*, 2010; Barati *et al.*, 2011) بررسی شده است. با این حال، مطالعه‌ای در زمینهٔ افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق‌کنندهٔ اسپرم اسبچهٔ خزر وجود ندارد. مطالعهٔ حاضر، اولین گزارش افزودن آلبومین سرم گاوی به رقیق‌کنندهٔ اسپرم اسبچهٔ خزر برای افزایش مدت‌زمان نگهداری اسپرم در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد است. غشای پلاسمایی اسپرم به دلیل داشتن اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه، مستعد پراکسیداسیون لیپیدی با رادیکال‌های آزاد نظیر هیدروژن پراکسید، سوپراکسید آنیون و رادیکال هیدروکسیل است که به آسیب ساختاری غشای پلاسمایی اسپرم طی فرایند سردسازی می‌انجامد (Sanocka & Kurpisz, 2004). تنش اکسیداتیو موجب کاهش سطوح ATP درون‌سلولی می‌شود که جنبایی اسپرم را کاهش می‌دهد و نیز پراکسیداسیون لیپیدی را در غشای پلاسمایی اسپرم که مملو از اسیدهای چرب غیراشباع است، آغاز می‌کند (Almeida & Ball, 2005). در مطالعهٔ حاضر، همان‌طور که انتظار می‌رفت با گذشت زمان سردسازی، جنبایی کل اسپرم در همهٔ تیمارها کاهش یافت اما جنبایی کل تا ۴۸ ساعت پس از سردسازی در رقیق‌کنندهٔ حاوی BSA-5 و BSA-10 کاهش کمتری در مقایسه با BSA-0 و BSA-15 نشان داد. در پژوهشی گزارش شده است که ROS با تخریب عملکرد میتوکندری موجب کاهش ATP میتوکندری شده و باعث ازدست‌رفتن جنبایی، زنده‌مانی و ظرفیت باروری اسپرم می‌شود (Cocchia *et al.*, 2011). درنتیجه با توجه به این گزارش‌ها احتمال می‌رود BSA-5 و BSA-10 با خاصیت زدایندگی ROS خود احتمالاً توانسته‌اند مانع تخریب عملکرد میتوکندری شوند و جنبایی اسپرم را حفظ کنند.

در این تحقیق نیز مشابه با سایر گزارش‌ها در گوسفند و انسان (Kubovicova *et al.*, 2010; Uysal & Bucak, 2007; Lewis *et al.*, 1997)، BSA-5 و BSA-10 دارای فعالیت غشای پلاسمایی بیشتری (به ترتیب ۳۳/۹۶ و ۳۳/۲۶ درصد) در مقایسه با گروه شاهد (۳۱/۶۸ درصد) پس از ۴۸ ساعت سردسازی در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد بوده‌اند؛ بنابراین، به نظر می‌رسد که BSA با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی غشا توانسته است موجب حفظ فعالیت غشای پلاسمایی شود.

در اثر گذشت زمان سردسازی، زنده‌مانی اسپرم کاهش معناداری پیدا کرد. در مطالعهٔ حاضر نیز اسپرم اسبچهٔ خزر در تیمار BSA-15 به دلیل غلظت بالای آنتی‌اکسیدان آسیب دیده‌است (Zhandi & Ghadimi, 2015)، چنانکه درصد اسپرم‌های زنده در آن کمتر از تیمار شاهد بود؛ بنابراین، به نظر می‌رسد غلظت‌های پایین تأثیرات مطلوبی بر زنده‌مانی اسپرم دارد، ولی احتمالاً سطوح بالای BSA برای زنده‌مانی اسپرم مضر است (Zhandi & Ghadimi, 2015).

بعد از ۴۸ ساعت سردسازی، مقدار تولید

مالون‌دی‌آلدهاید افزایش یافته بود، به‌طوری‌که اثر زمان معنادار شد. به‌طور کلی اثر BSA بر مقدار پراکسیداسیون لیپیدی معنادار نبود. مطابق با این گزارش، در مطالعه‌ای گزارش شده است که پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم نریان عامل اصلی تأثیرگذار بر زنده‌مانی اسپرم در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد نیست (Cocchia *et al.*, 2011).

در نتیجه، نتایج مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که استفاده از سطوح پایین BSA قادر به حفاظت بهتر اسپرم اسبچهٔ خزر در شرایط سرد است. همچنین، مطالعات تکمیلی با استفاده از آزمون‌های تخصصی برای تعیین کیفیت اسپرم نریان‌ها و ارزیابی باروری در مزرعه در پژوهش‌های آینده توصیه می‌شود.

REFERENCES

1. Aitken, R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 659-668.
2. Almeida, J. & Ball, B. A. (2005). Effect of alpha-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 87(3), 321-337.
3. Barati, F., Papahn, A. A., Afrough, M. & Barati, M. (2011). Effects of Tyrode's solution osmolarities and milk on bull sperm storage above zero temperatures. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 9(1), 25-30.
4. Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107(3), 257-267.
5. Cocchia, N., Pasolini, M., Mancini, R., Petrazzuolo, O., Cristofaro, I., Rosapane, I., Sica, A., Tortora, G., Lorizio, R. & Paraggio, G. (2011). Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 75(7), 1201-1210.
6. Denniston, D., Squires, E., Bruemmer, J., Brinsko, S., McCue, P. & Graham, J. (2000). Effect of antioxidants on the motility and viability of cooled stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 56, 121-126.
7. El-Kon, I. (2011). Testing Usability of Bovine Serum Albumin (BSA) for Preservation of Egyptian Buffalo Semen. A*merican-Eurasian Journal of Agricultural Environment Sciense*, 11(4), 495-502.
8. Francl, A., Amann, R., Squires, E. & Pickett, B. (1987). Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20ºC. *Theriogenology*, 27(3), 517-525.
9. Foote, R. H., Brockett, C. C. & Kaproth, M. T. (2002). Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, 71(1), 13-23.
10. Ghadimi, V., Zhandi, M., Towhidi, A., Shehab-El-Deen, M.A.M.M. & Nouri, H. (2014). Positive effect of Manganese (III) meso-tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin on stallion spermatozoa during storage in cool condition. *Journal of Equine Veterinary Science*. 34(11-12), 1329-1332.
11. Jasko, D., Hathaway, J., Schaltenbrand, V., Simper, W. & Squires, E. (1992). Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 37(6), 1241-1252.
12. Kubovicova, E., Riha, L., Makarevich, A., Apolen, D. & Pivko, J. (2010). Effect of different semen extenders and additives to insemination doses on ewes pregnancy rate. *Slovak Journal of Animal Sciense*, 43(3), 118-122
13. Lewis, S. E. M., Sterling, E. S. L., Young, I. S. & Thompson, W. (1997). Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, 67(1), 142-147.
14. Maxwell, W. & Stojanov, T. (1996). Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development*, 8(6), 1013-1020.
15. Sanocka, D. & Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproduction Biology and Endocrinology*, 2(12), 1-7.
16. Uysal, O. & Bucak, M. (2007). Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brno*, 76(3), 383-390.
17. Zhandi, M. & Ghadimi, V. (2014). The Effect of Glutathione-Supplemented INRA82 Extender on Miniature Caspian Stallion Sperm Quality during storage at 5°C. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(5), 606-610.

Iranian Journal of Animal Science, Vol. 46, No. 2, Summer 2015

Effect of bovine serum albumin on Caspian horse sperm quality during cooling

Vahid Ghadimi[1] and Mehdi Zhandi[2]*

1, 2. M. Sc. Student and Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agricultural Science and Engineering, University College of Agriculture & Natrual Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Dec. 5, 2014 - Accepted: May 11, 2015)

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of bovine serum albomin (BSA) in stallion semen extender in cool condition. After collection, semen samples were pooled and divided into four equal parts. Each part was diluted with one of the following extenders: (1) extender without BSA (BSA-0), (2) extender containing 5 mg/mL BSA (BSA-5), (3) extender containing 10 mg/mL BSA (BSA-10), and (4) extender containing 15 mg/mL BSA (BSA-15). After 2, 24 and 48 hours in cool condtions, the effect of different extenders on motility, viability, plasma membrane functionality and Malondialdehyde (MDA) level were evaluated. The obtained results indicated that total sperm motility in BSA-5 and BSA-10 extenders was significantly higher compared to BSA-0 and BSA-15 extenders after 48 hours. BSA-10 extender resulted in significantly higher progressive motility compared to BSA-0 and BSA-15 extenders. Plasma membrane functionality was significantly lower in BAS-15 extender compared to other extenders after 48 hours. Viability was significantly decreased in BSA-15 extender compared to other extenders. In conclusion, BSA-15 extender had lower protective effect on total motility and plasma membrane functionality comared to other extenders at 48 hours.

Keywords: bovine serum albumin, Caspian horse, cooling, sperm.

* Corresponding Author E-mail: mzhandi@ut.ac.ir Tel: +98 26 32248082, +98 912 7688051