تأثیر سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی (BSA) بر کیفیت منی قوچ عربی طی ذخیره آن در ۵ درجه سانتی‌گراد

صالح طباطبائی وکیلی*، رقیه زیدی کمره، مرتضی مموئی و خلیل میرزاده

اهواز، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، گروه علوم دامی

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۰

چکیده

در طی ذخیره‌سازی منی، آسیب‌های ناشی از اکسیداسیون از علل مهم کاهش کیفیت و قدرت باروری اسپرم‌ها می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان بر کیفیت منی قوچ عربی طی ذخیره آن به حالت مایع تحت دمای $5^{\circ}C$ بود. اسپرم‌گیری از ۸ رأس قوچ عربی خوزستان به‌طور هفتگی برای مدت ۸ هفته انجام و منی آن‌ها بلافاصله باهم مخلوط شد. نمونه منی مخلوط و رقیق‌شده سپس به ۵ قسمت تقسیم و هرکدام یکی از سطوح ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد آلبومین سرم گاو را دریافت کردند. در زمان‌های ۱، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از نگهداری منی در $5^{\circ}C$، فراسنجه‌های کیفی منی بررسی شدند. در زمان ۱ ساعت، سطوح BSA فقط باعث کاهش میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم‌ها در مقایسه با شاهد شدند ($P<0/05$). ۲۴ ساعت پس از ذخیره منی، تمام مقادیر BSA موجب بهبود اغلب فراسنجه‌های کیفی اسپرم شدند ($P<0/05$). طی ۴۸ و ۷۲ ساعت از ذخیره منی، سطوح ۰/۵ تا ۱/۵ درصد، عملکرد بهتری در بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم داشتند ($P<0/05$). در زمان ۹۶ ساعت، سطوح ۰/۵ و ۱ درصد بهترین تأثیر در حفظ تحرک و زنده‌مانی و نیز کاهش ناهنجاری‌های اسپرم داشتند ($P<0/05$). میزان pH منی در تمام زمان‌ها تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($P<0/05$). بطور کلی، با افزایش زمان نگهداری منی قوچ عربی، سطوح پایین BSA (کمتر از ۲ درصد و ترجیحاً ۰/۵ و ۱ درصد) باعث بهبود معنی‌دار فراسنجه‌های کیفی اسپرم بدون تأثیر بر pH منی شدند.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، آلبومین سرم گاو (BSA)، کیفیت، قوچ، نگهداری منی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۶۱۳۶۵۲۲۴۳۸، پست الکترونیکی: tabatabaei@ramin.ac.ir

مقدمه

نگهداری اسپرم در دماهای پایین، تولید انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر را افزایش می‌دهد و مشخص‌شده که این ترکیبات اثرات مخربی بر ساختار سلول اسپرم بر جای می‌گذارند. بنابراین در این شرایط استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم مؤثر باشد (۳۰). تقریباً تمام سلول‌ها دارای مواد و آنزیم‌هایی هستند که می‌توانند اثرات سمی انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر را خنثی کنند. اما میزان توانایی آنتی‌اکسیدان‌های اسپرم در مقایسه با دیگر سلول‌ها پایین‌تر است و این سلول‌ها نسبت به فشارهای اکسیداتیو آسیب‌پذیرتر هستند (۲۴). اضافه کردن آنتی‌اکسیدان به نمونه‌های منی قوچ، سبب افزایش قدرت زنده‌مانی اسپرم‌ها شده است (۲۲ و ۲۶).

آلبومین سرم گاوی پروتئینی است که در سرم خون گاوها یافت می‌شود. این پروتئین با دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند میزان تحرک و درصد اسپرم‌های زنده‌ی قوچ را در رقیق‌کننده‌های حاوی این پروتئین افزایش دهد. آلبومین به‌صورت یک مولکول درشت می‌تواند به غشاء پلاسمایی اسپرم وارد شده و علاوه برافزایش پایداری غشاء

به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مانع پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی گردد (۱۷). آلبومین به‌عنوان یک محافظت کننده اسپرم‌ها در حالت انجماد عمل می‌نماید (۸). یکی از مهمترین خصوصیات آلبومین سرم گاوی این است که موجب حذف یا مهار رادیکال‌های آزاد تولیدشده توسط واکنش اکسیژنی و واکنش‌های اکسیداتیوی می‌شود و در افزایش استحکام غشای سلول‌های اسپرم از پرکسیداسیون لیپیدی و شوک حرارتی در طول نگهداری منی تحت شرایط سرمایی نقش دارد (۱۶).

عنصر روی بر عملکرد و ساختار غشای پلاسمایی اسپرم تأثیرگذار است. روی، کوفاکتوری برای آنزیم‌های مختلف بخصوص آنزیم‌های مؤثر در سنتز پروتئین می‌باشد. این عنصر با تأثیر بر فسفولیپازها، موجب تنظیم ثبات و پایداری غشاهای بیولوژیکی می‌شود. با خروج عنصر روی از سطح سلول اسپرم، غشای پلاسمایی ناپایدار شده و اسپرم مستعد ظرفیت‌دار شدن و واکنش آکروزومی خواهد شد (۳۲). آلبومین سرم گاوی در ظرفیت‌دارشدن اسپرم از طریق خارج کردن عنصر روی از سطح اسپرم و تغییر ترکیب لیپید غشای پلاسمایی اسپرم نقش دارد (۲۵). بنابراین آلبومین در قدرت باروری جنس نر از طریق ظرفیت‌دار کردن اسپرم و آماده‌سازی آن برای لقاح نیز مهم می‌باشد. آلبومین به‌عنوان پروتئین کوچک موجود در مایع منی و با عمل جاروب‌گری خود، یون‌های فلزی عامل پیشرفت و گسترش واکنش‌های پراکسیداسیون سلولی را جذب و حذف می‌نماید (۱۲). لیزوزوم که از اسپرم‌های مرده آزاد می‌شود، خود در تخریب غشای پلاسمایی اسپرم‌های دیگر نقش دارد. آنزیم‌های پروتئولیتیک و تجمع اسیدلاکتیک درنتیجه متابولیسم اسپرم‌ها در طی نگهداری منی، اثرات نامطلوبی بر سلامتی غشای اسپرم دارند. زمانی- که pH منی خیلی اسیدی شود، مابقی اسپرم‌ها نیز تحرک خود را ازدست‌داده و درصد اسپرم‌های مرده افزایش می‌یابد. بنابراین، افزودن آلبومین به مایع منی می‌تواند در حفظ و زنده‌مانی اسپرم‌ها مؤثر باشد (۱۴). با توجه به این موارد، هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر افزودن سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی به منی قوچ عربی بر کیفیت اسپرم و pH منی طی زمان‌های مختلف نگهداری آن به حالت مایع در دمای $5^{\circ}C$ بود.

مواد و روشها

پژوهش حاضر از اواسط مهرماه تا اواخر آذرماه سال ۱۳۹۴ هجری شمسی، مصادف با فصل تولیدمثلی پاییز گوسفند عربی، در ایستگاه دامپروری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان واقع در ۳۶ کیلومتری شمال‌شرقی اهواز انجام شد. برای این منظور، از ۸ رأس قوچ عربی بالغ با متوسط سن حدود ۲/۵ ساله و تحت برنامه تغذیه‌ای و مدیریتی یکسان در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. اسپرم‌گیری به روش تحریک الکتریکی (الکترواجاکولاتور) به‌طور هفتگی برای مدت ۸ هفته انجام شد. منی جمع‌آوری شده از قوچ‌ها در هر دوره، به‌منظور جلوگیری از اثرات فردی بلافاصله باهم مخلوط و به نسبت ۱ به ۱۰ در رقیق‌کننده پایه تریس رقیق‌سازی شد (جدول ۱). نمونه‌های انزال مخلوط و رقیق‌شده به ۵ قسمت تقسیم و هرکدام سطح مختلف آلبومین سرم گاوی (صفر یا شاهد، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد) را دریافت کردند. در زمان‌های مختلف نگهداری منی رقیق‌شده حاوی تیمارهای آزمایشی (۱، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) بصورت مایع تحت دمای $5^{\circ}C$، فراسنجه‌های کیفی منی بررسی شدند.

برای ارزیابی تحرک پیشرونده اسپرم‌ها، پنج میکرولیتر از منی رقیق‌شده روی لام گرم قرارداده شده و پس از لامل- گذاری، با استفاده از میکروسکوپ نوری، با بزرگنمایی ۴۰۰X در چند میدان دید درصد تحرک پیشرونده ارزیابی‌شده و در انتها میانگین حاصل به‌عنوان درصد تحرک پیش‌رونده ثبت شد (۷). برای ارزیابی میزان اسپرم- های زنده و مرده از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده گردید. ترکیبات آن شامل رنگ ائوزین (۱/۶۷ گرم در لیتر)،

رنگ نیگروزین (۱۰۰ گرم در لیتر) و سیترات سدیم (۲۹ گرم در لیتر) می‌باشد.

جدول ۱- ترکیب رقیق‌کننده تریس و زرده تخم‌مرغ جهت نگهداری منی قوچ عربی در شرایط مایع (۲۱)

اجزای رقیق‌کننده	مقدار اجزاء
تریس (هیدروکسی متیل آمینومتان) (گرم)	۳/۶۳۴
فروکتوز (گرم)	۰/۵
اسیدسیتریک (منوهیدرات) (گرم)	۱/۹۹
زرده تخم‌مرغ (میلی‌لیتر)	۱۴
آب مقطر (میلی‌لیتر)	۱۰۰

ابتدا منی رقیق‌شده‌ی تیمارها بارنگ ائوزین- نیگروزین آمیخته (نسبت ۱ به ۱) شد و پس از ۳۰ ثانیه، روی لام توسط یک لام دیگر گسترش تهیه گردید و با جریان هوای گرم خشک شد. پس از خشک شدن گسترش، لام‌ها توسط بزرگنمایی ۱۰۰۰X میکروسکوپ نوری و با استفاده از روغن ایمرسیون مورد ارزیابی قرارگرفتند. درصد اسپرم-های زنده و مرده در چندین میدان از لام (با شمردن حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید) تعیین شد. اسپرم‌های مرده به علت تغییر در ساختمان غشا، رنگ ائوزین را به خود جذب کرده و به رنگ صورتی دیده شدند، اما اسپرم-های زنده رنگ را به خود جذب نکرده و سفیدرنگ ماندند (۱۱). برای بررسی درصد اسپرم‌های ناهنجار، نمونه کوچکی از منی درروی لام بارنگ ائوزین- نیگروزین رنگ‌آمیزی شد. هنگام تهیه گسترش دقت شد تا آسیب‌های فیزیکی به اسپرم‌های سالم وارد نشود که در این صورت، درصد اسپرم‌های ناهنجار افزایش خواهد یافت. پس از رنگ‌آمیزی، درصد اسپرم‌های ناهنجار با استفاده از روغن ایمرسیون و شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر لام تحت بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰X میکروسکوپ تعیین گردید (۶).

برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم یا آزمون HOST (Hypo osmotic swelling test) از محلول هیپواسموتیک استفاده شد. واکنش اسپرم‌ها به محیط هیپواسمول به‌صورت تورم دم است. در این حالت اسپرم هایی که غشای پلاسمایی سالمی دارند به محلول واکنش نشان می‌دهند، ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. درواقع پس‌ازاین آزمایش اسپرم‌های با دم گره‌خورده به‌عنوان اسپرم‌های با پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌هایی که دم آن‌ها صاف است به‌عنوان اسپرم با پاسخ منفی (غشای پلاسمایی معیوب) تلقی می‌شوند. مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هیپواسموتیک حاوی فروکتوز (۹ گرم در لیتر) و سیترات سدیم (۴/۹ گرم در لیتر) مخلوط گردید، سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل ۳ قطره از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. بررسی میکروسکوپی با استفاده از یک صفحه گرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با بزرگ نمایی ۴۰۰X صورت گرفت. در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای غشای یکپارچه محاسبه شد (۱۱). برای بررسی میزان pH منی طی زمان‌های مختلف پس از نگهداری منی در هرکدام از تیمارهای آزمایشی از pH سنج دیجیتالی قلمی با دقت بالا استفاده شد.

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، با استفاده از برنامه نرم‌افزار آماری SPSS (ویرایش ۱۶) مورد آنالیز قرار گرفت. جهت بررسی کیفیت اسپرم و میزان pH منی در هر زمان بین تیمارها از تحلیل واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) برای مدل ۱ و آزمون مقایسه‌ای چند دامنه دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تعداد تکرار برای هر تیمار، هشت واحد آزمایش در نظر گرفته شد.

$$Y_{Ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij} \quad (۱)$$

نتایج و بحث

نتایج تأثیر افزودن سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی (BSA) به منی قوچ عربی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم‌ها و pH منی در زمان‌های ۱، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از نگهداری منی به حالت مایع در ۵°C به ترتیب ارائه می‌شود.

یک ساعت پس از نگهداری منی، درصد تحرک پیشرونده، زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم و نیز pH منی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند (P>۰/۰۵). ولی میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در تمام سطوح BSA بطور معنی‌داری کمتر از شاهد بود (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

۲۴ ساعت پس از ذخیره منی، میزان تحرک پیشرونده و زنده‌مانی اسپرم در شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر از تمام سطوح BSA بودند (P<۰/۰۵). همچنین، بیشترین میزان ناهنجاری اسپرم در گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). تیمارهای ۱/۵ و ۲ درصد BSA در زمان ۲۴ ساعت، دارای میزان سلامت غشای پلاسمایی اسپرم بیشتری نسبت به شاهد بودند (P<۰/۰۵). در این زمان تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر pH منی نداشتند (P>۰/۰۵) (جدول ۳).

در زمان ۴۸ ساعت از ذخیره منی، تحرک پیشرونده اسپرم در شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر از سطوح ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد BSA بود (P<۰/۰۵). همچنین، میزان زنده‌مانی اسپرم در شاهد کمتر از تمام سطوح آلبومین بود (P<۰/۰۵). در این زمان، بیشترین میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). همچنین گروه‌های شاهد و ۲ درصد BSA میزان سلامت غشای پلاسمایی اسپرم کمتری در مقایسه با تیمارهای آزمایشی دیگر داشتند (P<۰/۰۵). در این زمان، تفاوت معنی‌داری در pH منی بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (جدول ۴).

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی (BSA) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم و اسیدیته منی قوچ عربی (یک ساعت پس از نگهداری منی در ۵°C)

سطوح BSA (٪)	تحرک پیشرونده (٪)	زنده‌مانی (٪)	ناهنجاری مورفولوژیکی (٪)	سلامت غشای پلاسمایی (٪)	pH
۰/۵	۹۰/۰۰ ± ۳/۱۶	۹۲/۵۰ ± ۱/۷۱	۵/۳۳ ± ۰/۵۶[b]	۸۲/۰۰ ± ۱/۲۲	۶/۷۳ ± ۰/۱۴
۱	۹۰/۰۰± ۴/۰۸	۹۳/۶۷ ± ۰/۸۸	۵/۱۷ ± ۰/۱۷[b]	۸۲/۵۰ ± ۱/۴۴	۶/۷۲ ± ۰/۱۷
۱/۵	۹۰/۳۳ ± ۳/۱۸	۹۳/۱۷ ± ۰/۸۷	۵/۰۰ ± ۰/۲۶[b]	۸۲/۰۰ ± ۱/۷۰	۶/۷۰ ± ۰/۱۴
۲	۸۹/۱۷ ± ۳/۰۰	۹۱/۶۷ ± ۱/۶۷	۵/۰۰ ± ۰/۴۵[b]	۸۲/۲۰ ± ۰/۸۰	۶/۶۸ ± ۰/۱۲
صفر (شاهد)	۸۵/۰۰ ± ۳/۱۶	۸۷/۵۰ ± ۱/۱۲	۷/۰۰ ± ۰/۵۲[a]	۷۷/۰۰ ± ۲/۵۵	۶/۷۰ ± ۰/۱۴

a-b: تفاوت میانگین‌ها (± خطای معیار) با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی (BSA) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم و اسیدیته منی قوچ عربی (۲۴ ساعت پس از نگهداری منی در ۵°C)

سطوح BSA (٪)	تحرک پیشرونده (٪)	زنده‌مانی (٪)	ناهنجاری مورفولوژیکی (٪)	سلامت غشای پلاسمایی (٪)	pH
۰/۵	۸۳/۰۰ ± ۳/۷۱[a]	۸۵/۸۳ ± ۲/۰۱[a]	۷/۵۰ ± ۰/۴۳[b]	۷۲/۰۰ ± ۲/۰۰[ab]	۶/۷۵ ± ۰/۱۹
۱	۸۳/۰۰ ± ۳/۰۰[a]	۸۵/۰۰ ± ۱/۸۳[a]	۷/۳۳ ± ۰/۴۲[b]	۷۲/۶۰ ± ۳/۱۲[ab]	۶/۸۲ ± ۰/۱۹
۱/۵	۸۵/۰۰ ± ۳/۱۶[a]	۸۵/۸۳ ± ۲/۳۹[a]	۷/۱۷ ± ۰/۴۸[b]	۷۴/۴۰ ± ۲/۳۲[a]	۶/۷۷ ± ۰/۱۷
۲	۸۱/۶۷ ± ۳/۳۳[a]	۸۴/۱۷ ± ۲/۰۱[a]	۷/۶۷ ± ۰/۶۱[b]	۷۴/۴۰ ± ۱/۹۶[a]	۶/۸۳ ± ۰/۱۹
صفر (شاهد)	۶۹/۲۵ ± ۱/۴۹[b]	۷۵/۸۳ ± ۲/۳۹[b]	۱۱/۰۰ ± ۰/۶۸[a]	۶۵/۶۰ ± ۱/۶۹[b]	۶/۵۶ ± ۰/۱۴

a-b: تفاوت میانگین‌ها (± خطای معیار) با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

۷۲ ساعت پس از نگهداری منی، میزان تحرک پیشرونده اسپرم‌ها و زنده‌مانی آنها در تمام تیمارهای آزمایشی به‌غیراز ۲ درصد BSA، به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بودند (P<۰/۰۵). بیشترین میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در ۷۲ ساعت پس از اسپرم‌گیری، مربوط به شاهد بود (P<۰/۰۵). میزان سلامت غشای پلاسمایی اسپرم و pH منی تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای آزمایشی و شاهد نداشتند (P<۰/۰۵) (جدول ۵).

در آخرین زمان یعنی ۹۶ ساعت پس از نگهداری منی، سطوح BSA باعث بهبود معنی‌دار میزان تحرک پیشرونده اسپرم در مقایسه با شاهد شدند (P<۰/۰۵). در این زمان، میزان زنده‌مانی اسپرم در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر از سطوح ۰/۵ و ۱ درصد BSA بود (P<۰/۰۵).

جدول ۴- تأثیر سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی (BSA) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم و اسیدیته منی قوچ عربی (۴۸ ساعت پس از نگهداری منی در ۵°C)

سطوح BSA (٪)	تحرک پیشرونده (٪)	زنده‌مانی (٪)	ناهنجاری مورفولوژیکی (٪)	سلامت غشای پلاسمایی (٪)	pH
۰/۵	۷۴/۰۰ ± ۱/۷۰ ^{a}	۷۴/۶۷ ± ۲/۷۳ ^{a}	۱۱/۶۶ ± ۰/۸۸ ^{b}	۶۷/۰۰ ± ۳/۰۰ ^{a}	۶/۵۵ ± ۰/۱۲
۱	۷۳/۰۰ ± ۱/۶۳ ^{a}	۷۴/۱۷ ± ۲/۰۱ ^{a}	۱۱/۸۳ ± ۰/۸۳ ^{b}	۶۷/۱۰ ± ۳/۲۱ ^{a}	۶/۵۰ ± ۰/۱۴
۱/۵	۷۴/۱۷ ± ۲/۷۱ ^{a}	۷۴/۸۳ ± ۱/۸۳ ^{a}	۱۱/۸۴ ± ۰/۴۸ ^{b}	۶۶/۴۰ ± ۲/۷۳ ^{a}	۶/۵۸ ± ۰/۱۳
۲	۶۹/۱۷ ± ۴/۳۶ ^{b}	۷۱/۶۷ ± ۳/۸۰ ^{a}	۱۱/۶۷ ± ۰/۶۶ ^{b}	۵۴/۶۰ ± ۳/۴۹ ^{b}	۶/۶۲ ± ۰/۱۹
صفر (شاهد)	۵۸/۳۳ ± ۳/۳۳ ^{b}	۶۰/۰۰ ± ۳/۴۲ ^{b}	۱۵/۱۶ ± ۱/۰۸ ^{a}	۵۶/۱۱ ± ۱/۸۷ ^{b}	۶/۵۲ ± ۰/۱۹

a-b: تفاوت میانگین‌ها (± خطای معیار) با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

جدول ۵- تأثیر سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی (BSA) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم و اسیدیته منی قوچ عربی (۷۲ ساعت پس از نگهداری منی در ۵°C)

سطوح BSA (٪)	تحرک پیشرونده (٪)	زنده‌مانی (٪)	ناهنجاری مورفولوژیکی (٪)	سلامت غشای پلاسمایی (٪)	pH
۰/۵	۵۵/۰۰ ± ۳/۱۶ ^{a}	۵۸/۳۳ ± ۲/۴۷ ^{a}	۱۶/۱۷ ±۱/۳۳ ^{b}	۶۰/۰۰ ± ۴/۱۸	۶/۴۲ ± ۰/۱۳
۱	۵۸/۳۳ ± ۳/۳۳ ^{a}	۵۸/۳۵ ± ۲/۱۰ ^{a}	۱۶/۶۷ ±۱/۰۵ ^{b}	۶۱/۰۰ ±۴/۸۵	۶/۴۳ ± ۰/۱۴
۱/۵	۶۰/۰۰ ± ۴/۶۵ ^{a}	۶۱/۶۷ ± ۴/۵۹ ^{a}	۱۶/۳۳ ± ۱/۳۸ ^{b}	۶۱/۱۵ ± ۳/۳۲	۶/۳۵ ± ۰/۱۲
۲	۴۳/۰۰ ± ۱/۸۳ ^{b}	۵۱/۶۷ ± ۲/۷۹ ^{ab}	۱۶/۰۰ ± ۰/۹۳ ^{b}	۵۷/۰۰ ± ۳/۷۴	۶/۴۵ ± ۰/۱۸
صفر (شاهد)	۳۵/۸۳ ± ۳/۵۲ ^{b}	۴۲/۵۰ ± ۴/۴۳ ^{b}	۲۲/۰۰ ± ۱/۰۶ ^{a}	۵۰/۲۲ ± ۵/۲۴	۶/۶۸ ± ۰/۱۵

a-b: تفاوت میانگین‌ها (± خطای معیار) با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در زمان ۹۶ ساعت پس از اسپرم‌گیری در شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از سطوح ۰/۵ و ۱ درصد بود (P<۰/۰۵). میزان سلامت غشای پلاسمایی اسپرم و pH منی طی این زمان تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند (P>۰/۰۵) (جدول ۶).

آلبومین در مطالعات مختلف به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان که سازوکارهای آن هنوز شناخته نشده است، مورد بررسی قرارگرفته و ثابت‌شده است که می‌تواند مانع از پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم گردد. در بوقلمون، افزودن آلبومین سرم گاوی به منی باعث افزایش تحرک اسپرم شد (۵).

جدول ۶- تأثیر سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی (BSA) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم و اسیدیته منی قوچ عربی (۹۶ ساعت پس از نگهداری منی در ۵°C)

سطوح BSA (٪)	تحرک پیشرونده (٪)	زنده‌مانی (٪)	ناهنجاری مورفولوژیکی (٪)	سلامت غشای پلاسمای (٪)	pH
۰/۵	۴۲/۰۰ ± ۶/۴۴[a]	۴۴/۰۰ ± ۵/۷۹[a]	۲۰/۴۰ ±۱/۰۳[bc]	۵۱/۰۰ ± ۴/۸۵	۶/۵۰ ± ۰/۱۳
۱	۴۲/۱۱ ± ۳/۷۴[a]	۴۳/۲۰ ± ۴/۰۶[a]	۱۹/۰۰ ±۰/۷۱[c]	۵۰/۶۰ ±۴/۳۴	۶/۵۶ ± ۰/۱۳
۱/۵	۴۱/۰۰ ± ۵/۱۰[a]	۴۲/۱۰ ± ۲/۴۵[ab]	۲۳/۰۰ ± ۱/۳۰[ab]	۵۲/۲۰ ± ۳/۶۷	۶/۴۰ ± ۰/۱۴
۲	۴۱/۱۰ ± ۱/۸۷[a]	۴۲/۲۰ ± ۲/۵۵[ab]	۲۳/۲۰ ± ۱/۷۹[ab]	۵۳/۰۰ ± ۳/۲۲	۶/۶۲ ± ۰/۱۲
صفر (شاهد)	۲۶/۷۷ ± ۲/۴۵[b]	۳۰/۰۰ ± ۳/۵۴[b]	۲۵/۷۵ ± ۱/۴۹[a]	۴۱/۶۰ ± ۵/۷۰	۶/۵۰ ± ۰/۱۰

a-c: تفاوت میانگین‌ها (± خطای معیار) با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

همچنین، اضافه‌کردن آلبومین سرم گاوی به منی گاو و قوچ در مرحله قبل انجماد با کاهش میزان آسیب وارده به اسپرم‌ها طی روند انجماد منجر به بالا بودن میزان حرکت پیشرونده اسپرم‌ها در مقایسه با گروه شاهد شد (۲۸ و ۱۷). در گزارشی دیگر، استفاده از ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی در بافر یون فسفات پتاسیم، باعث بهبود تحرک پیشرونده اسپرم اپیدیدیمی خرگوش شد که دلیل آن را به نقش بازدارندگی پراکسیداسیون لیپیدها توسط آلبومین سرم گاوی نسبت دادند (۴). اسپرم‌های جدا شده از اپیدیدیم خرگوش وقتی در معرض آلبومین سرم گاو قرارگرفتند، میزان تحرک آن‌ها نسبت به گروه شاهد بیشتر بود (۱۳). مطالعه دیگر نشان داد که محیط‌های حاوی آلبومین سرم گاوی موجب بهبود میزان تحرک پیشرونده اسپرم‌های اسب شد (۱۵). افزودن آلبومین سرم گاو به مایع منی گاو علاوه بر حفظ زنده‌مانی اسپرم‌ها، کاهش میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم را باعث شد (۱۴). در انسان، ارتباط مثبت معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی و غلظت آلبومین پلاسمای منی یافت شد. اما چنین ارتباطی بین میزان آلبومین پلاسمای منی و تحرک اسپرم مشاهده نشد (۱۰).

در تحقیقی، رقیق‌کننده دارای آلبومین سرم گاو تأثیری بر درصد اسپرم‌های متحرک و ناهنجاری آکروزومی طی ۴۸ ساعت از ذخیره منی خرگوش به حالت مایع نداشت. اما، اثر معنی‌داری بر حفظ سلامتی غشای پلاسمایی اسپرم در این مدت داشت (۲۳). این درحالی است که طبق پژوهش حاضر، سطوح مختلف BSA نسبت به شاهد تأثیر معنی-داری بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم داشتند. طی پژوهشی که در آن اثر آلبومین سرم گاو بر کیفیت اسپرم خوک در طی ذخیره‌سازی به حالت مایع در ۱۷°C بررسی شد، غلظت‌های ۳، ۴ و ۵ گرم در لیتر این پروتئین موجب بهبود میزان تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم شدند (۳۱) که مشابه بامطالعه حاضر بخصوص در سطوح پایین‌تر آلبومین سرم گاو و در زمان‌های مختلف نگهداری منی قوچ عربی به حالت مایع در ۵°C بود. آلبومین سرم گاوی سبب بهبود تحرک پیشرونده، سلامت غشاء و آکروزوم اسپرم گاومیش نیز شده است (۲۱).

با بررسی اثر آلبومین سرم گاوی بر میزان تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم گاومیش، مشاهده شد که طی صفر ،۲ و ۴ ساعت پس از نگهداری منی به حالت سرما، میزان تحرک اسپرم تحت تأثیر قرار نگرفت، اما میزان زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم بهبود یافت (۳). در مطالعه حاضر، در زمان ۱ ساعت پس از نگهداری منی، فراسنجه‌های تحرک و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی BSA

قرارنگرفتند. ولی با افزایش مدت‌زمان نگهداری، بخصوص سطوح کمتر از ۲ درصد آلبومین سرم گاو، موجب بهبود فراسنجه‌های تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ عربی شدند. موافق با تحقیق حاضر، در پژوهشی تأثیر آلبومین سرم گاوی بر میزان تحرک و باروری اسپرم خروس بومی قبل و بعد از نگهداری ۲۴ ساعته در دمای ۴°C موردبررسی قرارگرفت. نتایج نشان داد که آلبومین سرم گاو باعث حفظ تحرک اسپرم پس از ۲۴ ساعت از ذخیره منی خروس تحت دمای ۴°C شد (۱).

آلبومین سرم گاوی در مایعات دستگاه تناسلی شناسایی‌شده و به حفظ تحرک اسپرم و سلامتی آکروزوم در روند سرد نمودن منی کمک می‌کند (۲۹). در تحقیقی، تأثیر آلبومین سرم گاوی بر اسپرم گاو نر پس از ۲۴ ساعت از کشت آزمایشگاهی بررسی و مشاهده شد که تحرک اسپرم در غلظت ۲۰ درصد آلبومین بالاترین بود (۲۷). با بررسی اثر آلبومین سرم گاو بر اسپرم گاومیش، غلظت ۰/۰۵ درصد آلبومین تحرک اسپرم بهتری را نسبت به غلظت ۱ درصد آن موجب شد (۲۱). همچنین، آلبومین سرم گاو موجب بهبود تحرک اسپرم بوقلمون بعد از ذخیره‌سازی ۲۴ ساعت در دمای ۱۷°C شد (۵). تأثیرات سودمند آنتی‌اکسیدان‌ها توانایی آن‌ها برای کاهش رادیکال‌های آزادی است که توسط فرایندهای متابولیسمی تولید می‌شوند. آنتی‌اکسیدان-ها ازجمله آلبومین سرم گاو دفاع مؤثری علیه رادیکال پروکسیل هستند و می‌توانند از آسیب اکسیداتیو به DNA اسپرم جلوگیری کرده و توانایی اسپرم را به شوک سرمایی تنظیم و سرانجام بقای اسپرم در برابر سرما را افزایش دهند (۱۹). در پژوهشی دیگر، پروتئین‌های پلاسما سبب حفظ تحرک اسپرم گاو و قوچ شد (۲۰). همچنین پروتئین‌های پلاسما سبب بهبود زنده‌مانی اسپرم خوک در شرایط شوک سرمایی شدند (۱۸). آلبومین سرم گاو اثر مثبتی بر میزان تحرک و زنده‌مانی اسپرم گاو نر نگهداری شده تحت شرایط سرما نیز داشته است (۹).

با بررسی اثرات آلبومین سرم گاوی و سرم جنین گوساله بر کیفیت اسپرم خرگوش، مشاهده گردید که این تیمارها اثر قابل‌توجهی در حفظ سلامت غشای پلاسمایی اسپرم بین دوره ۴۸ و ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی نسبت به شاهد داشتند (۲۳). این در حالی است که ۷۲ ساعت پس از ذخیره منی قوچ عربی به حالت مایع در مطالعه‌ی حاضر، میزان سلامت غشای پلاسمایی اسپرم تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. ولی موافق با پژوهش فوق، ۴۸ ساعت پس از نگهداری منی قوچ عربی میزان سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در تیمارهای ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد آلبومین به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود. وقتی BSA به منی اضافه می‌شود، غشای سلولی اسپرم‌ها را پوشانده و از خاصیت چسبندگی فیزیکی اسپرم‌ها به محیط اطراف جلوگیری می‌شود، درنتیجه با کاهش اصطکاک بین اسپرم و محیط (ازجمله لام) سرعت حرکت پیشرونده اسپرم‌ها افزایش پیدا می‌کند. همچنین پوشیده شدن غشای پلاسمایی سراسپرم توسط BSA، اثرعوامل مضر محیطی روی سر اسپرم را مهار کرده و قدرت زنده‌مانی اسپرم در محیط آزمایشگاه افزایش پیدا می‌کند (۱۵). در مقابل، نظریه مخالفی در شرایط آزمایشگاهی مبنی بر اینکه آلبومین سرم گاوی با تغییر در ترکیب لیپیدهای غشای سلولی، به‌ویژه با کاهش نسبت کلسترول به فسفولیپید در غشای پلاسمایی اسپرم منجر به نفوذپذیری یون‌های کلسیم به درون غشای پلاسمایی اسپرم شده و درنتیجه موجب آغاز واکنش آکروزومی زودهنگام و مرگ اسپرم می‌گردد نیز وجود دارد (۲۸).

بطور کلی براساس نتایج تحقیق حاضر، با افزایش مدت‌زمان ذخیره منی قوچ عربی به حالت مایع در ۵°C، سطوح کمتر از ۲ درصد آلبومین سرم گاوی (BSA)، بخصوص ۰/۵ و ۱ درصد آن باعث بهبود معنی‌دار فراسنجه‌های کیفی اسپرم بدون تأثیر بر pH منی شدند. دلیل احتمالی غیرموثر بودن بالاترین سطح BSA به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در این مطالعه را می‌توان اینگونه توضیح

داد که پراکسید هیدروژن بر فراسنجه‌های اسپرم ازجمله افزایش تحرک آن دخالت دارد. بنابراین، مقدار بسیار کم اکسیژن‌های واکنش‌پذیر به‌عنوان واسطه‌ای برای کنترل عملکرد طبیعی اسپرم لازم است (۲).

منابع

۱. طباطبایی، ص.، و مموی، م.، ۱۳۹۵. تأثیر آلبومین سرم گاوی (BSA) بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم و باروری خروس بومی، تولیدات دامی، دوره ۱۸، شماره ۲، صفحات ۴۰۸-۳۹۷.

2. Aitken, R. J., 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reproduction, Fertility and Development, 7, PP: 659-668.

3. Akhter, S. h., Allah Rakha, B., Iqbal, R., and Ansari, M. S., 2014. Effect of bovine serum albumin on motility, plasmalemma, viability and chromatin integrity of buffalo bull spermatozoa, Pakistan Journal of Zoology, 46(1), PP: 115-120.

4. Alvarez, J. G., and Storey, B. T., 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation, Gamete Research, 23, PP: 77-90.

5. 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, PP: 287-293.

6. Blom, E., 1983. Pathological conditions in the genital organs and in the semen as ground for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark, Nordisk Veterinary Medicine, 45, PP: 105- 130.

7. Bucak, M. N. S., Sariozkan, P. B., Tuncer, P., Ulutas, A., and Akcadag, H. I., 2009. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation, and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation, Small Ruminant Research, 81, PP: 90-95.

8. 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, PP: 377-382.

9. El-Kon, I., 2011. Testing usability of bovine serum albumin (BSA) for preservation of Egyptian buffalo semen, American Eurasian Journal of Agricultural and Environmental sciences, 11(4), PP: 495-502.

10. Elzanaty, S., Erenpreiss, J., and Becker, C., 2007. Seminal plasma albumin: origin and relation to the male reproductive parameters. Andrologia, 39(2), PP: 60-65.

11. Evans, G., and Maxwell, W. M. C., 1987. Handling and examination semen, In: Maxwell WMC, editor. Salamon's artificial insemination of sheep and goat, Sydney: Butterworths. PP: 93-106.

12. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C., 1989. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, PP: 188-276.

13. Harrison, R. A., Dott, H. M., and Foster, G. C., 1982. Bovine serum albumin, sperm motility, and the dilution effect, Journal of Experimental Zoology, 222(1), PP: 81-88.

14. Jones, J. M., and Bavister, B. D., 2000. Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. Journal of Andrology, 21(5), PP: 616-624.

15. 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(5), PP: 569-576.

16. 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, PP: 399-408.

17. Matsuoka, T., Imai, H., Kohno, H., and Fukui, Y., 2006. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa, Journal of Reproduction and Development, 52, PP: 675-683.

18. Maxwell, W. M., Welch, G. R., and Johnson, L. A., 1996. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma, Reproduction, Fertility and Development, 8(8), PP: 1165-1178.

19. Naijian, H. R., Kohram, H., Shahneh, A. Z., and Sharafi, M., 2013. Effects of various concentrations of BSA on microscopic and

oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process, Small Ruminant Research, 113(2), PP: 371-375.

20. Peris, I. S., Bilodeau, J. F., Dufour, M., and Bailey, J., 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram semen, Molecular Reproduction and Development, 74, PP: 878-892.

21. Rahman, Z. U., Anwar, M., Andarbi, S. M. H., Mehmood, A., Ali, L., and Ahmad, H., 2015. Effect of bovine serum albumin in extender on post-thow quality and *in vivo* fertility of buffalo bull semen, Buffalo Bulletin, 34(4), PP: 417-421.

22. Salamon, S., and Maxwell, W. M. C., 2000. Storage of ram semen, Animal Reproduction Science, 62(1), PP: 77-111.

23. Sarıözkan, S., Türk, G., Cantürk, F., Yay, A., Eken, A., and Akçay, A., 2013. The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen, Cryobiology, 67(1), PP: 1-6.

24. Sreejith, J. N., Brar, A. S., Ahuja, C. S., and Sangha, S. P. S., 2006. A comparative study onlipid peroxidation activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoaduring storage at refrigeration temperature, Animal Reproduction Science, 96, PP: 21-29.

25. Stewart-Savage, J., 1993. Effect of bovine serum albumin concentration and source on sperm capacitation in the golden hamster, Biology of Reproduction, 49(1), PP: 74-81.

26. Stojanov, T., Rhodes, S. L., Maxwell, W. M. C., and Evans, G., 1994. The effect of antioxidants on the fertilising capacity of chilled-stored ram spermatozoa, Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series, 13, 7p.

27. Tvrdá, E., Kňažická, Z., Massányi, P., Stawarz, R., Formicki, G., and Lukáč, N., 2010. Bovin serum albumin as a potential protein supplement for *in viro* cultivation of spermatozoa. Mendel Net, PP: 264-269.

28. Uysal, O., and Bucak, M. N., 2007. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen, Acta Veterinaria Burno. 76, PP: 383-390.

29. Yamashiro, H., Wang, H., Yamashita, Y., Kumamoto, K., and Terada, T., 2006. Enhanced freezability of goat spermatozoa collected into tubes containing extender supplemented with bovine serum albumin (BSA), Journal of Reproduction and Development, 52(3), PP: 407-414.

30. Yousef, M. I., Abdallah, G. A., and Kamel, K. I., 2003. Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits, Animal Reproduction science, 76(1), PP: 99-111.

31. Zhang, Y. Z., Zhou, B., Zhang, X. P., Huang, P., Li, C. H., and Liu, Y., 2009. Interaction of malachite green with bovine serum albumin: determination of the binding mechanism and binding site by spectroscopic methods, Journal of Hazardous Materials, 163(2), PP: 1345-1352.

32. Zhao, J., Dong, X., Hu, X., Long, Z., Wang, L., Liu, Q., Sun, B., Wang, Q., Wu, Q., and Li, L., 2016. Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis, Scientific Reports, 6, PP: 1-10.

Effect of different levels of bovine serum albumin (BSA) on semen quality of Arabi ram during storage in 5°C

Tabatabaei Vakili S., Zeidi Kamareh R., Mamouei M. and Mirzadeh Kh.

Animal Science Dept., Faculty of Animal and Food Sciences, Khuzestan Agricultural and Natural Resources University, Ahvaz, I. R. of Iran

Abstract

During the semen storage, oxidative damages are the major causes of decrease in sperm quality and its fertility potential. The aim of this study was to evaluate the effect of different levels of bovine serum albumin (BSA) as an antioxidant on semen characteristics of Arabi ram in various times of semen storage in liquid condition under 5°C. Semen samples were collected weekly from 8 Arabi rams for 8 weeks and pooled. After dilution, the semen sample was divided into 5 parts which received the different levels of BSA (0, 0.5, 1, 1.5 or 2 percent). In each part, semen quality characteristics were evaluated at different storage times (1, 24, 48, 72 or 96 h). In 1h of storage, BSA levels only decreased the morphological defects of spermatozoa than control ($P<0.05$). After 24h storage, all levels of BSA, improved the most of sperm quality parameters ($P<0.05$). During 48 and 72h of semen storage, 0.5 and 1percent of BSA had the better performance ($P<0.05$). At the final storage time or 96h, 0.5 and 1 percent of BSA had the best performance in maintenance of motility and viability and decrease the morphological defect rates of spermatozoa ($P<0.05$). The pH of semen in all storage times was not affected by treatments ($P>0.05$). Overall, with increasing the storage times of Arabi ram semen, lower levels of BSA (below than 2 percent and preferably 0.5 and 1 percent) significantly improved the sperm quality parameters without effect on pH of semen.

Key words: BSA, Quality, Ram, Semen storage, Sperm