

## تأثیر روش‌های مختلف سانتریفوژ بر کیفیت اسپرم خزر پیش و پس از سرد کردن

هوشنگ نوری<sup>۱</sup>، آرمین توحیدی<sup>۲\*</sup>، مجید بحرینی<sup>۳</sup> و طوبی ندری<sup>۴</sup>

۱، ۲ و ۴. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه

تهران، کرج

۳. دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۰)

### چکیده

این تحقیق با هدف تعیین تأثیر روش‌های مختلف سانتریفوژ (دور و زمان سانتریفوژ) بر ویژگی‌های اسپرم خزر انجام شد. در این پژوهش نمونه‌های منی از چهار سر اسب خزر بالغ و سالم با استفاده از واژن مصنوعی گردآوری و پس از آن در رقیق‌کننده بر پایه فسفوکازئینات شیر رقیق شد. سپس نمونه‌های منی به هفت قسمت یکسان تقسیم و به هر یک از تیمارهای آزمایشی که شامل تیمار بدون سانتریفوژ (شاهد) و تیمارهای سانتریفوژ شده ( $500 \times g$ ،  $1000 \times g$  و  $2000 \times g$  هر کدام با دو زمان ۴ و ۷ دقیقه سانتریفوژ) اختصاص یافت. ارزیابی کیفی منی پس از سانتریفوژ در زمان‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از سردسازی انجام شد. در این پژوهش ویژگی‌های جنبایی اسپرم، زنده‌مانی و سلامت غشاء اسپرم ارزیابی شد. نتایج نشان داد در تیمارهای گروه  $2000 \times g$  جنبایی، زنده‌مانی و سلامت غشاء اسپرم کاهش یافت ( $P \leq 0.05$ ). کیفیت اسپرم ذخیره‌شده در تیمارهای  $500 \times g$  و  $1000 \times g$  در مقایسه با شاهد بهتر بود ( $P \leq 0.05$ ). همچنین گروه‌های  $500 \times g$  و  $1000 \times g$  درصد بازیافت پایین‌تری در مقایسه با گروه  $2000 \times g$  نشان دادند ( $P \leq 0.05$ ). در مجموع در فرآیند سرد کردن بهترین کیفیت اسپرم از لحاظ ویژگی‌های کیفی اسپرم و درصد بازیافت (۷۵/۸۹٪) متعلق به تیمار  $1000 \times g$  در مدت زمان هفت دقیقه بود.

واژه‌های کلیدی: ارزیابی کیفی، جنبایی، زنده‌مانی، سلامت، اسپرم.

## Effects of different centrifugation protocols on pre and post-cooling sperm quality in Caspian horses

Houshang Nouri<sup>1</sup>, Armin Towhidi<sup>2\*</sup>, Majid Bahreini<sup>3</sup> and Touba Nadri<sup>4</sup>

1, 2, 4. Former M.Sc. Student, Associate Professor and Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Veterinary Expert, Animal Breeding Center of Iran, Karaj, Iran

(Received: Dec. 20, 2015 - Accepted: Feb. 28, 2017)

### ABSTRACT

This study aimed to determine the effects of different centrifuging protocols (different rotation and time) on Caspian horse sperm characteristics. In this study, semen samples from four healthy adult Caspian pony stallion were collected using an artificial vagina and then diluted in milk phosphocaseinate based extender. Then semen samples were divided into seven equal parts, which part assigned to treatments including centrifugation treatments ( $500 \times g$ ,  $1000 \times g$  and  $2000 \times g$  each for 4 and 7 minutes) and without centrifuge (control). Cooling of treatments were done at 0, 24 and 48 hours after centrifugation. Sperm motion characteristics, viability and percentages of healthy sperm were assessed. The results showed that motility, viability and percentages of healthy sperm reduced in  $2000 \times g$  treatments ( $p < 0.05$ ). Stored sperm in  $500 \times g$  and  $1000 \times g$  treatments had better quality compared to control group ( $p < 0.05$ ). In addition, compared to  $2000 \times g$  treatment, in  $500 \times g$  and  $1000 \times g$  treatments a less recovery rate was observed ( $p < 0.05$ ). In conclusion, Caspian horse's semen in treatment with centrifuging for 7 minutes at  $1000 \times g$ , showed better result.

**Keywords:** Healthy, matility, quality evaluation, sperm, viability.

## مقدمه

استفاده از روش‌های تولیدمثلی از جمله تلقیح مصنوعی و رویه‌های وابسته به آن شامل توسعه رقیق کننده‌ها، سرد کردن و انجماد اسپرم برای افزونش و اصلاح نژاد اسب خزر ضروری است. استفاده از اسپرم سرد شده و منجمد و نیز تلقیح مصنوعی امروزه جایگاه مناسبی در صنعت اسب دارد. مرسوم‌ترین روش تلقیح مصنوعی در اسب، استفاده از منی سرد شده به علت درصد آبستنی بالای آن نسبت به اسپرم منجمد- ذوب شده است (Jasko et al., 1992). در فرآیند سرد کردن یا انجماد اسپرم اسب اگر میزان پلاسمای منی زیاد باشد، ویژگی‌های جنبایی اسپرم به شدت کاهش می‌یابد. در صورتی که میزان‌های کمتر پلاسمای منی تأثیر سودمندی بر حرکت اسپرم‌ها داشته است (Jasko et al., 1991; Brinsko et al., 2000). از این رو کاهش میزان پلاسمای منی در فرآوری منی اسب برای بقاء و ماندگاری اسپرم، چه به صورت سرد شده یا منجمد ضروری است (Ritar et al., 1982). تأثیر زیانبار پلاسمای منی (از جمله رادیکال‌های آزاد اکسیژن) را می‌توان با رقیق کردن منی اسب با نسبت‌های بالای ۱:۴ یا ۱:۶ (رقیق کننده: اسپرم) کاهش داد (Varner et al., 1987). اما به دلیل اینکه تلقیح مصنوعی مادیان با حجم بالای منی رقیق شده که اسپرم‌های کمتری در هر میلی‌لیتر دارد، باعث کاهش درصد آبستنی مادیان می‌شود، از سانتریفوژ برای این منظور استفاده می‌شود. بررسی‌ها نشان داده‌اند که سانتریفوژ منی اسب تأثیر مثبتی در حذف پلاسمای منی و ذخیره‌سازی اسپرم به صورت سرد شده داشته است (Brinsko et al., 2000). اما اثرگذاری سانتریفوژ بر اسپرم اسب به صورت کامل ارزیابی نشده است. تأثیر سانتریفوژ بر اسپرم، حذف پلاسمای منی و رقیق‌سازی دوباره منی تحت تأثیر عامل‌های زیادی است. این عامل‌ها شامل: زمان سانتریفوژ، دور سانتریفوژ، رقیق‌سازی، میزان رقیق‌کننده منی و میزان باقی‌مانده پلاسمای منی است (Brinsko et al., 2000). دوره‌های سانتریفوژی که در فرآوری منی اسب استفاده می‌شود، به طور معمول ۴۰۰-۶۵۰×g است که سبب از دست رفتن میزان شایان توجهی اسپرم در مایع رویی در لوله تحت سانتریفوژ است (Cochran et al., 1984). از

این رو هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی تأثیر دوره‌های سانتریفوژ و مدت‌زمان سانتریفوژ بر ویژگی‌های تحرک کل، زنده‌مانی و سلامت اسپرم اسب خزر بی‌درنگ پس از سانتریفوژ و همچنین پس از سرد کردن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت است.

## مواد و روش‌ها

### مکان آزمایش و حیوان‌های آزمایشی

در این پژوهش از چهار سر اسب خزر بالغ و سالم (با میانگین سنی ۱۰ سال) در مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور واقع در کرج استفاده شد. حیوان‌ها در مدت دوره آزمایشی با جیره غذایی یکسان (از نظر میزان و کیفیت) تغذیه شدند.

### گردآوری منی

پیش از اسپرم‌گیری قضیب اسب‌ها با استفاده از آب ۳۸ تا ۴۱ درجه سلسیوس و پارچه سفید تمیز و نرم شستشو شد. پس از گردآوری منی، نمونه اخذ شده به آزمایشگاه انتقال داده شد. بی‌درنگ منی تازه در دمای اتاق (۲۲°C) با رقیق‌کننده بر پایه فسفوکازینات شیر به نسبت ۱:۱ رقیق شد. به طوری که غلظت نهایی اسپرم در آن به  $5 \times 10^6$  اسپرم در میلی‌لیتر برسد (Varner et al., 1987). منی به هفت قسمت یکسان تقسیم و در لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. هر لوله به یکی از هفت تیمار زیر اختصاص داده شد که شامل: ۱- تیمار بدون سانتریفوژ (شاهد) ۲- تیمار  $500 \times g$  در ۴ دقیقه ۳- تیمار  $500 \times g$  در ۷ دقیقه ۴- تیمار  $1000 \times g$  در ۴ دقیقه ۵- تیمار  $1000 \times g$  در ۷ دقیقه ۶- تیمار  $2000 \times g$  در ۴ دقیقه ۷- تیمار  $2000 \times g$  در ۷ دقیقه بود. محلول بالایی لوله‌ها تیمارهای سانتریفوژ شده، پس از سانتریفوژ با استفاده از پیت خارج شد. سپس تیمارهای سانتریفوژ شده و شاهد در سردخانه قرار داده شد (Kareskoski et al., 2006). برای انجام آزمون‌های تحرک کل، تحرک پیش‌رونده و تورم هایپواسموتیک<sup>۱</sup> و تعیین درصد اسپرم‌های زنده و مرده در زمان ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت

۳۲۰-۳۱۰ میلی‌اسمولار است. اسپرم با قرار گرفتن در محیط با اسمولاریته پایین به سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن گره می‌خورد. تنها اسپرم‌های زنده و دارای غشای سالم به این نوع محیط واکنش می‌دهند و اسپرم‌های مرده در این محیط هیچ واکنشی از خود نشان نمی‌دهند. در این پژوهش ۵۰۰ μl محلول هایپواسموتیک با ۵۰ μl نمونه اسپرم از هر تیمار بی‌درنگ پس از سانتریفیوژ و نیز پس از سرد شدن مخلوط شد و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری (انکوبه) شد. سپس ۵ μl از نمونه نگهداری شده روی لام قرار داده شد و با قرار دادن لام روی لام گسترده شد. بررسی میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰× صورت گرفت. از هر تیمار، دویست اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های با دم گره‌خورده (اسپرم سالم) و اسپرم با دم گره نخورده محاسبه شد.

#### تعیین درصد بازیافت اسپرم پس از سانتریفیوژ

برای تعیین درصد بازیافت، غلظت اسپرم در دو زمان پیش از سانتریفیوژ و پس از سانتریفیوژ محاسبه شد. سپس با استفاده از رابطه زیر درصد بازیافت محاسبه شد.

درصد بازیافت =

$$\frac{\text{شمار اسپرم اولیه}}{100} \times (\text{شمار اسپرم مایع رویی} - \text{شمار اسپرم اولیه})$$

#### مدل آماری طرح

داده‌های به‌دست‌آمده از هرکدام از تیمارها در پنج تکرار در قالب طرح کامل تصادفی و بر پایه معادله مدل آماری زیر با استفاده از رویه Proc GLM نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند.

$$y = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Y: ویژگی‌های کمی و کیفی اسپرم،  $\mu$ : میانگین جامعه،  $\alpha_i$ : اثر تیمار،  $\epsilon_{ij}$ : اثر عامل‌های باقی‌مانده. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSMeans انجام شد و اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

پس از سردسازی دو نمونه ۲۵ میکرولیتری از هر تیمار جدا شد.

#### ارزیابی ویژگی‌های اسپرم

برای تعیین غلظت اسپرم از لام هموسایتومتر استفاده شد. ویژگی‌های تحرک کل و تحرک پیش‌رونده هر یک از تیمارها، به کمک سامانه رایانه‌ای ارزیابی اسپرم CASA version 12 (IVOS; Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA) انجام شد. فراسنجه‌های سامانه CASA شامل ۳۰ فریم به‌دست‌آمده از شصت فریم در ثانیه؛ کمینه کنتراست، ۳۰؛ کمینه اندازه یاخته، ۵ پیکسل؛ میانگین سرعت در مسیر (VAP)<sup>۱</sup>، ۸۰ μm/s؛ VAP یاخته‌های پیش‌رونده، ۷۰ μm/s؛ راستی مسیر طی‌شده (STR)<sup>۲</sup>، ۸۰٪ و سرعت در مسیر مستقیم (VSL)<sup>۳</sup>، ۰ μm/s بود.

#### زنده‌مانی

زنده‌مانی اسپرم اسب خزر به روش رنگ‌آمیزی اتوزین-نیگروزین ارزیابی شد. برای ارزیابی تیمارها، ۱۰ μl از هر تیمار به‌وسیله نمونه‌بردار (سمپلر) روی یک لام گرم و تمیز قرار داده شد. سپس ۱۰ μl از رنگ اتوزین-نیگروزین روی اسپرم ریخته شد و با هم مخلوط شدند. سپس گسترشی از مخلوط آن‌ها روی لام تهیه شد. از هر تیمار دویست اسپرم به‌وسیله میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰۰× شمارش شد. درصد اسپرم‌های رنگی شده (مرده) و رنگی نشده (زنده) محاسبه شد.

#### سلامت اسپرم

سلامت اسپرم با استفاده از آزمون تورم هایپواسموتیک سر اسپرم تعیین شد. آزمون تورم هایپواسموتیک بر پایه اسمولاریته محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. اسمولاریته محیط‌هاست ۱۰۰ میلی‌اسمولار و اسمولاریته مورد نیاز برای اسپرم اسب

1. Average path velocity
2. Sperm track straightness
3. Straight line velocity

## نتایج

تأثیر زمان‌های مختلف سردسازی بر ویژگی‌های اسپرم اسب خزر  
مقایسه میانگین تأثیر زمان‌های مختلف سردسازی بر ویژگی‌های اسپرم اسب خزر در زمان‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ در جدول ۱ آمده است. بیشترین میانگین تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و تورم هایپواسموتیک مربوط به زمان ۰ است و با افزایش مدت‌زمان سردسازی کاهش یافته است (جدول ۱).

۵۰۰×g در ۴ دقیقه، ۵۰۰×g در ۷ دقیقه، ۱۰۰۰×g در ۴ دقیقه، ۱۰۰۰×g در ۷ دقیقه، و ۲۰۰۰×g در ۴ دقیقه اختلاف معنی‌داری نداشت ( $P \leq 0.05$ )، اما این تیمارها با گروه شاهد و همچنین تیمار ۲۰۰۰×g در ۷ دقیقه اختلاف معنی‌داری نشان دادند ( $P \leq 0.05$ ).

#### تحرک پیش‌رونده اسپرم پس از سرد کردن در دمای ۵ درجه سلسیوس

در مدت ۲۴ ساعت سرد کردن از نظر تحرک پیش‌رونده اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۵۰۰×g در ۴ دقیقه، ۵۰۰×g در ۷ دقیقه، ۱۰۰۰×g در ۴ دقیقه، ۱۰۰۰×g در ۷ دقیقه، مشاهده نشد. اما این تیمارها اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد و همچنین تیمارهای ۲۰۰۰×g در ۴ دقیقه و ۲۰۰۰×g در ۷ دقیقه نشان دادند ( $P \leq 0.05$ ) (جدول ۳).

تحرک کل اسپرم پس از سرد شدن در دمای ۵ درجه سلسیوس  
همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، تحرک کل اسپرم اسب خزر در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت سرد کردن در دمای ۵ درجه سلسیوس در تیمارهای

جدول ۱. تأثیر (میانگین حداقل مربعات  $\pm$  خطای معیار) زمان‌های مختلف سردسازی بر ویژگی‌های اسپرم اسب خزر

Table 1. Effect of (Lsmeans  $\pm$  SEM) different times of cooling on characteristics of Caspian stallion's sperm

Time of cooling (Hour)	Total motility (%)	Progressive motility (%)	Viability (%)	Hypo-osmotic swelling test (%)
0	85.31 <sup>a</sup>	55.40 <sup>a</sup>	69.71 <sup>a</sup>	72.22 <sup>a</sup>
24	76.31 <sup>b</sup>	47.25 <sup>b</sup>	63.45 <sup>b</sup>	65.60 <sup>b</sup>
48	74.22 <sup>c</sup>	41.37 <sup>c</sup>	57.22 <sup>c</sup>	56.31 <sup>c</sup>

abc: میانگین‌هایی که حرف‌های مشترک انگلیسی ندارند، اختلاف معنی‌دار دارند ( $P \leq 0.05$ ).

abc: Means that do not have common letter are statistically significant ( $P \leq 0.05$ ).

جدول ۲. مقایسه (میانگین  $\pm$  خطای معیار) تحرک کل اسپرم اسب خزر در تیمارهای مختلف سانتریفوژ و سرد کردن

Table 2. Comparing (mean  $\pm$  SEM) Caspian stallion's total sperm motility indifferent treatment of centrifuging and cooling

Treat (Minute $\times$ Rotation rate)	Hour 0	Hours 24	Hours 48
500 $\times$ 4	87.8 $\pm$ 3.42 <sup>a</sup>	84 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	81.6 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>
500 $\times$ 7	87.4 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>	83.2 $\pm$ 3.70 <sup>a</sup>	80.2 $\pm$ 3.96 <sup>a</sup>
1000 $\times$ 4	89 $\pm$ 1.87 <sup>a</sup>	83.6 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>	79.6 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>
1000 $\times$ 7	88 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	86.2 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	80.2 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>
2000 $\times$ 4	88.2 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>	86.2 $\pm$ 1.09 <sup>a</sup>	81.4 $\pm$ 1.96 <sup>a</sup>
2000 $\times$ 7	69.6 $\pm$ 6.54 <sup>b</sup>	61.6 $\pm$ 6.87 <sup>b</sup>	55.6 $\pm$ 5.41 <sup>b</sup>
Without centrifugation	87.2 $\pm$ 2.28 <sup>a</sup>	70.4 $\pm$ 44.15 <sup>b</sup>	61 $\pm$ 2.64 <sup>b</sup>

abc: میانگین‌هایی که حرف‌های مشترک انگلیسی ندارند، اختلاف معنی‌دار دارند ( $P \leq 0.05$ ).

abc: Means that do not have common letter are statistically significant ( $P \leq 0.05$ ).

جدول ۳. مقایسه (میانگین  $\pm$  خطای معیار) تحرک پیش‌رونده اسپرم اسب خزر پس از سانتریفوژ و سرد کردن

Table 3. Comparing (mean  $\pm$  SEM) Caspian stallion's sperm progressive motility after centrifugation and cooling

Treat (Minute $\times$ Rotation rate)	0 Hour	24 Hours	Hours
4 $\times$ 500	56.8 $\pm$ 4.32 <sup>a</sup>	49.6 $\pm$ 3.84 <sup>a</sup>	44.8 $\pm$ 3.42 <sup>bc</sup>
7 $\times$ 500	57.4 $\pm$ 3.91 <sup>a</sup>	53.2 $\pm$ 4.81 <sup>a</sup>	47.6 $\pm$ 5.07 <sup>ab</sup>
4 $\times$ 1000	56 $\pm$ 3.93 <sup>a</sup>	49.2 $\pm$ 3.34 <sup>a</sup>	44.4 $\pm$ 4.56 <sup>bc</sup>
7 $\times$ 1000	57.2 $\pm$ 3.27 <sup>a</sup>	52.4 $\pm$ 3.50 <sup>a</sup>	51 $\pm$ 4.58 <sup>bc</sup>
4 $\times$ 2000	52.8 $\pm$ 3.81 <sup>a</sup>	43.4 $\pm$ 3.50 <sup>b</sup>	39.8 $\pm$ 3.56 <sup>c</sup>
7 $\times$ 2000	51.8 $\pm$ 4.81 <sup>a</sup>	41 $\pm$ 2.54 <sup>b</sup>	30.6 $\pm$ 1.94 <sup>d</sup>
Without centrifugation	55.8 $\pm$ 3.76 <sup>a</sup>	42 $\pm$ 2.54 <sup>b</sup>	34.4 $\pm$ 3.43 <sup>d</sup>

abc: میانگین‌هایی که حرف‌های مشترک انگلیسی ندارند، اختلاف معنی‌دار دارند ( $P \leq 0.05$ ).

abc: Means that do not have common letter are statistically significant ( $P \leq 0.05$ ).

می‌دهد. تیمار  $1000 \times g$  در ۷ دقیقه بالاترین درصد سلامت غشاء اسپرم پس از سانتریفوژ را به خود اختصاص داده است. اگرچه با تیمار شاهد (بدون سانتریفوژ) اختلاف معنی‌داری نشان نداد. همچنین بیشترین درصد سلامت غشاء اسپرم پس از ۲۴ ساعت سرد کردن مربوط به تیمار  $500 \times g$  در ۴ دقیقه است. که با اختلاف معنی‌داری از تیمار شاهد بالاتر است. پس از ۴۸ ساعت سرد کردن، تیمار  $1000 \times g$  در ۷ دقیقه بیشترین درصد سلامت اسپرم را به خود اختصاص داد.

#### درصد بازیافت اسپرم پس از سانتریفوژ

همان‌طور که در جدول ۶ نشان داده شده است، درصد بازیافت اسپرم تحت تأثیر سانتریفوژ قرار گرفت. درصد بازیافت اسپرم در تیمارهای سانتریفوژ شده در مقایسه با تیمار شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد.

#### زنده‌مانی اسپرم اسب خزر پس از سانتریفوژ و پس از سرد کردن در دمای ۵ درجه سلسیوس

همان‌طور که در جدول ۴ نشان داده شده است، زنده‌مانی اسپرم اسب خزر پس از سرد کردن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در تیمارهای  $500 \times g$  در ۴ دقیقه،  $1000 \times g$  در ۷ دقیقه، و  $2000 \times g$  در ۴ دقیقه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. پس از سرد کردن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت، زنده‌مانی تیمار  $2000 \times g$  در ۷ دقیقه کاهش معنی‌داری در مقایسه با تیمار  $2000 \times g$  در ۴ دقیقه نشان داد. همچنین پس از ۲۴ ساعت سرد کردن، زنده‌مانی اسپرم در تیمار  $2000 \times g$  در ۷ دقیقه نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد.

#### سلامت غشاء اسپرم

جدول ۵ نتایج آزمون تورم هایپواسموتیک را نشان

جدول ۴. مقایسه (میانگین  $\pm$  خطای معیار) زنده‌مانی اسپرم اسب خزر پس از سانتریفوژ و پس از سرد کردن  
Table 4. Comparing (mean  $\pm$  SEM) Caspian stallion's sperm viability after centrifugation and cooling

Treat (Minute $\times$ Rotation rate)	0Hour	Hours 24	Hours 48
4 $\times$ 500	74 $\pm$ 3.74 <sup>a</sup>	67.6 $\pm$ 4.82 <sup>a</sup>	65 $\pm$ 6.40 <sup>a</sup>
7 $\times$ 500	74 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	67.4 $\pm$ 5.45 <sup>a</sup>	63.2 $\pm$ 35.63 <sup>a</sup>
4 $\times$ 1000	72.4 $\pm$ 7.82 <sup>a</sup>	66 $\pm$ 10.36 <sup>a</sup>	61.2 $\pm$ 12.27 <sup>a</sup>
7 $\times$ 1000	72.8 $\pm$ 2.68 <sup>a</sup>	68.4 $\pm$ 2.96 <sup>a</sup>	63.6 $\pm$ 4.77 <sup>a</sup>
4 $\times$ 2000	72 $\pm$ 4.06 <sup>a</sup>	66.8 $\pm$ 6.41 <sup>a</sup>	58.6 $\pm$ 7.36 <sup>a</sup>
7 $\times$ 2000	51.8 $\pm$ 6.72 <sup>b</sup>	44.8 $\pm$ 7.25 <sup>b</sup>	37.6 $\pm$ 8.32 <sup>b</sup>
Without centrifugatio	71 $\pm$ 2.44 <sup>a</sup>	63.2 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>	51.4 $\pm$ 1.15 <sup>b</sup>

abc: میانگین‌هایی که حرف‌های مشترک انگلیسی ندارند، اختلاف معنی‌دار دارند ( $P \leq 0.05$ ).

abc: Means that do not have common letter are statistically significant ( $P \leq 0.05$ ).

#### جدول ۵. مقایسه (میانگین $\pm$ خطای معیار) سلامت غشای اسپرم اسب خزر پس از سانتریفوژ و سرد کردن

Table 5. The comparing (mean  $\pm$  SEM) Caspian stallion's sperm membrane integrity after centrifugation and cooling

Treat (Minute $\times$ Rotation rate)	Hour 0	24 Hours	48Hours
500 $\times$ 4	75.4 $\pm$ 4.03 <sup>ab</sup>	70.4 $\pm$ 5.59 <sup>ab</sup>	64 $\pm$ 4.41 <sup>ab</sup>
500 $\times$ 7	77 $\pm$ 3.93 <sup>a</sup>	73.2 $\pm$ 4.56 <sup>a</sup>	66 $\pm$ 5.14 <sup>a</sup>
1000 $\times$ 4	74.2 $\pm$ 4.14 <sup>ab</sup>	69.4 $\pm$ 2.88 <sup>ab</sup>	64 $\pm$ 3.74 <sup>ab</sup>
1000 $\times$ 7	76.4 $\pm$ 3.50 <sup>ab</sup>	72.2 $\pm$ 4.43 <sup>a</sup>	67.2 $\pm$ 1.92 <sup>a</sup>
2000 $\times$ 4	71.2 $\pm$ 3.96 <sup>b</sup>	65.2 $\pm$ 3.03 <sup>b</sup>	58.8 $\pm$ 1.64 <sup>b</sup>
2000 $\times$ 7	57.6 $\pm$ 2.07 <sup>c</sup>	49.2 $\pm$ 4.26 <sup>c</sup>	32.4 $\pm$ 6.61 <sup>c</sup>
Without centrifugatio	72.8 $\pm$ 4.65 <sup>ab</sup>	59.6 $\pm$ 12.21 <sup>c</sup>	41.8 $\pm$ 8.01 <sup>bc</sup>

abc: میانگین‌هایی که حرف‌های مشترک انگلیسی ندارند، اختلاف معنی‌دار دارند ( $P \leq 0.05$ ).

abc: Means that do not have common letter are statistically significant ( $P \leq 0.05$ ).

جدول ۶: درصد بازیافت اسپرم اسب خزر پس از سانتریفوژ

Table 6. The Percentage of Caspian stallion's sperm recovered after centrifugation

Treat (Minute × Rotation rate)	Percent of recovery
Control	100 <sup>a</sup>
4 × 500	44.49±3.66 <sup>f</sup>
7 × 500	55.06±2.38 <sup>e</sup>
4×1000	2.98± 62.4 <sup>d</sup>
7 × 1000	75.89±2.14 <sup>c</sup>
4 × 2000	78.48±1.56 <sup>c</sup>
7 × 2000	89.53±4.31 <sup>b</sup>

abc: میانگین‌هایی که حرف‌های مشترک انگلیسی ندارند، اختلاف معنی‌دار دارند ( $P \leq 0.05$ ).

abc: Means that do not have common letter are statistically significant ( $P \leq 0.05$ ).

نتیجه گرفت که ترکیب‌های پلاسمای منی (از جمله ROS) که تأثیر زیانباری بر تحرک اسپرم ذخیره‌شده دارند پس از سانتریفوژ به همراه پلاسمای منی حذف می‌شوند. از سوی دیگر تیمار چهار (۱۰۰۰ در ۷ دقیقه) بهترین وضعیت جنبایی را داشت. این نتایج نشان می‌دهد که سانتریفوژ تأثیر زیانبار چندان بر ساختار اسپرم نداشته است. نقص در سلامت اسپرم نفوذ اسپرم به اووسیت را مختل می‌کند (Aitken, 1995). سانتریفوژ می‌تواند به غشاء پلاسمایی اسپرم آسیب برساند (Aurich *et al.*, 2005). سانتریفوژ با دور ۶۰۰ به مدت ده دقیقه و یا دور ۹۰۰ به مدت ده دقیقه (Pagl *et al.*, 2006) سبب آسیب به زنده‌مانی و سلامت اسپرم شده است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد سانتریفوژ با دوره‌های بالاتر از ۵۰۰ (به جز تیمار  $2000 \times g$  در ۷ دقیقه)، حذف پلاسمای منی و به دنبال آن رقیق کردن اسپرم با رقیق‌کننده تازه سبب آسیب به غشاء اسپرم اسب خزر پس از سانتریفوژ و نیز پس از سرد کردن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت نشده است. در این پژوهش درصد بازیافت اسپرم اسب خزر با افزایش نیروهای سانتریفوژ افزایش یافته است. درصد بازیافت اسپرم اسب خزر در تیمار  $500 \times g$  در زمان‌های ۴ و ۷ دقیقه به ترتیب ۴۴/۴۹ و ۵۵/۰۶ درصد کل یاخته‌های اسپرم پیش از سانتریفوژ بود. این میزان بازیافت در مقایسه با بررسی‌های دیگر با دوره‌های  $400 \times g$  به مدت ده دقیقه (۶۷٪) و  $650 \times g$  به مدت پانزده دقیقه (۷۰٪) اختلاف داشت (Cochran *et al.*, 1984). تفاوت در درصد بازیافت این بررسی در مقایسه با این پژوهش را می‌توان با حجم مایع رویی حذف‌شده پس از سانتریفوژ توضیح داد. به نظر

## بحث

برخی از بررسی‌ها تأثیر منفی سانتریفوژ (آسیب به غشای اسپرم) بر تحرک اسپرم اسب را گزارش کرده‌اند (Cochran *et al.*, 1984; Jasko *et al.*, 1991) برخی دیگر تأثیر منفی از سانتریفوژ بر تحرک و زنده‌مانی اسپرم گزارش نکرده‌اند (Ferre *et al.*, 2004; Jasko *et al.*, 1992). در این پژوهش تحرک کل اسپرم اسب خزر پس از سرد کردن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۵ درجه سلسیوس در تیمارهای ۱ تا ۵ اختلاف معنی‌داری نشان نداد، اما با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ( $P \leq 0.05$ ). همچنین تحرک پیش‌رونده تحت تأثیر سرد کردن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفت و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت سرد کردن، تیمار  $1000 \times g$  دور در ۷ دقیقه بیشترین تحرک پیش‌رونده را به خود اختصاص داد. در پژوهشی منی رقیق‌شده را با دور  $900 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کردند و کاهش در تحرک اسپرم پس از سانتریفوژ گزارش نکردند (Ferre *et al.*, 2004). بخشی از کاهش در تحرک اسپرم به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (reactive oxygen species: ROS) در پلاسمای منی برمی‌گردد (Parinaud *et al.*, 1997). با افزایش زمان سرد کردن از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت، تحرک پیش‌رونده اسپرم در همه تیمارهای آزمایشی کاهش یافته است. با گذشت زمان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در پلاسمای منی افزایش می‌یابد. افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در پلاسمای منی سبب اکسایش (اکسیداسیون) اسیدهای چرب غشاء اسپرم شده و روانی غشاء کاهش می‌یابد. به دنبال کاهش روانی غشاء، تحرک اسپرم کاهش می‌یابد و می‌توان

اسپرم اسب خزر را با دوره‌های بالاتر بدون تأثیر زیانبار بر اسپرم و با درصد بازیافت بالاتر سانتریفوژ کرد. همچنین باتوجه به اینکه، در تیمار بدون سانتریفوژ شمار یاخته متحرک و اسپرم سالم کمتری مشاهده شد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که سانتریفوژ در فرآیند سرد کردن منی اسب خزر می‌تواند سودمند باشد.

می‌رسد در این پژوهش، مایع رویی بیشتری در مقایسه با تحقیق Cochran *et al.* (1984) حذف شد، در نتیجه یاخته‌های بیشتری در مایع رویی حذف شده است که موجب کاهش درصد بازیافت شده است. علت دیگر اختلاف در درصد بازیافت بررسی‌های مختلف، احتمال دارد به دلیل روش‌های مختلف مورد استفاده برای شمارش یاخته باشد.

### سیاسگزاری

از همه همکارانی که در مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور که ما را در اجرای این تحقیق یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

### نتیجه‌گیری کلی

بر پایه بررسی‌های پیشین، منی رقیق‌شده اسب با دوره‌های سانتریفوژ  $400 \times g$  و  $600 \times g$  سانتریفوژ می‌شود. اما نتایج این پژوهش نشان داد، می‌توان

### REFERENCES

- Aitken, R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 659-668.
- Aurich, C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 89(1), 65-75.
- Brinsko, S. P., Crockett, E. C. & Squires, E. L. (2000). Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, 54(1), 129-136.
- Cochran, J. D., Amann, R. P., Froman, D. P. & Pickett, B. W. (1984). Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, 22(1), 25-38.
- Ferrer, M. S., Paccamonti, D., Eilts, B. E., Lyle, S. K., Aljarrah, A. H. & Devireddy, R. V. (2004). Improvement of sperm recovery rates after centrifugation of stallion semen. In: *Proceeding of Annu Conf SFT/ACT*.
- Jasko, D. J., Hathaway, J. A., Schaltenbrand, V. L., Simper, W. D. & Squires, E. L. (1992). Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 37(6), 1241-1252.
- Jasko, D. J., Moran, D. M., Farlin, M. E. & Squires, E. L. (1991). Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, 35(6), 1059-1067.
- Jasko, D. J. (1992). Evaluation of stallion semen. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 8(1), 129-148.
- Kareskoski, A. M., Reilas, T., Andersson, M. & Katila, T. (2006). Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 33-38.
- Parinaud, J., Le Lannou, D., Vieitez, G., Griveau, J. F., Milhet, P. & Richoille, G. (1997). Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit®) following ejaculation. *Human Reproduction*, 12(11), 2434-2436.
- Pagl, R., Aurich, J. E., Müller-Schlösser, F., Kankofer, M. & Aurich, C. (2006). Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 C. *Theriogenology*, 66(5), 1115-1122.
- Ritar, A. J. & Salamon, S. (1982). Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 35(3), 305-312.
- Varner, D. D., Blanchard, T. L., Love, C. L., Garcia, M. C. & Kenney, R. M. (1987). Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, 28(5), 709-723.