

استخراج لیپوپروتئین با چگالی کم از زرده تخم مرغ و مقایسه آن با لستین سویا و رقیق کننده تجاری آندروم در انجمادپذیری اسپرم گاو

- ایرج اشرفی: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- حسین دقیق کیا*: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- غلامعلی مقدم: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- عادل صابری وند: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: مهر 1395 تاریخ پذیرش: دی 1395

چکیده

در طی فرآیند انجماد ساختارهای بیوشیمیایی و آناتومیکی سلول اسپرم تحت تاثیر قرار می گیرد. لذا استفاده از مواد محافظ شوک سرما در محیط انجماد، ضروری ترین بخش در فرآیند انجماد اسپرم می باشد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر استفاده از سطوح مختلف لیپوپروتئین با چگالی کم (6، 8 و 10 درصد) و سطوح مختلف لستین سویا به عنوان ماده محافظ شوک سرما، در مقایسه با رقیق کننده تجاری آندروم بر اسپرم های منجمد-یخ گشایی شده گاو هلشتاین می باشد. در این تحقیق از 3 رأس گاو هلشتاین دو بار در هفته توسط واژن مصنوعی اسپرم گیری شد. جهت از بین بردن اثرات فردی دام ها، انزال ها به نسبت مساوی با هم مخلوط شدند. نمونه های رقیق شده منی بعد از سردسازی و پر شدن در پایوت ها، منجمد شده و در ازت مایع نگهداری شدند. نتایج بعد از یخ گشایی نشان داد که بین سطوح مختلف LDL و همچنین سطوح مختلف لستین سویا اختلاف معنی داری از نظر پارامترهای ارزیابی شده وجود ندارد. استفاده از رقیق کننده آندروم موجب بهبود معنی دار پارامترهای کنتیکی و جنبایی، زنده مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در سطوح مختلف LDL شد ($P < 0/05$). جنبایی پیش رونده در سطوح 1، 1/5 و 2 درصد لستین به طور معنی داری پایین تر از آندروم بود. اختلاف معنی داری در زنده مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی سطوح مختلف لستین و رقیق کننده آندروم مشاهده نشد. به طور کلی می توان رقیق کننده حاوی 3 درصد لستین سویا نتایج مشابهی با رقیق کننده تجاری آندروم داشت.

کلمات کلیدی: انجماد اسپرم، لیپوپروتئین با چگالی کم، لستین سویا، آندروم، گاو هلشتاین

مقدمه

سردسازی، دوره تعادل دهی، روش انجماد و یخ گشایی، گروه های واکنش اکسیدانی و کنترل بهداشت روی عمر سلول اسپرم اثر گذاشته، و جهت کسب نتایج رضایت بخش تعادل بین این عوامل، مهم می باشد (Bailey و همکاران، 2000).

در جریان فرآیند انجماد-ذوب، شوک سرمایی به شدت فسفولیپیدها و گلیکوپروتئین های موجود در سطح غشا را تحت تاثیر قرار داده و باعث شروع آسیب های ساختاری و بیوشیمیایی می شود. برای جلوگیری از این آسیب به اسپرم ها، علاوه بر مواد محافظ درون سلولی، به مواد محافظ خارج سلولی نیز نیاز خواهد داشت. این مواد عمدتاً لیپوپروتئین ها و پروتئین های موجود در منابعی همچون زرده تخم مرغ، شیر و منابع گیاهی مثل شیره سویا و شیر نارگیل است. این مواد با عمل بر روی غشاء سلولی، اسپرم را در برابر شوک سرما محافظت می کند. استفاده از مواد

بانک های ذخیره اسپرم، می توانند همراه با دیگر تکنولوژی های تولیدمثلی، در بهبود نژادها و حفاظت گونه های وحشی و بومی در حال انقراض، نقش داشته باشند. انجماد اسپرم، امکان قرنطینه کردن آن، انتقال آن به مکان های دورتر، کنترل بیماری ها و حفظ بانک های ژنتیکی را ممکن ساخته (Barbas و Mascarenhas، 2009) و به طور کلی حفاظت از انجماد اسپرم همراه با سایر تکنیک های کمک کننده به تولیدمثل، کاربرد فراوانی در جهت حل مشکلات باروری حیوانات آزمایشگاهی، دامی و انسان داشته و خواهد داشت (Spungin و Breitbart، 1997). در مراحل حفاظت از انجماد سلول اسپرم، عوامل کلیدی زیادی نظیر ترکیب پلاسمای منی، ترکیب شیمیایی رقیق کننده ها، نوع و غلظت حفاظت کننده های انجمادی، دمایی نگهداری، میزان



تخم مرغ به طور طبیعی حاوی آلودگی هایی است که می تواند از طریق رقیق کننده های منی باعث انتقال آن شود (Gil و همکاران، 2003). این آلودگی ها نه تنها قادر به انتقال یک بیماری بوده بلکه میکروارگانیسم های موجود در آن ها با تولید سمومی می تواند بر روی اسپرم تاثیر گذاشته و باعث مرگ آن ها شوند (Bousseau و همکاران، 1998). Moussa و همکاران (2002) نشان دادند که حضور یکسری مواد در زرده تخم مرغ می تواند باعث ممانعت از تنفس اسپرم شده تحرک و زنده ماندن آن را کاهش دهد و این امر سبب شده است که تقاضا برای جایگزین کردن زرده با بخش موثر آن افزایش یابد. Anel و همکاران (2006) گزارش دادند که سویا حاوی مقدار بالایی از فسفولیپیدهای شبیه زرده تخم مرغ است. لستین در حدود 10 درصد از فسفولیپیدهای زرده را تشکیل می دهد و با توجه به حضور فسفولیپیدهای مشابه زرده در سویا می توان از آن به عنوان یک جایگزین گیاهی مناسب استفاده نمود (Fukui، 2008). استفاده از منابع جایگزین گیاهی این امکان را به وجود می آورد که حذف منابع آلودگی به طور کامل صورت گیرد (Bansal و Bilaspuri، 2011).

منابع گیاهی همچون عصاره سویا دارای اثر محافظتی بهتری در مقایسه با زرده تخم مرغ بوده و ساختار اسپرم در این رقیق کننده ها کمتر تحت تاثیر صدمات ناشی از آسیب سرمایی قرار می گیرند (Hinsch و همکاران، 1997). با گذشت زمان رقیق کننده های گیاهی نیز دچار تغییراتی شده اند. این تغییرات در جهت بهبود باروری اسپرم ایجاد شده است. به هر حال اطلاعات دقیقی در مورد این تغییرات در دسترس نیست و همه آن ها با فرمول های بسته به بازار عرضه می شوند. یکی از این رقیق کننده ها اندروم نام دارد که ساخت شرکت minitüb می باشد. بنابراین در این مطالعه سعی شده است با استخراج دقیق و استاندارد LDL از زرده تخم مرغ، اثرات محافظتی LDL و سطوح مختلف لستین سویا در مقایسه با رقیق کننده تجاری اندروم بر خصوصیات میکروسکوپی اسپرم منجمد-بخشایشی شده گاو مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

استخراج LDL از زرده تخم مرغ: تخم مرغ های تازه از یک گله که جیره غذایی یکسان داشتند جمع آوری شدند. تخم مرغ ها به صورت دستی شکسته شده و زرده از آلبومین جدا شد. هر یک از زرده ها به دقت روی کاغذ صافی غلط داده شدند تا شالاز و باقیمانده های آلبومین از غشای ویتلین جدا شود. سپس ویتلین شکاف داده شده و زرده در بشری که داخل آب یخ قرار دارد جمع آوری شد.

جداسازی پلاسما زرده تخم مرغ: ابتدا زرده با محلول ایزوتونیک سالین (0/17 مولار NaCl) رقیق شده (W/W) و به مدت یک ساعت توسط همزن مگنتی بهم زده شد. سپس به مدت 45 دقیق با دور 10000xg در دمای 10°C سانتریفیوژ شد. سپس پلاسما بار دیگر به منظور حذف کامل گرانول ها سانتریفیوژ شد و پلاسما در دمای 4°C نگه داشته شد.

محافظتی در غلظت های پایین ممکن است که برای حفاظت از اسپرم کافی نبوده و غلظت بالای آن ها نیز ممکن است که برای اسپرم سمی باشد (Maxwell و Salamon، 1995). اطلاعات دقیقی در خصوص مکانیسم دقیق تاثیر زرده تخم مرغ بر روی اسپرم در دسترس نمی باشد و فرضیه های متنوعی درباره این اثر وجود دارد. لیپوپروتئین های با چگالی کم (LDL یا Low density lipoprotein) بخش تاثیرگذار زرده تخم مرغ به شمار می آیند که در طی فرایند انجماد-ذوب با اتصال به غشای اسپرم باعث مقاومت اسپرم در برابر آسیب های حرارتی می شود (Watson، 1976). به هر حال نقش کامل پروتئین ها و لیپیدهای موجود در LDL در برقراری پیوند و ارتباط با غشای اسپرم هنوز به طور کامل مشخص نشده است. LDL حاوی مقادیری فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل سرین است که در طی فرایند انجماد-ذوب به طور مرتب جایگزین فسفولیپیدهای از دست رفته غشای اسپرم می شوند (Graham و Foot، 1987). فسفولیپیدها می توانند یک پرده محافظتی در اطراف غشای اسپرم تشکیل دهند. این پرده محافظتی در زمان شکسته شدن مولکول های LDL به وجود می آید (Trimeche و همکاران، 1996). جذب و ژلاتینه شدن آپوپروتئین های LDL در اطراف غشای اسپرم، باعث تشکیل یک غشای محافظتی در مقابل کریستال های یخ در اطراف غشای اسپرم شود (Moussa و همکاران، 2002). فرضیه دیگر این است که لیپوپروتئین های با چگالی کم (LDL) برای اتصال به غشای اسپرم با پیپتیدهای کاتیونیک موجود در پلاسما منی رقابت می کند. این پیپتیدها با وزن مولکولی کمتر از 5 کیلو دالتون، با اتصال به غشای اسپرم می توانند باعث خارج شدن کلسترول از سطح غشا شوند (Vaupel، 1973). علی رغم اثرات بسیار مثبت زرده تخم مرغ برای محافظت از اسپرم، در سال های اخیر پژوهشگران به دنبال راهکاری برای حذف و یا کاهش مقدار زرده تخم مرغ در رقیق کننده های منی پستانداران هستند. مهم ترین بخش موجود در زرده تخم مرغ لیپوپروتئین های با چگالی کم هستند. مقدار این لیپوپروتئین ها در زرده می تواند متغیر باشد و عواملی همچون وراثت، تغذیه، تعداد روزهای تخم گذاری مرغ و شرایط نگهداری تخم مرغ مقدار آن ها را تحت تاثیر قرار دهد. این امر سبب شده است تا تهیه غلظت های استاندارد از زرده تخم مرغ در رقیق کننده های انجماد منی با مشکل روبرو شود و رقیق کننده های حاوی زرده تخم مرغ به عنوان یک رقیق کننده غیر استاندارد شناخته شوند. با افزایش غلظت زرده تخم مرغ در رقیق کننده، اگرچه درصد اسپرم های زنده و متحرک افزایش می یابد ولی درصد اسپرم های با آکروزام سالم کاهش می یابد (Fukui و همکاران، 2008). ناحیه آکروزم اسپرم، مهم ترین بخش شرکت کننده اسپرم در عمل لقاح است. بنابراین اسپرم هایی که آکروزم آن ها آسیب دیده باشد به عنوان اسپرم های غیر بارور تلقی می شوند (Amirat و همکاران، 2004). کاهش سلامت آکروزام در اثر افزایش غلظت زرده تخم مرغ، در گونه های بز (Ritar و Salamon، 1991)، قوچ (Watson و Martin، 1975) و گاو میش (Kumar و همکاران، 1993) ثابت شده است. علاوه بر این زرده

مایع (دمای 196°C) انتقال یافته و تا زمان یخ‌گشایی در این دما نگهداری شدند (Ashrafi و همکاران، 2013).

ارزیابی اسپرم بعد از یخ‌گشایی-ارزیابی تحرک اسپرم: بعد از یخ‌گشایی (40 ثانیه در حمام آب گرم حاوی دمای 37°C)، فراسنج‌های تحرک کلی (TM)¹، تحرک پیش‌رونده (PM)²، سرعت در مسیر منحنی (VCL)³، سرعت در مسیر عرضی زنش (VAP)⁴، راستی مسیر طی شده (STR)⁵، تناوب عرضی زنش (BCF)⁶، سرعت در مسیر مستقیم (VSL)⁷، جنبایی عرضی سر (ALH)⁸ و خطی بودن جنبایی (LIN)⁹ ارزیابی شدند. ابتدا نمونه‌ها یخ‌گشایی شده و جهت تطابق‌پذیری و بازگشت آب درون-سلولی، به مدت 5 دقیقه در دمای 37°C حمام آب گرم انکوبه شدند. سپس 5 میکرولیتر از نمونه روی لام از قبل گرم شده (در دمای 37°C) قرار داده و بعد از پوشش با لام، روی صفحه گرم میکروسکوپ قرار داده شد. از هر نمونه حداقل 10 فیلد به‌طور کاملاً تصادفی انتخاب و تعداد 200 اسپرم به‌وسیله سیستم کاسا (CASA, Video Test Sperm 3.1 Russia) با بزرگ‌نمایی $\times 10$ آنالیز شد.

درصد زنده‌مائی اسپرم: این تست به‌وسیله روش رنگ-آمیزی آنوزین-نیگروزین ارزیابی شد. ابتدا 5 میکرولیتر از نمونه منی با 5 میکرولیتر رنگ (آنوزین 16/7 گرم/لیتر آب مقطر، نیگروزین 100 گرم/لیتر آب مقطر، بافر سیترات 29 گرم/لیتر آب مقطر) روی لام به آرامی مخلوط و با لام دیگری گسترش تهیه شد. جهت خشک کردن، نمونه گسترش یافته به مدت سه دقیقه در دمای 37°C قرار گرفت. تعداد 200 اسپرم به‌وسیله میکروسکوپ نوری و روغن ایمرسیون با بزرگ‌نمایی $\times 1000$ آنالیز شد. اسپرم‌هایی که به‌طور کلی و جزئی رنگ قرمز مایل به بنفش به خود گرفته بودند مرده و اسپرم‌هایی که رنگ به‌خود نگرفته بودند زنده محسوب شدند (Maxwell و Evans، 1987).

تست یکپارچگی غشای پلاسمایی (تست HOST): این تست برای بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول اسپرم به کار گرفته شد. ابتدا 50 میکرولیتر از نمونه منی به‌آرامی با 500 میکرو لیتر محلول هیپواسموتیک همدا (حاوی 9 گرم/لیتر فروکتوز، 4/9 گرم/لیتر سیترات سدیم) مخلوط و به مدت 60 دقیقه در حمام آب گرم (37°C) انکوبه شد. سپس مقدار 5 میکرولیتر از نمونه مخلوط شده و روی لام از پیش همدا شده قرار گرفته و با لام پوشانده شد. لام روی صفحه گرم میکروسکوپ فاز کنتراست قرار داده شد. تعداد 200 اسپرم با بزرگ‌نمایی $\times 400$ شمارش و درصد اسپرم با دم متورم و تاب خورده (طبیعی) تعیین و به‌عنوان درصد پاسخ به محلول هیپواسموتیک ثبت شد (Mrode و Revell، 1994).

استخراج LDL: پلاسما با سولفات آمونیوم 40% مخلوط

شده و به مدت یک ساعت به هم زده شد تا لیوتین رسوب کند. در طی این مرحله pH بر روی 8/7 و دما در 4°C ثابت و تحت کنترل بود. سپس به مدت 45 دقیقه با دور $10000 \times \text{g}$ در دمای 10°C سانتریفیوژ شد تا محلول رویی از رسوب جدا شود. سپس محلول رویی به مدت حداقل 6 ساعت دیالیز شد تا سولفات آمونیوم کاملاً حذف شود. محلول باقی مانده دوباره طبق مراحل قبل سانتریفیوژ شده و باقی مانده شناور که سرشار از LDL بود جمع آوری گردید (Moussa و همکاران، 2002).

جمع‌آوری منی: در این تحقیق از سه رأس گاو هلشتاین (با شرایط محیطی، تغذیه‌ای و نگهداری یکسان) با استفاده از واژن مصنوعی دو بار در هفته اسپرم‌گیری شد. برای از بین بردن اثرات فردی دام‌های نر، به تعداد مساوی از سلول‌های اسپرم هر سه رأس دام نر در هر تکرار آزمایشی مخلوط و استفاده شدند. تمام اجزای واژن مصنوعی به مدت حداقل یک ساعت در دمای 40°C گرم شدند. دمای داخلی واژن مصنوعی 42°C بود و همچنین برای سهولت دخول آلت تناسلی دام‌نر، سطح داخلی واژن با وازلین آغشته شده بود. نمونه‌های منی جمع‌آوری شده بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب 34°C قرار داده شدند. نمونه‌ها از نظر حجم، رنگ، عدم آلودگی به ادرار و خون، غلظت و تحرک پیش‌رونده بررسی شده و نمونه‌های منی دارای رنگ کرمی تیره، حجم بین 5-12 میلی‌لیتر، غلظت بیش‌تر از یک میلیارد اسپرم در هر یک میلی‌لیتر نمونه منی و تحرک پیش‌رونده بالاتر از 70 درصد در این تحقیق استفاده شد. غلظت اسپرم به وسیله دستگاه فتومتر و درصد تحرک پیش‌رونده با سیستم کاسا تعیین شد (Gil و همکاران، 2003).

تهیه رقیق‌کننده: در این تحقیق از یک رقیق‌کننده تجاری آندروم و هفت رقیق‌کننده بر پایه تریس که 100 میلی‌لیتر این محلول حاوی 2/42 گرم تریس، 1/48 گرم اسیدسیتریک، 1 گرم فروکتوز، 6/4 میلی‌لیتر گلیسرول، 50 میکرولیتر جنتامایسین، 30 میکرولیتر لینکوپیک و 2/5 میکرولیتر تابلوزین و درصدهای مختلف لستین سوپا (سیگما، P3644) (1، 1/5، 2 و 3%) و یا درصدهای مختلف LDL (6، 8 و 10%) بود استفاده شد.

اعمال تیمار، سردسازی، تعادل، بسته‌بندی و انجماد: پس از ارزیابی اولیه، نمونه‌های منی با غلظت 50 میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده به فالكون‌های حاوی رقیق‌کننده-های مختلف اضافه شده و در پایوت‌های 0/5 میلی‌لیتر پر و بسته بندی شدند. پایوت‌ها روی راک چیده شده به دمای 5°C منتقل شدند و پس از سیری کردن 2 ساعت زمان تعادل در این دما توسط دستگاه نیمه اتوماتیک انجماد اسپرم منجمد شده و به تانک ازت

⁶- Beat cross frequency (Hz) (BCF)

⁷- Straight – line velocity (micron/sec) (VSL)

⁸- Lateral head displacement (micron) (ALH)

⁹-Linearity (%) (LIN= VSL/VCL $\times 100$)

¹- Total Motility

²-Progressive Motility

³- Curvilinear velocity (micron/sec) (VCL)

⁴- Average path velocity (micron/sec) (VAP)

⁵- Sperm track straightness (%) (STR)



آنالیز آماری: این مطالعه در 5 تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی به کمک نرم افزار SAS رویه GLM تجزیه و تحلیل گردید. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن انجام گرفت. سطح معنی‌داری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد. مدل آماری این طرح عبارت بود از:

$$Y_{ij} = \mu + \text{Treat}_i + e_{ij}$$

که در این مدل، Y_{ij} برابر است با داده مشاهده شده برای فراسنجه-های اندازه‌گیری شده، μ = میانگین جامعه، Treat_i = اثر تیمار i ام برابر است با اثر تیمار و e_{ij} = اثر باقی‌مانده یا خطا بود.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها برای پارامترهای تحرک در جدول 1 آمده است. نتایج نشان داد در مقایسه سطوح مختلف LDL با یکدیگر و همچنین مقایسه سطوح مختلف لستین سویا با یکدیگر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. استفاده از رقیق‌کننده آندروم موجب بهبود معنی‌دار ($P < 0/05$) تمامی پارامترها کنتیکی و جنبایی نسبت به سطوح مختلف LDL شد. البته اختلاف رقیق‌کننده LDL6 با آندروم در پارامتر تناوب عرضی زنش معنی‌دار نیست. اختلاف معنی‌داری در پارامتر جنبایی کل بین رقیق‌کننده آندروم و سطوح مختلف لستین مشاهده نشد. راستی

مسیر طی شده، سرعت در مسیر منحنی و جنبایی عرضی سر در رقیق‌کننده آندروم به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) بیش‌تر از سطوح مختلف لستین است. همچنین پارامترهای جنبایی پیش-رونده، سرعت در مسیر مستقیم و میانگین سرعت در مسیر رقیق‌کننده آندروم به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) بیش‌تر از سطوح 1، 1/5 و 2 درصد لستین است ولی این اختلاف با سطح 3% لستین معنی‌دار نیست. رقیق‌کننده آندروم موجب بهبود معنی‌دار ($P < 0/05$) درصد خطی بودن جنبایی نسبت به سطح 2% لستین و تناوب عرضی زنش نسبت به سطوح 2 و 3% لستین می‌شود در حالی که این اختلاف با سایر سطوح لستین در مورد پارامترهای مذکور معنی‌دار نیست. پارامتر درصد جنبایی کل در رقیق‌کننده LDL 8 به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر گروه‌های تیماری است ولی اختلاف معنی‌داری بین سطوح 6 و 10 درصد LDL نسبت به سطوح مختلف لستین مشاهده نشد. با این‌که اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف LDL و سطوح مختلف لستین در مورد صفات راستی مسیر طی شده، درصد خطی بودن جنبایی و تناوب عرضی زنش مشاهده نشد ولی سطوح مختلف رقیق‌کننده‌های لستین نسبت به رقیق‌کننده‌های LDL موجب بهبود معنی‌دار ($P < 0/05$) سایر صفات کنتیکی شد.

جدول 1: مقایسه پارامترهای تحرکی و کنتیکی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاو توسط رقیق‌کننده آندروم و رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح مختلف لستین سویا و LDL

صفات	LDL 6	LDL 8	LDL 10	لستین 1	لستین 1/5	لستین 2	لستین 3	آندروم
جنبایی (درصد)	87/8 ± 3/2 ^{bc}	83/1 ± 6/4 ^c	87/8 ± 4/6 ^{bc}	91/0 ± 1/8 ^{ab}	90/5 ± 1/4 ^{ab}	89/2 ± 4/0 ^{ab}	92/5 ± 0/8 ^{ab}	93/5 ± 1/4 ^a
جنبایی پیش‌رونده (درصد)	48/6 ± 4/3 ^c	47/7 ± 3/5 ^c	49/0 ± 7/2 ^c	59/9 ± 2/1 ^b	58/4 ± 7/0 ^b	58/1 ± 2/7 ^b	61/3 ± 2/9 ^{ab}	65/8 ± 2/8 ^a
راستی مسیر طی شده (درصد)	0/82 ± 0/03 ^b	0/79 ± 0/01 ^b	0/79 ± 0/02 ^b	0/81 ± 0/01 ^b	0/81 ± 0/02 ^b	0/81 ± 0/01 ^b	0/81 ± 0/01 ^b	0/84 ± 0/04 ^a
سرعت در مسیر منحنی (میکرون/ثانیه)	90/4 ± 6/0 ^c	90/9 ± 7/74 ^c	94/2 ± 12/5 ^c	114/1 ± 6/4 ^b	109/8 ± 13/6 ^b	113/5 ± 4/4 ^b	116/0 ± 8/0 ^b	127/2 ± 6/6 ^a
جنبایی عرضی سر (میکرون)	1/7 ± 0/08 ^c	1/7 ± 0/14 ^c	1/8 ± 0/21 ^c	2/1 ± 0/10 ^b	2/1 ± 0/17 ^b	2/2 ± 0/15 ^b	2/2 ± 0/12 ^b	2/4 ± 0/18 ^a
سرعت در مسیر مستقیم (میکرون/ثانیه)	39/8 ± 2/9 ^c	40/9 ± 3/8 ^c	41/0 ± 5/7 ^c	51/2 ± 5/3 ^b	48/9 ± 7/2 ^b	50/5 ± 3/0 ^b	53/5 ± 2/9 ^{ab}	58/4 ± 3/2 ^a
سرعت در مسیر میانگین (میکرون/ثانیه)	46/1 ± 3/4 ^c	47/0 ± 3/7 ^c	47/4 ± 6/5 ^c	57/9 ± 5/5 ^b	55/6 ± 7/7 ^b	57/0 ± 2/9 ^b	60/3 ± 2/8 ^{ab}	65/8 ± 3/6 ^a
میزان خطی بودن جنبایی	0/413 ± 0/03 ^b	0/397 ± 0/01 ^b	0/396 ± 0/03 ^b	0/401 ± 0/02 ^{ab}	0/404 ± 0/02 ^{ab}	0/391 ± 0/01 ^b	0/416 ± 0/02 ^{ab}	0/434 ± 0/03 ^a
تناوب عرضی زنش (هرتز)	15/5 ± 0/5 ^{ab}	15/1 ± 0/2 ^b	15/1 ± 0/4 ^b	15/5 ± 0/3 ^{ab}	15/5 ± 0/9 ^{ab}	15/0 ± 0/5 ^b	15/1 ± 0/6 ^b	16/0 ± 0/3 ^a

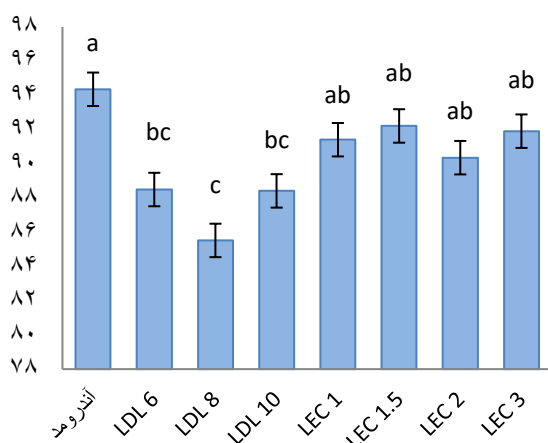
حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح است ($P < 0/05$)

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها برای پارامتر زنده‌مانی در شکل 1 و برای پارامتر یکپارچگی غشای پلاسمایی در شکل 2 آمده است. در مقایسه سطوح مختلف LDL با یکدیگر و همچنین

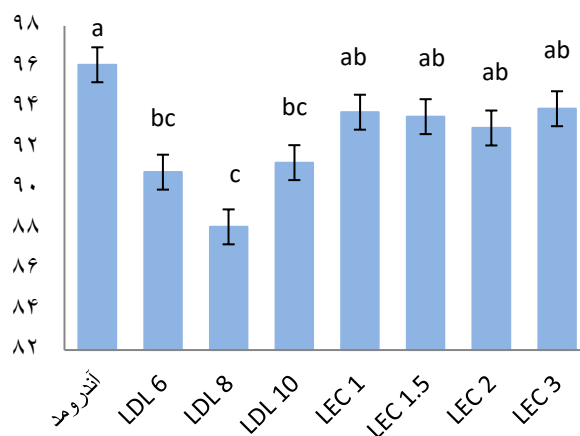
مقایسه سطوح مختلف لستین سویا با یکدیگر اختلاف معنی‌داری برای هر دو پارامتر مذکور مشاهده نشد. رقیق‌کننده آندروم موجب بهبود معنی‌دار ($P < 0/05$) هر دو پارامتر نسبت



سایر رقیق‌کننده‌ها شد. همچنین رقیق‌کننده LDL8 به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی کم‌تری نسبت به سایر رقیق‌کننده‌ها را به‌همراه داشت.



شکل 2: نمودار مقایسه درصد یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاو توسط رقیق‌کننده آندروم و رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح مختلف لستین سویا و LDL.



شکل 1: نمودار مقایسه درصد زنده‌مانی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاو توسط رقیق‌کننده آندروم و رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح مختلف لستین سویا و LDL.

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح است ($P < 0/05$)

بحث

در این مطالعه با توجه به مزیت‌های استفاده از LDL به جای زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده انجماد اسپرم، لیوپروتئین‌های با چگالی کم از زرده تخم‌مرغ استخراج شده و اثرات آن در رقیق‌کننده بر پایه تریس برای انجمادپذیری اسپرم گاو مورد بررسی قرار گرفت. سطوح مختلف LDL نتایج خوبی را در ارتباط با پارامترهای جنابایی و کنتیکی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی بعد از انجماد به‌همراه داشتند. Pace و Graham (1974) زرده تخم‌مرغ را با استفاده از اولتراسانتریفیوژ خاص-سازی کردند و مشاهده نمودند که لیوپروتئین‌های با چگالی کم (LDL) اثر محافظتی بر روی غشای اسپرم دارند. محققین اثر محافظتی لیوپروتئین‌های با چگالی کم را بر روی غشای اسپرم در طی فرآیند انجماد-ذوب تأیید کرده‌اند (Moussa و همکاران، 2002). لیوپروتئین‌های با چگالی کم به‌خصوص بخش‌های فسفولیپیدی، قادرند با اتصال به غشای اسپرم باعث به‌تأخیر افتادن آسیب به فسفولیپیدهای غشا در موقع شوک سرمایی شده و در نتیجه باعث افزایش مقاومت آن‌ها در برابر این شوک شوند (Thun و همکاران، 2002). به‌هر حال نقش کامل پروتئین‌ها و لیپیدهای موجود در LDL در برقراری پیوند و ارتباط با غشای اسپرم هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است (Moussa و همکاران، 2002). لیوپروتئین‌های با چگالی کم که حدود 66% ماده جامد زرده تخم‌مرغ را تشکیل می‌دهند، در بخش محلول زرده یعنی پلاسما قرار دارند (Powrie و Nakai، 1986). LDL چگالی 0/982 گرم در میلی‌لیتر داشته و ساختار آن کروی شکل با شعاع 60-17 نانومتر است. حدود 83-89%

LDL مشتمل بر تری‌گلیسرید، فسفولیپید و کلسترول بوده و مابقی آن بخش پروتئینی است (Cook و Martin، 1969). فسفولیپیدها به‌خصوص فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل سرین نقش مهمی در استحکام ساختار LDL داشته و نقش محافظتی برای اسپرم ایفا می‌کنند (Foot و Graham، 1987). همچنین جذب و ژلاتینه شدن آپوپروتئین‌های LDL در اطراف غشای اسپرم، باعث تشکیل یک غشای محافظتی در مقابل کریستال‌های یخ در اطراف غشای اسپرم می‌شود (Tsutsui، 1988). حضور یکسری مواد در زرده، با ایجاد اختلال در تنفس سلولی، تحرک اسپرم را کاهش می‌دهد. استخراج بخش موثر زرده و اضافه کردن آن به رقیق‌کننده سبب حذف موانع تنفس سلولی می‌شود (Moussa و همکاران، 2002). در مطالعه‌ای که اثرات محافظتی LDL بر روی اسپرم گاو در طی دوره انجماد-ذوب، با به‌کارگیری سطوح مختلفی از LDL (2/5 تا 20 درصد در رقیق‌کننده‌ها) بررسی شده بودندشان داد که تحرک و خصوصیات حرکتی اسپرم در رقیق‌کننده‌های حاوی LDL به‌طور معنی‌داری نسبت به رقیق‌کننده تجاری تریلادیل [رقیق‌کننده تجاری بر پایه زرده تخم مرغ، گروه شاهد] بالاتر بود. اگرچه هر یک از غلظت‌های LDL پاسخ‌های متفاوتی را ایجاد کردند ولی غلظت‌های بین 5 تا 10 درصد بهترین نتایج در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند (Moussa و همکاران، 2002). Demianowicz و Strezek (1996) با جداسازی پلاسمای زرده تخم مرغ به دو بخش HDL و LDL (High density lipoprotein) نشان دادند که LDL محافظت بهتری را نسبت به زرده کامل برای اسپرم ایجاد می‌کند ولی HDL باعث کاهش معنی‌دار تحرک اسپرم نسبت به زرده کامل می‌شود.



رقیق کننده آندروم که حاوی لستین سویا است باعث افزایش توان تحرک اسپرم و درصد آبستنی بعد از تلقیح ماده گاوهای فحل می شود (Aires و همکاران، 2003).

در مطالعه حاضر تفاوت معنی داری بین سطوح 1، 1/5، 2 و 3 درصد لستین در پارامترهای ارزیابی شده مشاهده نشد. با این وجود مطالعات گذشته گزارش کرده اند که افزایش غلظت لستین بیش از حد مورد نیاز باعث کاهش قدرت باروری اسپرم می گردد که می تواند ناشی از افزایش ویسکوزیته و فشار اسمزی در پی استفاده از سطوح بیش تر لستین سویا باشد (Van و همکاران، 2000). در مطالعه حاضر بهترین نتایج حاصل از به کارگیری رقیق کننده آندروم در انجماد اسپرم بود. وجود ترکیبات ناشناخته مانند انواع آنتی اکسیدان ها در ترکیب رقیق کننده آندروم و همچنین اسمولاریته تنظیم شده این رقیق می توانند از دلایل برتری آندروم بر رقیق کننده هایی باشد که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.

منابع

1. Aires, V.A.; Hinsch, K.D.; Mueller-Schloesser, F.; Bogner, K.; Mueller-Schloesser, S. and Hinsch, E., 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. Vol. 60, pp: 269-279.
2. Amirat, L.; Jeanneau, L.; Thorin, C.; Gerard, O.; Courtens, J.L. and Anton, M., 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. Vol. 6, pp: 895-907.
3. Anel, L.; Alvarez, M.; Martinez-Pastor, F.; Garcia Macias, V. and Anel, E., 2006. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reprod Dom Anim*. Vol. 41, pp: 30-42.
4. Ashrafi, I.; Kohram, H. and Farrokhi Ardabili, F., 2013. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. Vol. 139, pp: 25-30.
5. Aurich, C.; Seeber, P. and Muller-Schlosser, F., 2007. Comparison of Different Extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 50c. *Reprod Dom Anim*. Vol. 42, pp: 445-448.
6. Bailey, J.L.; Bilodeau, J.F. and Cormier, N., 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*. Vol. 21, pp: 1-7.
7. Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S., 2011. Impacts of oxidative stresses and Antioxidants on semen functions. *Vet Med Int*. Vol. 686137, pp: 1-7.
8. Barbas, J.P. and Mascarenhas, R.D., 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. Vol. 10, pp: 49-62.
9. Bousseau, S.; Brillard, J.P.; Guienne, M.; Guerin, B.; Camus, A. and Lechat, M., 1998. Comparison of Bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of Bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. *Theriogenology*. Vol. 50, pp: 699-706.

در مطالعه حاضر تفاوت معنی داری بین سطوح 6، 8 و 10 درصد LDL در پارامترهای ارزیابی شده مشاهده نشد. با این وجود مطالعات گذشته گزارش کرده اند که افزایش غلظت LDL بیش از حد مورد نیاز باعث کاهش تحرک اسپرم می گردد. علت دقیق آن هنوز به طور کامل مشخص نیست، احتمالاً افزایش غلظت LDL باعث کاهش فشار اسمزی رقیق کننده می شود که با رسوب دادن فروکتوز و نمک های موجود این اتفاق می افتد. فرضیه دیگر این است که افزایش غلظت LDL تجمع و گردآمدگی آن ها را به دور هم افزایش داده و اثرات حفاظتی آن ها را کاهش می دهد (Moussa و همکاران، 2002).

لستین در حدود 10 درصد از فسفولیپیدهای زرده را تشکیل می دهد و با توجه به حضور فسفولیپیدهای مشابه زرده در سویا می توان از آن به عنوان یک جایگزین گیاهی مناسب استفاده نمود. استفاده از منابع جایگزین گیاهی امکان حذف منابع آلودگی را به طور کامل ممکن می سازد (Fukui و همکاران، 2008). به همین دلیل فسفولیپیدهای سویا می تواند به عنوان یک منبع لیپیدی گیاهی جایگزینی بهتری برای زرده تخم مرغ و یا LDL مستخرج از زرده تخم مرغ باشد. با گذشت زمان رقیق کننده های تجاری گیاهی نیز دچار تغییراتی شده اند، به هر حال اطلاعات دقیقی در مورد این تغییرات در دسترس نبوده و همه آن ها با فرمول های بسته به بازار عرضه می شوند. آندروم یکی از این رقیق کننده ها بوده و ساخت کشور آلمان است که تاکنون برای رقیق سازی و انجماد منی گاو (Aires و همکاران، 2003)، اسب (Aurich و همکاران، 2007)، گوسفند (Fukui و همکاران، 2008) و بز کوهی (Saragusty و همکاران، 2006) مورد استفاده قرار گرفته است. رقیق کننده آندروم که بر پایه بافر تریس می باشد حاوی لستین سویا، سیتریک اسید، قند و گلیسرول می باشد (Fukui و همکاران، 2008). مشخص نبودن ترکیب دقیق رقیق کننده های تجاری و همچنین هزینه های زیاد خرید آن، ما را بر آن داشت که با طراحی این آزمایش و تعیین درصد لستین مورد نیاز در رقیق کننده گامی را در راستای خودکفایی ساخت رقیق کننده گیاهی انجماد اسپرم برداشته شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد استفاده از سطوح مختلف لستین سویا (1 الی 3 درصد) در رقیق کننده انجماد اسپرم می تواند نتایج مشابه با رقیق کننده آندروم داشته باشد. براساس مرور منابع صورت گرفته تاکنون مطالعه ای مبنی بر مقایسه سطوح مختلف LDL و لستین سویا گزارش نشده است. نتایج این مطالعه نشان می دهد در اکثر پارامترهای ارزیابی شده سطوح لستین استفاده شده می تواند نتایجی حتی بهتر از LDL نیز به همراه داشته باشد. Gil و همکاران (2000) نشان دادند که محیط انجماد تجاری بایوسفوس پلاس که حاوی عصاره سویا می باشد باعث تحرک و خصوصیات حرکت اسپرم گاو را در مقایسه با محیط حاوی زرده تخم مرغ افزایش می دهد. Fukui و همکاران (2008) با استفاده رقیق کننده آندروم جهت انجماد سیمن قوچ گزارش دادند که درصد آبستنی و درصد بره زایی در میش های تلقیح شده با اسپرم منجمد شده در این رقیق کننده در مقایسه با رقیق کننده حاوی زرده تخم مرغ هیچ اختلاف معنی داری ندارد.

26. Saragusty, J.; Gacitua, H.; King, R. and Arav, A., 2006. Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered Gazelle species (*Gazelle gazelle* and *Gazelle dorcas*) and one subspecies (*gazelle acaiae*). *Theriogenology*. Vol. 66, pp: 775-784.
27. Thun, R.; Hurtado, M. and Jannet, F., 2002. Comparison of Biociphoc-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. Vol. 57, pp: 1087-1094
28. Trimeche, A.; Anton, M.; Renard, P.; Gandemer, G. and Tainturier, D., 1996. Egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*. Vol. 34, pp: 385-393.
29. Tsutsui, T., 1988. Functional properties of heat-treated egg yolk low density lipoprotein. *J. Food Sci.* pp: 1103-1106.
30. Vaupel, H., 1973. Tiefgefrierung von Schafbocksperma in Pelletform mit unterschiedlichen Abkühlverfahren vor dem Einfrieren. *Zuchthygiene*. Vol. 8, pp: 163-170
31. Van Wagtendonk-de Leeuw, A.M.; Haring, R.M.; Kaal Lansbergen, L.M. and den Daas, J.H., 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology*. Vol. 54, pp: 57-67.
32. Watson, P.F., 1976. The protection of ram and bull spermatozoa by low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 58C and deep freezing. *J Therm Biol*. Vol. 1, pp: 137-141.
33. Watson, P.F. and Martin, I.C., 1975. The influence of some fraction of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C. *Aust J Biol Sci*. Vol. 238, pp: 145-152.
10. Breitbart, H. and Spungin, B., 1997. The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod*. Vol. 3, pp: 195-202.
11. Cook, W.H. and Martin, W.G., 1969. Egg lipoproteins: in structural and functional aspects of lipoproteins in living system. *Academic Press*. pp: 579-615.
12. Demianowicz, W. and Strezek, J., 1996. The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reprod Dom Anim*. Vol. 31, pp: 279-280.
13. Evans, G. and Maxwell, W.M.C., 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths Sydney. 194 p.
14. Fukui, Y.; Kohno, H.; Togari, T.; Hiwasa, M. and Okabe, K., 2008. Fertility after artificial insemination using soybean based extenders in sheep. *J Reprod Dev*. Vol. 54, pp: 286-289.
15. Gil, J.; Januskauskas, A.; Haard, M.C.H.; Haard, M.G.M.; Johanisson, A. and Soderquist, L., 2000. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Triladyl. *Reprod Dom Anim*. Vol. 35, pp: 69-77.
16. Gil, J.; Rodriguez-Irazaqui, M.; Lundeheim, N.; Soderquist, L. and Rodriguez-Martinez, H., 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*. Vol. 59, pp: 1157-1170
17. Graham, J.K. and Foot, R.H., 1987. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*. Vol. 24, pp: 42-52.
18. Hinsch, E.; Hinsch, K.D.; Boehm, J.G.; Schill, W.B. and Mueller-Schloesser, F., 1997. Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg yolk-containing extenders. *Reprod Domest Anim*. Vol. 32, pp: 143-149.
19. Kumar, S.; Sahni, K.L. and Mohan, G., 1993. Effect of different extender formulations on acrosomal maintenance of buffalo spermatozoa frozen in milk, Tris and sodium-citrat dilutor. *Ind J Anim Sci*. Vol. 63, pp: 1233-1239.
20. Moussa, M.; Matinet, V.; Trimeche, A.; Tainturier, D. and Anton, M., 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. Vol. 57, pp: 1695-1706
21. Pace, M.M. and Graham, E.F., 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci*. Vol. 39, pp: 1144-1149.
22. Powrie, W.D. and Nakai S., 1986. The chemistry of eggs and egg products. In: Stademan WJ, Cotterill OJ, the Avi Publishing Company. pp: 97-139.
23. Revell, S.G. and Mrode, R.A., 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci*. Vol. 36, pp: 77-86.
24. Ritar, A.J. and Salamon, S., 1991. Effect of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angoras goat spermatozoa. *Small Rumin Res*. Vol. 4, pp: 29-37.
25. Salamon, S. and Maxwell, W.M.C., 1995. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*. Vol. 37, pp: 185-249

