

اثرات غلظت‌های مختلف رقیق‌کننده منی عاری از ترکیبات حیوانی بر ویژگی‌های اسپرم بز در شرایط سرد

- کاظم کریمی*: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی ورامین، ایران
- مهدی ژندی: گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: شهریور 1395 تاریخ پذیرش: آذر 1395

چکیده

یک حجم منی به‌دست آمده از 4 راس بز نژاد مهابادی 3-4 ساله در فصل تولیدمثلی در 20 حجم رقیق‌کننده بر پایه بافر تریس حاوی مقادیر 0/5، 1، 1/5، 2 و 2/5 درصد لسیتین سویا به‌عنوان افزودنی با منشأ غیرحیوانی و یک درصد زرده تخم‌مرغ به‌عنوان افزودنی با منشأ حیوانی مخلوط شد و اثرات افزودنی‌ها بر جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی، یک‌پارچگی غشاء و میزان اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیرطبیعی در 2، 6، 24 و 48 ساعت پس از نگهداری منی در دمای 4 درجه سانتی‌گراد بررسی شدند. نتایج نشان دادند که با افزایش زمان نگهداری میزان جنبایی کل و پیش‌رونده، یک‌پارچگی غشاء، زنده‌مانی و درصد اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند ($P < 0/05$). در زمان‌های مورد ارزیابی هیچ تفاوت معنی‌داری در جنبایی کل و پیش‌رونده و یک‌پارچگی غشاء بین رقیق‌کننده‌های مختلف وجود نداشت ($P > 0/05$). در 24 ساعت پس از نگهداری منی در شرایط سرد زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده حاوی 1/5 درصد لسیتین بیش‌تر از رقیق‌کننده حاوی 0/5 درصد لسیتین بود. در 6، 24 و 48 ساعت پس از نگهداری منی در شرایط سرد درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی در رقیق‌کننده حاوی 1/5 درصد لسیتین به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر رقیق‌کننده‌های حاوی زرده و برخی از سطوح مختلف لسیتین بودند ($P < 0/05$). با توجه به نتایج به‌دست آمده، رقیق‌کننده حاوی 1/5 درصد لسیتین سویا به‌عنوان رقیق‌کننده مناسب برای نگهداری اسپرم بز در شرایط سرد می‌باشد.

کلمات کلیدی: لسیتین سویا، رقیق‌کننده، اسپرم بز، شرایط سرد ذخیره

مقدمه

نگهداری اسپرم یک روش مناسب برای مطالعات آزمایشگاهی و تلقیح مصنوعی در دام‌های اهلی است و بخش اساسی و ضروری در فن‌آوری‌های تولیدمثل به‌حساب می‌آید. از این فن‌آوری در تولیدمثل، برای انتخاب دام نر دارای ارزش اصلاحی بالا و توزیع ژن‌های برتر در گله‌ها بدون در نظر گرفتن محدودیت زمانی و مکانی استفاده می‌شود (Maia, 2010). طی فرآیند نگهداری، عوامل مهمی مانند ترکیب پلاسمای منی (Alaud و همکاران، 1981)، ترکیب شیمیایی رقیق‌کننده‌ها، دمای نگهداری و میزان سردسازی، می‌تواند بر کیفیت و باروری اسپرم تأثیرگذار باشد. اضافه کردن نگهدارنده‌ها، مهم‌ترین و در حال حاضر اصلی‌ترین موضوع تحقیقات در دهه اخیر در مورد نگهداری اسپرم می‌باشد (Aitken و همکاران 1993).

هدف از اضافه کردن نگهدارنده به محیط‌های نگهداری، تأمین انرژی مورد نیاز سلول‌های اسپرم، حفاظت سلول‌ها از آسیب‌های دمایی، کاهش تنش‌های فیزیکی و شیمیایی ناشی از سرد کردن و در نهایت ایجاد یک محیط مناسب برای زنده‌ماندن اسپرم‌ها می‌باشد. وقتی که Philips و همکاران (1939) اثرات مثبت زرده تخم‌مرغ را برای ذخیره‌سازی منی پستانداران ثابت نمودند، زرده به‌عنوان یکی از اجزاء معمول در محیط انجماد اسپرم پستانداران مورد استفاده قرار گرفت. لیوپروتئین‌های با چگالی کم (LDL) بخش زرده تخم‌مرغ با اتصال به غشای اسپرم طی فرآیند نگهداری باعث بالا بردن مقاومت اسپرم در برابر آسیب‌های حرارتی می‌شود و اسپرم را در برابر تنش سرمایی محافظت می‌کند (Watson, 1976). همچنین LDL حاوی مقادیری فسفاتیدیل‌کولین و فسفاتیدیل سرین است که طی فرآیند انجماد-یخ‌گشایی به‌طور



این مطالعه میزان جنبایی، زنده‌مانی، وضعیت آکروزومی و توانایی لقاح آزمایشگاهی اسپرم در دو محیط انجماد بر پایه یک درصد لیسیتین سویا و محیط تجاری بایوکسل برابر بود. هدف از تحقیق حاضر بررسی و مقایسه نسبت‌های مختلف لیسیتین سویا به‌عنوان افزودنی با منشا غیرحیوانی و البته انتخاب بهترین نسبت از نظر اثرات محافظتی در شرایط سرد به‌عنوان رقیق‌کننده مناسب برای اسپرم بز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مکان و حیوانات مورد استفاده در آزمایش: در این تحقیق از منی چهار راس بز نژاد مه‌بادی با سن 4-3 سال استفاده شد. جمع‌آوری منی بزهای آموزش دیده به‌صورت هفتگی دوبار و در فصل تولدمتلی در مهرماه 1393 در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه تهران به‌مدت 4 هفته صورت گرفت. بلافاصله پس از جمع‌آوری منی و انتقال آن به آزمایشگاه دانشگاه تهران، بررسی‌های اولیه روی منی صورت گرفت.

تغذیه و مدیریت حیوانات مورد آزمایش: بزهای مذکور در یک جایگاه نیمه‌مسقف با کف سیمانی تحت شرایط نور طبیعی قرار گرفته و با جیره در حد نگهداری تغذیه شدند. در طول تحقیق بزها به‌صورت آزاد به آب و آجر معدنی دسترسی داشتند.

جمع‌آوری منی و ارزیابی پیش از نگهداری: نمونه‌های منی هفته‌ای دوبار به‌وسیله مهبل مصنوعی از بزهای مورد آزمایش جمع‌آوری شدند. قبل از نمونه‌گیری، مهبل‌ها شستشو و استریل شده و در حین جمع‌آوری نمونه، برای سهولت در دخول آلت حیوان سطح داخلی مهبل با ژل لغزنده آغشته گردید. فشار درون مهبل مصنوعی با باز کردن شیر و دمیدن هوا به‌درون محفظه تنظیم شده و برای جلوگیری از ایجاد شوک سرمایی به اسپرم‌ها، نمونه‌های منی تا زمان انتقال به آزمایشگاه، درون فلاسک عایق دارای آب 37 درجه‌سانتی‌گراد نگهداری و پس از اتمام نمونه‌گیری به‌سرعت به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب گرم با دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. حجم بین 2-0/75 میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از $10^9 \times 2/5$ اسپرم در میلی‌لیتر، جنبایی بیشتر از 70 درصد و مورفولوژی اسپرم غیرطبیعی کمتر از 10 درصد در هر انزال به‌عنوان نمونه طبیعی در نظر گرفته شد. سپس از نمونه‌های منی هر دام به یک مقدار مساوی در یک لوله آزمایش مجزا ریخته و با توجه به احتمال اثرات متقابل بین نمونه‌ها، نمونه‌های منی مخلوط شده نیز از نظر رنگ و جنبایی تقریبی ارزیابی مجدد شدند تا از سلامت نمونه برای انجماد اطمینان حاصل شود (Fazeli و همکاران، 2010).

مواد و محیط‌های آزمایش: برای ساخت رقیق‌کننده از یک محیط بر پایه تریس استفاده گردید. محیط پایه حاوی 27/1 گرم بر لیتر تریس، 14 گرم بر لیتر سیتریک اسید، 10 گرم بر لیتر فروکتوز و 1% لیسیتین سویا بود. برای ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم از محیط هاست (Hypo-osmotic swelling test (HOST) متشکل از 9 گرم بر لیتر فروکتوز، 4/9 گرم بر لیتر سترات سدیم استفاده شد که اسمولالیتی آن 100 میلی‌اسمول بود. برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ آمیزی انوزین- نیگروزین متشکل از 16/7 گرم در لیتر انوزین، 29 گرم در لیتر سترات سدیم و 100 گرم در لیتر رنگ‌نگروزین استفاده شد. برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی و اسپرم‌ها با آکروزوم غیرطبیعی از محلول هانکوک متشکل از 62/5 میلی‌لیتر فرمالین 37%، 150

مرتب جایگزین فسفولیپیدهای از دست‌رفته غشای اسپرم می‌شوند (Graham و Foote، 1987). با وجود اثرات بسیار مثبت زرده تخم‌مرغ برای رقیق‌سازی منی در تمامی گونه‌های پستانداران، در سال‌های اخیر استفاده از آن با مشکلاتی روبرو شده است و تلاش‌هایی برای حذف و یا کاهش مقدار آن در رقیق‌کننده‌ها صورت گرفته است. مهم‌ترین مشکلات زرده به‌عنوان یک افزودنی متغیر بودن میزان LDL موجود در آن، آلودگی‌های میکروبی قابل انتقال و تولید سموم میکروبی موثر بر افزایش مرگ اسپرم می‌باشند که باعث می‌شوند تا رقیق‌کننده‌های حاوی زرده تخم‌مرغ به‌عنوان رقیق‌کننده‌های غیراستاندارد شناخته شوند (Gil و همکاران، 2003؛ Bousseau و همکاران، 1998). همچنین Moussa و همکاران (2002) نشان دادند که حضور یک سری مواد در زرده تخم‌مرغ که می‌تواند باعث ممانعت از تنفس اسپرم شود جنبایی و زنده‌مانی اسپرم را کاهش می‌دهد. این امر سبب شده است که تقاضا برای جایگزین کردن زرده با بخش موثر آن یا دیگر مواد جایگزین افزایش یابد. یکی از اولین رقیق‌کننده‌های تجاری که در آن زرده تخم‌مرغ با یک نگهدارنده غیرحیوانی جایگزین شده است، بیوسیفوس پلاس (رقیق‌کننده حاوی عصاره سویا) نام دارد (Bousseau و Brillard، 1994). این رقیق‌کننده ساخت کشور فرانسه می‌باشد که برای انجماد اسپرم گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. Gil و همکاران (2000) نشان دادند که رقیق‌کننده تجاری بیوسیفوس باعث بهبود جنبایی و خصوصیات حرکتی اسپرم گاو در مقایسه با رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ می‌شود. منابع گیاهی همچون عصاره سویا، دارای اثر محافظتی بیشتری در مقایسه با زرده تخم‌مرغ است و ساختار اسپرم در این رقیق‌کننده‌ها کمتر تحت تأثیر صدمات ناشی از آسیب سرمایی قرار می‌گیرند (Hinsch و همکاران، 1997). Aires و همکاران (2003) نشان دادند که رقیق‌کننده آندروم باعث افزایش معنی‌دار درصد آبستنی در بیش از 20000 گاو فحل تلقیح شده با اسپرم منجمد شده با آن رقیق‌کننده در مقایسه با رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ شد. Fukui و همکاران (2008) در مقایسه رقیق‌کننده حاوی افزودنی گیاهی با رقیق‌کننده‌های حاوی زرده تخم‌مرغ نشان دادند که بین درصد آبستنی و درصد بره‌زایی در میش‌های تلقیح شده با اسپرم منجمد در دو رقیق‌کننده تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. بررسی اثر محافظتی لیپیدهای سویا بر کیفیت منی گاوهای وحشی اروپایی نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری در جنبایی، خصوصیات حرکتی و ریخت‌شناسی اسپرم بعد از انجماد-یخ‌گشایی در رقیق‌کننده‌های حاوی شیر سویا در مقایسه با زرده تخم‌مرغ وجود نداشت (Perez-Garnelo و همکاران، 2006). Agarwal و همکاران (2008) نشان دادند که لیسیتین سویا به‌عنوان یک ماده نگهدارنده قادر نیست همانند زرده باعث محافظت از اسپرم انسان طی فرآیند انجماد-یخ‌گشایی شود و کاهش معنی‌داری در جنبایی را به‌دنبال دارند. Forouzanfar و همکاران (2009) در مطالعه‌ای بر انجماد اسپرم قوچ با جایگزینی زرده تخم‌مرغ با لیسیتین سویا گزارش کردند که یک درصد لیسیتین سویا می‌تواند جایگزین زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده منی قوچ شود. Sharafi و همکاران (2009) در مطالعه‌ای بر انجماد اسپرم قوچ نشان دادند که غلظت یک درصد لیسیتین سویا اثرات محافظتی برابری با محیط تجاری بایوکسل به‌منظور انجماد اسپرم قوچ نژاد لری بختیاری دارد. در

شد و درصد اسپرم‌های با دم گره خورده (زنده) نسبت به گره نخورده (مرده) محاسبه شد. برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ-آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. این روش بر این اساس می‌باشد که اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. رنگ نیگروزین برای رنگ‌آمیزی پس زمینه و ایجاد اختلاف میان اسپرم و رنگ زمینه برای دید بهتر است. برای این رنگ‌آمیزی 20 میکرولیتر از نمونه اسپرم را برداشته و روی لام قرار داده و سپس 20 میکرولیتر از رنگ آماده شده ائوزین-نیگروزین روی نمونه ریخته و با سر سمپلر به آرامی نمونه را هم زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از خشک شدن لام را زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی 400 قرار داده و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس شد و سپس از هر نمونه 200 اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کمرنگ به خود گرفته یا تنها بخشی از گردن آن‌ها رنگ گرفته بود به عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شدند. برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل 3 قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی 1 سی‌سی محلول هانکوک افزوده شده و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شده و با شمارش حداقل 200 اسپرماتوزوای زیر میکروسکوپ فازکنتر است با بزرگنمایی 400، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و اسپرم با آکروزم غیرطبیعی محاسبه شده است. میانگین سه مشاهده به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شده است (Fazeli و همکاران، 2010).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های حاصل از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (SAS، 2003) و با رویه MIX و آنالیز مشاهدات تکرار شونده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌ها به صورت LSmean و SEM نمایش داده شده‌اند.

نتایج

نمونه‌های جمع‌آوری شده منی از نظر ویژگی‌های اولیه (رنگ، حجم و جنبایی) مورد ارزیابی قرار گرفت تا مطلوب بودن آن‌ها برای انجام آزمایش مشخص گردد. تمام نمونه‌های ارزیابی شده، دارای رنگ مناسب (کرم) بودند و براساس روش ارزیابی اولیه ایوانس دارای جنبایی بیش از 70 درصد بودند. نتایج نشان داد که با افزایش زمان نگهداری میزان جنبایی کل (جدول 1)، پیش‌رونده (جدول 2) و یکپارچگی غشاء (جدول 3) به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($p < 0/05$) اما در فراسنجه‌های جنبایی کل هیچ تفاوت معنی‌داری در زمان‌های مورد ارزیابی بین رقیق‌کننده‌های مختلف وجود ندارد ($p > 0/05$).

میلی‌لیتر محلول سالین، 150 میلی‌لیتر محلول بافر و 500 میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر استفاده شد. در این مطالعه برای ساخت انواع رقیق‌کننده‌های حاوی نگهدارنده با منشأ گیاهی از یک محیط بر پایه بافر تریس استفاده شد (Fazeli و همکاران، 2010).

تیمارهای آزمایشی: برای ساخت محیط‌های انجماد گیاهی حاوی لیسیتین سویا از روز قبل محیط بر پایه بافر تریس تهیه و در یخچال در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. غلظت‌های مختلف لیسیتین سویا (0، 1/5، 2 و 2/5 درصد) به عنوان یکی از اجزای افزودنی رقیق‌کننده به محیط پایه حاوی بافر تریس اضافه گردید. سپس نمونه‌های رقیق شده تا 48 ساعت نگهداری شدند. در این تحقیق علاوه بر 5 تیمار مذکور یک تیمار که در آن به جای لیسیتین سویا از زرده تخم مرغ به عنوان افزودنی با منشأ حیوانی استفاده شده بود برای مقایسه با تیمارهای فوق به صورت جداگانه در نظر گرفته شد (Fazeli و همکاران، 2010).

پردازش و ارزیابی‌های اسپرم: رقیق‌سازی به نسبت 1 حجم منی و 20 حجم رقیق‌کننده انجام شد. سپس لوله منی در ظرف محتوی 100 سی‌سی آب 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از قرار گرفتن در یخچال 5 درجه سانتی‌گراد طی 48 ساعت نگهداری شد. اولین فراسنجه مورد ارزیابی در این تحقیق بررسی جنبایی اسپرم پس از شروع سردسازی بود. به این منظور منی روی لام قرار گرفت و با گذاشتن یک لامل تمیز روی آن، لام با روش چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت و جنبایی پیش‌رونده هر نمونه ثبت گردید. بررسی یکپارچگی غشاء اسپرم با تست هاست انجام شد. تست هاست براساس اسمولاریتی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. اسمولاریتی محیطی هاست 100 میلی‌اسمول و اسمولاریته مورد نیاز برای اسپرم 425 میلی‌اسمول است. بنابراین، اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن گره می‌خورد. بدیهی است که تنها اسپرم‌های زنده قادر هستند به این نوع تغییر واکنش دهند و اسپرم‌های مرده که در این محیط قرار می‌گیرند هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند. در واقع پس از انجام این تست اسپرم‌های با دم گره خورده به عنوان اسپرم‌های زنده و اسپرم‌هایی که دم آن‌ها صاف است به عنوان اسپرم مرده تلقی می‌شوند. به این منظور، ده میکرولیتر از منی به 100 میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاست که حاوی فروکتوز و سیترات سدیم بود اضافه و سپس 30 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت 30 دقیقه، نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. بررسی میکروسکوپی با استفاده از یک صفحه داغ در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و با بزرگنمایی 400 صورت گرفت. در هر گروه تیماری حداقل 200 اسپرم شمارش

جدول 1: درصد جنبایی کل اسپرم‌های موجود در رقیق‌کننده‌های حاوی مقادیر متفاوت لیسیتین سویا در زمان‌های مختلف نگهداری اسپرم به حالت سرد

درصد لیسیتین سویا در رقیق‌کننده	زمان نگهداری اسپرم (ساعت)				معنی‌داری اثر زمان نگه-داری	کل SEM
	2	6	24	48		
0/5	72/4 ^a	68/6 ^a	57/6 ^b	49/4 ^c	*	
1	74/2 ^a	74/2 ^a	64/6 ^b	53/4 ^c	*	



					1/5
					2
					2/5
					1% زرده تخم‌مرغ
4/03	Ns	Ns	Ns	Ns	معنی‌داری اثر تیمار

abc: حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های مربوطه می‌باشند ($p < 0/05$).
Ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار ($p > 0/05$), *: وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p < 0/05$

جدول 2: درصد جنبایی پیش‌رونده اسپرم‌های موجود در رقیق‌کننده‌های حاوی مقادیر متفاوت لسیتین سویا در زمان‌های مختلف نگهداری اسپرم به حالت سرد

کل SEM	معنی‌داری اثر زمان نگه‌داری	زمان نگهداری اسپرم (ساعت)				درصد لسیتین سویا در رقیق‌کننده
		48	24	6	2	
	*	38/6 ^c	44/4 ^b	54/0 ^a	54/8 ^a	0/5
	*	37/2 ^c	47/2 ^b	55/0 ^a	58/8 ^a	1
	*	42/0 ^c	50/6 ^b	58/8 ^a	63/2 ^a	1/5
	*	37/2 ^c	46/0 ^b	58/2 ^a	59/8 ^a	2
	*	36/0 ^c	46/2 ^b	56/6 ^a	57/0 ^a	2/5
	*	34/6 ^c	44/2 ^b	56/4 ^a	58/6 ^a	1% زرده تخم‌مرغ
3/9	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	معنی‌داری اثر تیمار

abc: حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های مربوطه می‌باشند ($p < 0/05$).
Ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار ($p > 0/05$), *: وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p < 0/05$

جدول 3: درصد یک‌پارچگی غشای اسپرم‌های موجود در رقیق‌کننده‌های حاوی مقادیر متفاوت لسیتین سویا در زمان‌های مختلف نگهداری اسپرم به حالت سرد

کل SEM	معنی‌داری اثر زمان نگه‌داری	زمان نگهداری اسپرم (ساعت)				درصد لسیتین سویا در رقیق‌کننده
		48	24	6	2	
	*	44/8 ^c	54/6 ^b	66/2 ^a	69/8 ^a	0/5
	*	48/2 ^c	60/6 ^b	68/2 ^a	70/8 ^a	1
	*	49/0 ^c	61/6 ^b	72/2 ^a	75/8 ^a	1/5
	*	48/6 ^c	58/2 ^b	69/8 ^a	73/0 ^a	2
	*	49/6 ^c	58/8 ^b	71/0 ^a	71/6 ^a	2/5
	*	46/8 ^c	57/0 ^b	71/2 ^a	72/4 ^a	1% زرده تخم‌مرغ
3/99	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	معنی‌داری اثر تیمار

abc: حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های مربوطه می‌باشند ($p < 0/05$).
Ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار ($p > 0/05$), *: وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p < 0/05$

جدول 4: درصد زنده‌مانی اسپرم‌های موجود در رقیق‌کننده‌های حاوی مقادیر متفاوت لسیتین سویا در زمان‌های مختلف نگهداری اسپرم به حالت سرد

کل SEM	معنی‌داری اثر زمان نگهداری	زمان نگهداری اسپرم (ساعت)				درصد لسیتین سویا در رقیق‌کننده
		48	24	6	2	
	*	51/8 ^c	59/0 ^{bB}	70/6 ^a	75/8 ^a	0/5
	*	58/2 ^c	64/0 ^{bAB}	76/0 ^a	77/6 ^a	1
	*	60/0 ^c	71/4 ^{bA}	79/4 ^a	83/0 ^a	1/5
	*	57/0 ^c	65/8 ^{bAB}	78/0 ^a	80/2 ^a	2
	*	59/0 ^c	68/0 ^{bAB}	77/6 ^a	79/2 ^a	2/5
	*	55/2 ^c	64/8 ^{bAB}	78/0 ^a	83/0 ^a	1% زرده تخم‌مرغ
3/89	Ns	*	Ns	Ns	Ns	معنی‌داری اثر تیمار

ABCabc: حروف انگلیسی کوچک متفاوت در هر ردیف و حروف انگلیسی بزرگ متفاوت در هر ستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های مربوطه می‌باشند ($p < 0/05$).
Ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار ($p > 0/05$), *: وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p < 0/05$

نتایج مربوط به زنده‌مانی (جدول 4) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین رقیق‌کننده‌ها در 24 ساعت پس از نگهداری اسپرم می‌باشد به‌طوری‌که در 24 ساعت زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده‌های

حاوی 1/5 درصد لسیترین بیش‌تر از رقیق‌کننده حاوی 0/5 درصد لسیترین بود. از سوی دیگر با افزایش زمان نگهداری میزان زنده‌مانی کاهش معنی‌داری را نشان داد.

جدول 5: درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیرطبیعی در رقیق‌کننده‌های حاوی مقادیر متفاوت لسیترین سویا در زمان‌های مختلف نگهداری اسپرم به حالت سرد

درصد لسیترین سویا در رقیق‌کننده	زمان نگهداری اسپرم (ساعت)				معنی‌داری اثر زمان نگهداری	SEM کل
	2	6	24	48		
0/5	9/8 ^b	9/8 ^{ab}	10/9 ^{ba}	13/0 ^{aA}	*	
1	9/7 ^c	10/2 ^{bcAB}	11/5 ^{abA}	12/4 ^{aAB}	*	
1/5	7/6 ^b	8/2 ^{bB}	8/6 ^{bB}	10/2 ^{aB}	*	
2	8/4 ^c	10/5 ^{ba}	10/7 ^{abAB}	12/1 ^{aAB}	*	
2/5	9/9 ^b	11/2 ^{abA}	11/4 ^{abA}	13/8 ^{aA}	*	
1% زرده تخم‌مرغ	9/9 ^c	11/8 ^{ba}	12/1 ^{ba}	13/7 ^{aA}	*	
معنی‌داری اثر تیمار	Ns	*	*	*		0/81

ABCabc: حروف انگلیسی کوچک متفاوت در هر ردیف و حروف انگلیسی بزرگ متفاوت در هر ستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های مربوطه می‌باشند ($p < 0/05$).

Ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار ($p > 0/05$), *: وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p < 0/05$

در 6 ساعت پس از نگهداری منی درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی در رقیق‌کننده حاوی 1/5 درصد لسیترین به‌طور معنی‌داری کمتر از رقیق‌کننده‌های حاوی زرده، 2 و 2/5 درصد لسیترین بودند. در 24 ساعت نیز درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی در رقیق‌کننده حاوی 1/5 درصد لسیترین به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر رقیق‌کننده‌ها (به‌استثنا رقیق‌کننده حاوی 2 درصد لسیترین) بودند. در 48 ساعت نیز اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی در رقیق‌کننده حاوی 1/5 درصد لسیترین به‌طور معنی‌داری کمتر از رقیق‌کننده‌های حاوی زرده، 0/5 و 2/5 درصد لسیترین بودند ($p < 0/05$). درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی نیز هم‌سو با تغییرات در سایر فزاسنج‌های کیفی اسپرم با افزایش زمان نگهداری افزایش یافت.

بحث

در تحقیق حاضر با افزایش زمان جنبایی کل و پیش‌رونده و یک‌پارچگی غشاء کاهش معنی‌داری نشان داد که با سایر مطالعات هم‌خوانی دارد (فولادوند و همکاران، 1382). آسیب‌های ساختاری و غیرساختاری غشاء به‌علت نگهداری در سرما و کاهش فسفریلاسیون پروتئین آکسونم طی نگهداری در سرما می‌تواند از دلایل کاهش جنبایی اسپرم باشد (Baumber و همکاران، 2000) یک دلیل کاهش تحرک پیش‌رونده اسپرم می‌تواند اثر فرآیند سردسازی باشد (Maxwell و Watson، 1996). در مطالعه‌ای بر اسپرم قوچ مشخص شد که در روز دوم نگه‌داری اسپرم در 4 درجه سانتی‌گراد میزان جنبایی پیش‌رونده در رقیق‌کننده حاوی لسیترین سویا بهتر از رقیق‌کننده حاوی شیر است (Kasimanickam و همکاران، 2011). همچنین در پژوهشی دیگر نشان داده شد که رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ توانایی بهتری برای نگهداری اسپرم بعد از 30 ساعت نگه‌داری داشت (Paulenz و همکاران، 2003). در مطالعه فولادوند و همکاران (1393)، در زمان‌های مختلف نگهداری اسپرم قوچ

در شرایط سرد تفاوتی بین سه رقیق‌کننده حاوی 1% شیر، زرده و یا لسیترین سویا از نظر تأثیر بر زنده‌مانی اسپرم مشاهده نشد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد اما نتایج مطالعات حاضر، علاوه بر آن نشان داد که هرچند از نظر زنده‌مانی اسپرم در 24 ساعت ذخیره در شرایط سرد بین دو رقیق‌کننده حاوی 1% لسیترین سویا و یا 1% زرده تخم‌مرغ تفاوتی وجود نداشت اما هنگامی‌که سطح لسیترین موجود در رقیق‌کننده به 1/5 % افزایش یافت اثرات آن بر زنده‌مانی بهتر شد بنابراین سطوح مختلف لسیترین سویا در رقیق‌کننده خود به‌عنوان یک عامل اثرگذار و بسیار مهم مطرح می‌باشد و بیانگر این واقعیت است که هرچند اثرات رقیق‌کننده‌ها در افزایش زنده‌مانی به کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش تنش‌های سرمایی مربوط است (Ball، 2001) اما این امکان وجود دارد که با افزایش سطح لسیترین سویا در رقیق‌کننده از 1 درصد به 1/5 درصد بتوان این اثرات را به حداقل رساند و البته نمی‌توان از سطوح بالاتر (مثلاً 2 یا 2/5 درصد) لسیترین سویا در رقیق‌کننده نیز چنین انتظاری را داشت. شوک‌های سرمایی (Amann و Graham، 1993)، پیر شدن اسپرماتوزو در طی ذخیره سازی (Watson، 1981) و افزایش تولید اکسیژن‌های واکنش‌پذیر (Alvarez و همکاران، 2011) می‌توانند از دلایل خسارت غشایی اسپرم باشند. در آزمایش حاضر تفاوت معنی‌داری از نظر سلامت غشای اسپرم بین سطوح مختلف لسیترین سویا در رقیق‌کننده وجود نداشت و هیچ تفاوتی این سطوح با زرده از خود نشان ندادند که با نتایج برخی محققین مطابقت ندارد (فولادوند و همکاران، 1393؛ Bohloli و همکاران، 2012). شاید بتوان چنین استدلال کرد که حداقل لسیترین سویای لازم برای افزودن به رقیق‌کننده به جهت ممانعت از خسارت به غشای اسپرم 0/5 درصد می‌باشد و افزایش این سطح به سطوح بالاتر کمکی به بهبود بیش‌تر شرایط نخواهد کرد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، رقیق‌کننده حاوی 1/5 درصد لسیترین سویا به‌عنوان رقیق‌کننده مناسب برای نگهداری اسپرم بز در شرایط سرد می‌باشد چرا که در شرایط سرد زنده‌مانی اسپرم ها در 24 ساعت پس



- 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.
4. **Aitken, R.J.; Harkiss, D. and Buckingham, D., 1993.** Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 98, pp: 257-265.
 5. **Alaud, D.; Chaudhry, R.A. and Ahmad, K., 1981.** Effect of different extenders on freezability of buffalo semen. *J Pak Vet*. Vol. 1, pp: 59-61.
 6. **Amann, R.P. and Graham, J.K., 1993.** Spermatozoa function in: MC Kinnor. A.O., J.L. Voss. *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea and Febiger. pp: 715-745.
 7. **Ball, B.A.; Medina, V.; Gravance, C.G. and Bumber, J., 2001.** Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at degree 5 C. *Theriogenology*. Vol. 56, No. 4, pp: 577-589.
 8. **Baumber, J.; Ball, B.A.; Gravance, C.G.; Medina, V. and Davies, M.C.G., 2000.** The effect of reactive oxygen Species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Andrology*. Vol. 21, No. 6, pp: 895-902.
 9. **Bohlooli, S.; Cedden, F.; Pisjang, J.; Razzaghzadeh, S. and Bozoglu, S., 2012.** The effect of different extenders on post thaw sperm viability, motility and membrane integrity in cryopreserved semen of zandi ram. *J. Basic. Appl. Sci*. Vol 2, pp: 1120-1123.
 10. **Bousseau, S.; Brillard, J.; Marquant-Le Guenne, B.; 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.
 11. **Bousseau, S. and Brillard, J., 1994.** In vitro and in vivo results of fertility in cattle, following inseminations performed with semen diluted and frozen in a diluent free of animal origin products (Biociphos Plus).
 12. **Fazeli, P.; Zamiri, M.J.; Farshad, A. and Khalili, B., 2010.** Effects of vitamin C on testicular and seminal characteristics of Markhoz goats. *Iranian Journal of Veterinary Research*. Vol. 11, No. 3, Ser. No. 32, pp: 267-272.
 13. **Forouzanfar, M.; Sharafi, M.; Hosseini, S.M.; Ostadhosseini, S.; Hajian, M. and Hosseini, L., 2010.** In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. Vol. 73, pp: 480-487.
 14. **Fukui, Y.; Kohno, H.; Togari, T.; Hiwasa, M. and Okabe, K., 2008.** Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender (AndroMed) in sheep. *Journal of Reproduction and Development*. Vol. 73, pp: 480-487.
 15. **Gil, J.; Januskauskas, A.; Haard, M.C.; Haard, M. and Johannisson, A. Soderquist, L., 2000.** Functional Sperm Parameters and Fertility of Bull Semen Extended in Biociphos Plus® and Triladyl®. *Reproduction in Domestic Animals*. 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. and Foote, R., 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.

از نگهداری در این نوع رقیق‌کننده بیش‌تر از سایر رقیق‌کننده‌های گیاهی و زرده بود و همچنین در 6 تا 24 ساعت پس از نگهداری درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیرطبیعی در آن کمتر از سایر رقیق‌کننده‌های حاوی درصد‌های متفاوت لسیتین سویا و زرده بود اسپرم و با توجه به نگهداری اسپرم در شرایط سرد که تنش کمتری نسبت به شرایط انجماد ایجاد می‌کند، سطح 150 درصد لسیتین در رقیق‌کننده کافی است و قادر است که اسپرم را در این شرایط نگهداری کند. لازم به ذکر است که برای این‌که لسیتین در شرایط انجماد اثرات محافظتی خود را دارا باشد باید از سطح 1/5 درصد آن استفاده شود (Sharafi و همکاران، 2009). از طرف دیگر، استفاده از زرده تخم‌مرغ در محیط‌های نگهداری اسپرم در سال‌های اخیر با بروز مشکلاتی همراه بوده است. متغیر بودن کیفیت زرده تخم‌مرغ و وابستگی آن به عواملی همچون وراثت، تعداد روزهای تخم‌گذاری و شرایط نگهداری آن باعث شده است که تهیه غلظت‌های استاندارد از آن در محیط‌های نگهداری با مشکل روبرو شود. همچنین، زرده تخم‌مرغ احتمال انتقال آلودگی به‌وسیله باکتری‌ها و مایکوپلاسماها را افزایش می‌دهد. زرده دارای پروژسترون است که سبب ظرفیت‌پذیری زود هنگام اسپرم شده و به آکروزوم اسپرم آسیب وارد می‌کند. از معایب دیگر آن وجود ذراتی است که ارزیابی‌های میکروسکوپی به‌خصوص با CASA را دچار مشکل می‌کند، زیرا ذرات را نیز اسپرم مرده در نظر می‌گیرد. برخلاف بدن که HDLها به‌عنوان لیپوپروتئین‌های خوب و LDLها به‌عنوان لیپوپروتئین‌های بد نامیده می‌شوند، می‌توان در این‌جا نام آن‌ها را جایگزین یکدیگر نمود، زیرا HDLهای زرده اثر معکوس با LDL داشته و اثرات مفید آن‌ها را از میان برمی‌دارند. با توجه به این‌که اثر اصلی زرده تخم‌مرغ در نگهداری سلول‌ها مربوط به بخش لیپوپروتئین‌های با چگالی کم‌مانند لسیتین می‌باشد لذا استفاده از لسیتین سویا به‌عنوان ماده تجاری قابل دسترس در محیط رقیق‌کننده منی می‌تواند کیفیت محیط را تا حد قابل قبولی افزایش دهد. با توجه به مواردی که ذکر شد در این تحقیق لسیتین سویا جایگزین زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده منی شد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، رقیق‌کننده حاوی 1/5 درصد لسیتین سویا به‌عنوان رقیق‌کننده مناسب برای نگهداری اسپرم بز در شرایط سرد می‌باشد چرا که در زنده‌مانی اسپرم‌ها در 24 ساعت پس از نگهداری منی در شرایط سرد در این رقیق‌کننده بیش‌تر از سایر رقیق‌کننده‌های گیاهی و زرده بود و همچنین در 6 تا 24 ساعت پس از نگهداری اسپرم‌ها در شرایط سرد، درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیرطبیعی در آن کمتر از سایر رقیق‌کننده‌های حاوی درصد‌های متفاوت لسیتین سویا و زرده بود.

منابع

1. فولادوند، ف.؛ کریمی، ک. و ژندی م.، 1393. مقایسه اثر سه رقیق‌کننده لسیتین، شیر و زرده تخم‌مرغ بر نگهداری منی قوچ نژاد زندی در شرایط سرد. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال 6، شماره 2، صفحات 83 تا 88.
2. **Agarwal, A.; Prabakaran, SA. and Said, TM., 2005.** Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J androl*. Vol. 26, pp: 654.
3. **Aires, V.A.; Hinsch, K.D.; Mueller-Schloesser, F.; Bogner, K.; Mueller-Schloesser, S. and Hinsch, E., 2003.**

18. **Hinsch, E.; Hinsch, K.D.; Boehm, J.; Schill, W.B. and Mueller-Schloesser, F., 1997.** Functional Parameters and Fertilization Success of Bovine Semen Cryopreserved in Egg Yolk Free and Egg Yolk Containing Extenders. *Reproduction in Domestic Animals*. Vol, 32, pp: 143-149.
19. **Kasimanickam, R.; kasimanickam, V.; Tibary, A. and Pelzer, K., 2011.** Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. *Small Ruminant Research*. Vol. 99, No. 2-3, pp: 208-213.
20. **Maia, M.S.; Bicudo, S.D.; Sicherle, C.C.; Rodello, L. and Gallego, I.C.S., 2010.** Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim Reprod Sci*. Vol. 122, pp: 118-123.
21. **Maxwell, W.M.C. and Watson, P.F., 1996.** Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*. Vol. 42, No. 1-4, pp: 55-65.
22. **Moussa, M.; Martinet, 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.
23. **Paulenz, H.; Soderquist, L.; Perez-Pe, R. and Berg, K.A., 2002.** Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*. Vol. 57, No. 2, pp: 823-836.
24. **Perez-Garnelo, S.; Oter, M.; Borque, C.; Talavera, C.; Delclaux, M. and Martinez-Nevado, E., 2006.** Post-thaw viability of European Bison (*Bison Bonasus*) semen frozen with extenders containing egg yolk or lipids of plant origin and examined with a heterologous in vitro fertilization assay. *J Zoo and Wildlife Med*. Vol, 37, pp: 116-125.
25. **Phillips, P.H., 1939.** Preservation of bull semen. *Journal of biological chemistry*. Vol, 130, pp: 415.
26. **Sharafi, M.; Forouzanfar, M.; Hosseini, S.M.; Hajian, M.; Ostadhosseini, S. and Hosseini, L., 2009.** In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for Ram semen cryopreservation. *International J Fert Steril*. Vol, 3, pp: 149-152.
27. **Watson, P., 1976.** The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5 C and deep-freezing. *Journal of thermal biology*. Vol. 1, pp: 137-141.

