مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال یازدهم، شماره اول، پیاپی چهل و یکم، تابستان ۱۴۰۱ (۶۳-۵۵)

DOI: 10.30473/eab.2023.63159.1874

مقاله پژوهشی:

تأثیر جایگزینی لسیتین سویا و زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی

سیده آزاده طبائی[1*]، مرتضی ممویی[2]، صالح طباطبائی وکیلی[3]، خلیل میرزاده[3]

۱. کارشناس، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران.
۲. استاد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران، صندوق پستی ٦٣٤١٧٧٣٦٣٧
۳. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران، صندوق پستی ٦٣٤١٧٧٣٦٣٧

(تاریخ دریافت: ١٤٠٠/١٢/١٦ - تاریخ پذیرش: ١٤٠١/١٠/٢٣)

چکیده

آزمایش حاضر با هدف بررسی تأثیر جایگزینی سطوح مختلف لسیتین سویا با زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی انجام شد. برای این منظور، آزمایشی با تعداد هشت رأس قوچ عربی بالغ و سالم با وزن متوسط ۵±۷۵ کیلوگرم در قالب طرح کاملاً تصادفی در فصل تولیدمثلی صورت گرفت. نمونه‌های منی با استفاده از دستگاه الکترواجاکولاتور جمع‌آوری شد. نمونه‌های منی با هم مخلوط و پس از رقیق‌سازی به پنج گروه آزمایشی تقسیم شدند. تیمارها شامل سطوح افزایشی لسیتین سویا (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد) و زرده تخم‌مرغ (۱۵درصد) در رقیق‌کننده بر پایه تریس و حاوی پنج درصد گلیسرول بود. تعداد پنج پایوت نیم میلی‌لیتری از هر تیمار تهیه شد. پایوت‌ها به‌مدت دو ساعت در دمای پنج درجه سانتی‌گراد به تعادل رسیده و منجمد شدند. پس از دو هفته، یخ‌گشایی پایوت‌ها در دمای ۳۷ درجه انجام گرفت. فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل درصد تحرک، زنده‌مانی، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی، سلامت غشا و نیز pH منی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ درصد لسیتین سویا در مقایسه با سایر سطوح از جمله زرده تخم‌مرغ موجب بهبود سطح معنی‌داری در میزان تحرک کل، تحرک پیشرونده، زنده‌مانی، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و یکپارچگی غشای پلاسمایی در اسپرم قوچ عربی شد (P<۰/۰۵). با توجه به اینکه بیشترین میزان بهبود در فراسنجه‌های کیفی اسپرم در سطح ۱/۵ درصد لسیتین سویا مشاهده شد، می‌توان از این سطح در رقیق‌کننده برای نگهداری منی قوچ عربی به حالت انجماد استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: انجماد اسپرم، رقیق‌کننده، زنده‌مانی، قوچ عربی، لسیتین سویا.

The Effect of Soybean Lecithin in Extender Replaced and Egg Yolk on Semen Quality Parameters of Arabian Ram After Freeze-Thawing Process

Azadeh Tabaei[1*], Morteza Mamouei[2], Saleh Tabatabaei Vakili[3], Khalil Mirzadeh[3]

1. M.A., Department of Animal Science, College of Animal Science and Food Technology, University of Khuzestan, Khuzestan, Iran.
2. Professor, Department of Animal Science, College of Animal Science and Food Technology, University of Khuzestan, Khuzestan, Iran.
3. Associate Professor, Department of Animal Science, College of Animal Science and Food Technology, University of Khuzestan, Khuzestan, Iran.

(Received: Mar. 7, 2022 - Accepted: Jan. 13, 2023)

Abstract

The aim of present study was to evaluation the effect of different levels of soybean lecithin in tris extender replaced with egg yolk on semen quality parameters of Arabic ram after freeze-thawing process. For this purpose, the experiment with numbers of 8 adult and healthy Arabic rams with an average weight of 75 ± 5 kg were used in a completely randomized design. Semen samples were collected using electro ejaculator. Semen samples were mixed and after dilution, were divided in to 5 experimental groups. Treatments were increasing levels of soybean lecithin (0.5, 1, 1.5 and 2 percent) and egg yolk (15 percent) in tris base extender and 5 percent of glycerol. The 5 numbers of 0.5 ml straws from each treatment were filled. The straws were equivalence for 2 hours in 5˚C and then freezed. After 2 weeks, straws were thawed at 37˚C. Qualitative parameters of spermatozoa including the motility, viability, morphological abnormalities, membrane integrity and the pH of semen were evaluated. The resulted of this experiment showed that extender containing 1.5 percent of soybean lecithin significantly improved total motility and progressive motility, viability, morphological abnormalities and membrane integrity of Arabic ram spermatozoa compared to the other levels of lecithin as well as egg yolk (P<0.05). The most improvement have been observed at the 1.5 % soybean lecithin. Therefore, this level can be used in tris extender for maintaining of Arabic ram spermatozoa in freeze condition.

Keywords: Arabi ram, Cryopreservation Sperm, Extender, Soybean lecithin, Viability.

* نویسنده مسئول، سیده آزاده طبائی
Email: azadehtabatabaei968@gmail.com

مقدمه

تلقیح مصنوعی رایج‌ترین تکنیک مورد استفاده برای پرورش حیوانات اهلی است. با توجه به پیشرفت‌های اخیر در اسپرم‌گیری و تکنیک تلقیح مصنوعی به نظر می‌رسد حفظ کیفیت اسپرم‌ها تا زمان تلقیح از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد. یکی از فاکتورهای کلیدی تعیین‌کننده موفقیت در تکنیک تلقیح مصنوعی، تحرک مناسب اسپرم‌هاست (Lecewicz *et al*., 2019). از این رو به‌منظور حفظ دام‌های بومی و جلوگیری از انقراض ذخایر ژنتیکی ارزشمند آن‌ها ضروری است بخشی از تحقیقات در زمینه به‌کارگیری روش‌های مطلوب حفظ و انتقال این ژن‌ها به نسل‌های آینده اختصاص یابد. انجماد اسپرم فناوری مهمی برای حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی است و اسپرم‌های منجمدشده به‌منظور تلقیح مصنوعی بایستی از کیفیت لازم برخوردار باشند (VaseghiDodaran *et al*., 2015). بزرگترین مانع در حفظ انجماد منی، آسیبی است که به ساختمان اسپرم در طول فرایند انجماد- یخ‌گشایی وارد می‌شود که منجر به باروری ضعیف اسپرم منجمد می‌شود (Mascarenhas & Barbas, 2009). زنده‌مانی و تحرک اسپرم قوچ بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی متأثر از فاکتورهای متعددی از قبیل کیفیت منی، نوع و غلظت اجزای موجود در محیط انجماد است. استفاده از محیط انجماد مناسب منی قوچ که بتواند اسپرم‌ها را در برابر آسیب‌های انجماد- یخ‌گشایی محافظت کند و زنده‌مانی و تحرک اسپرم را بعد از این فرآیند حفظ کند، گام مهمی در جهت استفاده از تلقیح مصنوعی در گوسفند است (Evans & Maxwell, 1987). در طول سال‌های اخیر، ابداع و توسعه انواع رقیق‌کننده‌های منی به‌منظور انجماد اسپرم و در نتیجه افزایش راندمان و موفقیت تلقیح مصنوعی گسترش زیادی پیدا کرده است. لذا پژوهش‌گران، مطالعات گسترده‌ای برای تولید رقیق‌کننده‌هایی که بتوانند باعث حفظ انجمادی اسپرم شوند، انجام دادند. رقیق‌کننده‌های منی دارای خواص ویژه‌ای هستند که موجب نگهداری طولانی‌تر اسپرم‌ها می‌شوند. این مواد در تأمین انرژی مورد نیاز، حفاظت اسپرم از آسیب‌های دمایی، کاهش استرس‌های فیزیکی و شیمیایی ناشی از سردکردن، انجماد- یخ‌گشایی اسپرم‌ها و در نهایت ایجاد یک محیط مناسب برای زنده‌ماندن موقت اسپرم‌ها نقش دارند (Curry, 2000). یکی از اجزای معمول رقیق‌کننده‌های مورد استفاده برای ذخیره‌سازی و انجماد مایع منی حیوانات اهلی از جمله قوچ، زرده تخم‌مرغ است که از اسپرم در برابر شوک سرمایی محافظت می‌کند (Aisen, 2000). یکی از مزایای زرده تخم‌مرغ به‌عنوان متداول‌ترین رقیق‌کننده منی، وجود لیپوپروتئین‌های با چگالی کم است که منجر به حفاظت از فسفولیپیدهای اسپرم در طول فرایند انجماد می‌شود (Amirat *et al*., 2004). به‌دلیل وجود گویچه‌های چربی در زرده تخم‌مرغ، ارزیابی اسپرم دشوار می‌شود (Salmani *et al*., 2014). از سوی دیگر، انجماد اسپرم باعث کاهش مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در مایع منی می‌شود که با افزودن ترکیبات آنتی اکسیدانی می‌توان از آن محافظت کرد (Singh *et al*., 2012). لسیتین سویا مخلوط طبیعی فسفاتیدیل کولین و چند اسیدچرب مانند اسید استئاریک، اولئیک و پالمتیک است که جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ در رقیق‌سازی مایع منی است. بنابراین استفاده از لسیتین به‌عنوان منبع لیپوپروتئین‌ها در رقیق‌کننده‌های مایع منی مورد توجه قرار گرفته است (Papa *et al*., 2010). امروزه به علت مشکلات حاصل از رقیق‌کننده‌های با منشأ حیوانی از قبیل آلودگی‌های میکروبی و انتقال بیماری، تغییرات زیاد در ترکیبات آن‌ها، دشواری مشاهدات میکروسکوپی و ظرفیت‌دارشدن زودهنگام اسپرم، تمایل به حذف آن‌ها در رقیق‌کننده وجود دارد. تحقیقات نشان داده است که بخش مؤثر زرده تخم‌مرغ، لیپوپروتئین‌های با چگالی کم بوده که عمدتاً حاوی لسیتین است (Aires *et al*., 2003; Amirat

et al., 2005; Gil *et al*., 2003). این شرایط تقاضا برای جایگزینی جزئی یا کامل زرده تخم‌مرغ با لسیتین گرفته شده از منابع گیاهی همچون دانه‌های سویا برای حفاظت از مایع منی حیوان را فراهم می‌کند. بنابراین پژوهش حاضر، با هدف بررسی تأثیر جایگزینی سطوح مختلف لسیتین سویا و زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی (تحرک کل و تحرک پیشرونده، زنده‌مانی و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی، سلامت غشای پلاسمایی و PH منی) بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی و تعیین بهترین سطع لسیتین سویا در حفاظت و نگهداری بلندمدت قوچ عربی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش، در ایستگاه آموزشی تحقیقاتی دامپروری و آزمایشگاه فیزیولوژی دام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان و نیز شرکت نهاده‌های دامی جاهد خوزستان در فصل تولیدمثلی گوسفند عربی انجام گرفت. از تعداد ۸ رأس قوچ عربی با متوسط سن سه سال و وزن ۵±۷۵ کیلوگرم استفاده شد. قوچ‌های مورد آزمایش در شرایط طبیعی و جدا از میش‌ها نگهداری می‌شدند و علاوه بر جیره معمول متشکل از جو، یونجه خشک، کاه و سیلاژ ذرت، مواد معدنی نیز به‌صورت بلوک‌های آماده لیسیدن در اختیار دام‌ها قرار می‌گرفت. اسپرم‌گیری با استفاده از دستگاه الکترواجاکولاتور انجام شد. نمونه‌های منی با تحرک پیشرونده کمتر از ۷۰ درصد و غلظت کمتر از $۲/۵\times۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر منی، از آزمایش حذف شدند. بلافاصله نمونه‌ها برای از بین بردن اثرات فردی با هم مخلوط شدند. نمونه‌های انزال پس از مخلوط‌شدن به پنج قسمت مساوی تقسیم شده و با رقیق‌کننده بر پایه تریس رقیق شدند. رقیق‌کننده پایه شامل (۳۲/۸۵ گرم بر لیتر تریس، ۹/۳ گرم بر لیتر فروکتوز، ۱۸/۷۰گرم بر لیتر اسیدسیتریک، ۰/۵گرم بر لیتر جنتامایسین، ۵ درصد گلیسرول، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) بود. سطوح افزایشی ۰/۵، ۱، ۱/۵و ۲ درصد لسیتین سویا و غلظت ۱۵ درصد زرده تخم‌مرغ به‌عنوان تیمارهای آزمایشی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از رقیق‌سازی نمونه‌های منی، از هر تیمار آزمایشی تعداد پنج پایوت نیم میلی‌لیتری تهیه شد. نمونه‌ها به‌مدت دو ساعت در دمای پنج درجه سانتی‌گراد یخچال به تعادل رسیدند (Ball *et al*., 2001). در مرحله بعد، پایوت‌ها به‌مدت ۱۵-۱۳ دقیقه به فاصله چهار سانتی‌متری در معرض بخار ازت منجمد قرار گرفته و سپس در ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه غوطه‌ور شدند و به‌مدت دو هفته در تانک نیتروژن مایع ذخیره شدند (Bucak *et al*., 2007). برای یخ‌گشایی منی، پس از خارج‌کردن پایوت‌های حاوی منی از ازت، پایوت‌ها به‌مدت ۳۰ ثانیه در داخل فلاسک آب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Ijaz *et al*., 2009). سپس فراسنجه‌های کیفی اسپرم (تحرک کل و تحرک پیشرونده، زنده‌مانی، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی، سلامت غشای پلاسمایی و pH منی) ارزیابی شد. برای ارزیابی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم از نرم‌افزار CASA استفاده شد. ارزیابی درصد تحرک کل، تحرک پیشرونده سریع، تحرک پیشرونده کند و اسپرم‌های با حرکت غیرپیشرونده، با قراردادن پنج میکرولیتر از منی روی لام با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی کامپیوتری تحت میکروسکوپ مربوط به سیستم کاسا انجام شد. برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم، نمونه‌های منی در معرض محلول هیپواسموتیک (۰/۷۳۵ گرم سدیم سیترات، ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به‌مدت ۳۰ دقیقه و تحت دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند (Jeyendran *et al*., 1992). واکنش اسپرم‌ها به محیط هیپواسمول به‌صورت تورم دم است. اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالمی دارند به محلول واکنش نشان می‌دهند، ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند (Garsia-Artiga, 1994). ارزیابی زنده‌مانی با رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین انجام شد. مواد تشکیل‌دهنده این محیط شامل رنگ ائوزین، رنگ نیگروزین و سیترات سدیم است. اسپرم‌های مرده،

رنگ ائوزین را به خود جذب کرده ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی ۲۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم را روی لام قرار داده و روی آن ۲۰ میکرولیتر از رنگ آماده‌شده ائوزین- نیگروزین اضافه و به آرامی به‌هم زده شد تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ۳۰ ثانیه، ۲۰ میکرولیتر از نمونه را برداشته و بر گوشه لام دیگری گذاشته و با یک لام دیگر روی آن به آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک‌شدن، لام را زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰x قرار داده و با استفاده از روغن ایمرسیون، حداقل تعداد ۲۰۰ اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت 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، به‌عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شد (Evans & Maxwell, 1987). ارزیابی درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم با استفاده از لام‌های رنگ‌آمیزی‌شده با ائوزین- نیگروزین تحت بزرگنمایی ۱۰۰۰x انجام گرفت. حداقل تعداد ۲۰۰ اسپرم زنده در میدان‌های میکروسکوپی مختلف در هر نمونه مورد ارزیابی قرار گرفته و سپس میزان اسپرم‌های ناهنجار مشاهده‌شده بر حسب درصد بیان شد. برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم نقایصی چون سر جدا شده، دم پیچ خورده، سر باریک و سر بزرگ مد نظر قرار گرفت (Blom, 1983).

کلیه داده‌های این طرح با استفاده از نرم‌افزار SAS و با استفاده از رویه آماری GLM در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه واریانس (رابطه ۱) قرارگرفت و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

$$Y_{ij}= \mu+ t_i+ e_{ij} \quad \text{رابطه (۱)}$$

در این رابطه، Y_{ij} مشاهدات مربوط به صفات، μ میانگین کل مشاهدات، t_i اثر تیمار و e_{ij} اثر خطا است.

نتایج و بحث

طبق نتایج ارائه‌شده در جدول ۱ در خصوص فراسنجه‌های حرکتی اسپرم قوچ بعد از یخ‌گشایی، درصد تحرک کل، درصد تحرک پیشرونده کل، پیشرونده سریع و پیشرونده کند در رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ درصد لسیتین سویا به طور معنی‌داری بیشتر از سطوح دیگر لسیتین سویا و زرده تخم‌مرغ بود (P<۰/۰۵). در خصوص درصد تحرک کل و تحرک پیشرونده اسپرم‌ها، زرده تخم‌مرغ کمترین میزان معنی‌داری را در مقایسه با تمام سطوح لسیتین سویا داشت (P<۰/۰۵).

تحرک اسپرم یکی از مهمترین فراسنجه‌هایی است که به‌شدت با توانایی اسپرم برای انتقال در سراسر مجاری تناسلی ماده برای رسیدن به واکنش و بارورکردن اووسیت مرتبط است. علت ناباروری جنس نر ممکن است به خاطر کاهش قابل توجه در تعداد اسپرم‌های متحرک یا اختلال در کیفیت حرکتی اسپرم باشد (Rad *et al*., 2016).

جدول ۱. تأثیر سطوح مختلف لسیتین سویا (درصد) و زرده تخم مرغ (۱۵ درصد) بر فراسنجه‌های حرکتی (درصد) اسپرم قوچ عربی بعد از فرایند انجماد-یخ‌گشایی

تیمارهای آزمایشی (٪)	لسیتین ۰/۵	لسیتین ۱	لسیتین ۱/۵	لسیتین ۲	زرده تخم‌مرغ
حرکت پیشرونده سریع	۵/۰۲±۰/۴۲^{dc}	۶/۷۱±۰/۴۹^{b}	۸/۵۳±۰/۴۰^{a}	۵/۵۵±۰/۱۶^{bc}	۴/۰۶±۰/۴۷^{d}
حرکت پیشرونده کند	۲۷/۵۶ ±۰/۹۶^{c}	۲۳/۶۵±۰/۶۳^{d}	۳۳/۸۵±۰/۵۳^{a}	۳۱/۲۶±۰/۴۴^{b}	۲۱/۹۰±۰/۷۵^{d}
حرکت غیر پیشرونده	۱۷/۹۵±۰/۰۹^{a}	۱۷/۴۲±۰/۳۴^{a}	۱۶/۳۷±۰/۴۷^{a}	۱۶/۴۰±۱/۲۰^{a}	۱۸/۱۵±۰/۲۹^{a}
پیشرونده کل	۳۲/۵۹±۰/۹۷^{c}	۳۰/۳۶±۰/۱۸^{d}	۴۲/۳۸±۰/۵۱^{a}	۳۶/۷۹±۰/۳۰^{b}	۲۵/۹۷±۱/۱۰^{e}
تحرک کل	۵۰/۵۴ ±۱/۰۰۶^{c}	۴۷/۷۹±۰/۰۴^{d}	۵۸/۹۸±۰/۲۵^{a}	۵۳/۱۹±۱/۱۷^{b}	۴۴/۱۲±۱/۰۱^{e}

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

آسیب‌های ساختاری و غیرساختاری غشا به‌علت نگهداری در سرما و کاهش فسفریلاسیون پروتئین آکسونم طی نگهداری در سرما نیز می‌تواند از دلایل کاهش تحرک اسپرم باشد (Baumber *et al*., 2000). طی پژوهشی که در آن تأثیر سطوح مختلف لسیتین سویا بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ در شرایط مایع مورد بررسی قرار گرفت، سطح ۱/۵ درصد لسیتین سویا موجب بهبود میزان تحرک پیشرونده اسپرم در مقایسه با دیگر تیمارها از جمله زرده تخم‌مرغ شد (Manteghi *et al*., 1395)، که مشابه با یافته‌های پژوهش حاضر در شرایط انجماد منی است. از طرفی، یک دلیل کاهش تحرک پیشرونده اسپرم می‌تواند اثر فرایندسازی باشد. در برخی گزارشات دیگر نیز لسیتین سویا نقش حفاظتی برای اسپرم داشته است که دلیل آن می‌تواند تأمین ویسکوزیته و فشار اسمزی مناسب و همچنین ذرات ریز باقیمانده کمتر برای منی باشد (Gil *et al*., 2003; Watson & Maxwell, 1996). در گاونر، سطح ۱/۵ درصد لسیتین سویا در مقایسه با سطوح پایین‌تر آن (۰/۵ و ۱ درصد) نقش محافظتی بهتری برای حفظ تحرک اسپرم‌ها داشته است (Salmani *et al*., 2014). طی سردسازی و انجماد منی، تحرک اسپرم روند کاهشی نشان می‌دهد. بنابراین، نقش عوامل حفاظتی در این فرآیند خیلی مهم است (Watson & Maxwell, 1996).

همان‌طور که در جدول ۲ مشهود است، افزودن سطوح ۱، ۱/۵ و ۲ درصد لسیتین سویا به رقیق‌کننده منی قوچ عربی موجب افزایش میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها در مقایسه با رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ پس از فرایند انجماد- یخ‌گشایی شد.

میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی می‌تواند تحت تأثیر ترکیبات رقیق‌کننده از جمله لیپوپروتئین‌ها و فسفولیپیدها باشد که از غشای اسپرم محافظت کرده و موجب کاهش شوک سرمایی و بهبود زنده‌مانی سلول‌ها می‌شود (Kulaksiz *et al*., 2010; Medeiros *et al*., 2002). این در حالی است که علت احتمالی کاهش زنده‌مانی اسپرم با گذشت زمان را تأثیر رادیکال‌های آزاد بر ساختار غشا و نیز به علت تنش‌های سرمایی عنوان کرده‌اند (Ball *et al*., 2001). در تحقیقی، سطح ۱/۵ درصد لسیتین سویا در مقایسه با سطوح دیگر آن (۰/۵، ۱ و ۲ درصد) و نیز زرده تخم‌مرغ توانایی بیشتری در محافظت کیفیت اسپرم بخصوص درصد اسپرم‌های زنده در قوچ نژاد زندی در شرایط انجماد داشت (Emamverdi *et al*., 2013). از طرفی، تیمار حاوی ۱/۵ درصد لسیتین سویا جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ بوده و باعث بهبود پارامترهای کیفی اسپرم بز از جمله زنده‌مانی اسپرم شد (Papa *et al*., 2010). لسیتین سویا قادر است به طور مؤثری اسپرماتوزوآ را در برابر آسیب‌های ناشی از سرما محافظت کند، چون افزودن آن منجر به افزایش نسبت اسپرم‌های زنده و غیرآپوپتوزیس در اسپرم تازه و پس از انجماد- یخ‌گشایی می‌شود (Del valle *et al*., 2012). همچنین گزارش شده است که پایین‌ترین درصد زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ مشاهده شده است و بیان کردند که این کاهش می‌تواند تحرک اسپرم و موفقیت تلقیح مصنوعی را تحت‌تأثیر قرار دهد (Hu *et al*., 2010).

جدول ۲. تأثیر سطوح مختلف لسیتین سویا (درصد) و زرده تخم مرغ (۱۵ درصد) بر زنده‌مانی (درصد) اسپرم قوچ عربی بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی

تیمارهای آزمایشی (٪)	لسیتین ۰/۵	لسیتین ۱	لسیتین۱/۵	لسیتین ۲	زرده تخم‌مرغ
زنده‌مانی	۷۳/۷۵±۲/۳۹^{b}	۸۰/۵۰±۲/۱۰^{a}	۸۲/۵۰±۱/۴۴^{a}	۸۱/۲۵±۳/۱۴^{a}	۷۲/۵۰±۱/۴۴^{b}

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

در مطالعه‌ای، زمان‌های مختلف نگهداری اسپرم قوچ در شرایط سرد تفاوتی بین سه رقیق‌کننده حاوی ۱ درصد شیر، زرده و یا لسیتین سویا از نظر تاثیر بر زنده‌مانی اسپرم ایجاد نکرد. اما در مطالعه حاضر هنگامی که سطح لسیتین موجود در رقیق‌کننده به ۱/۵ درصد افزایش یافت، اثرات آن بر زنده‌مانی بهتر شد. بنابراین، سطوح مختلف لسیتین سویا در رقیق‌کننده خود به‌عنوان یک عامل اثرگذار و بسیار مهم مطرح است و بیانگر این واقعیت است که هر چند اثرات رقیق‌کننده‌ها در افزایش زنده‌مانی به کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش تنش‌های سرمایی مربوط است (Ball *et al*., 2001)، اما این امکان وجود دارد که با افزایش سطح لسیتین سویا در رقیق‌کننده از ۱ درصد به ۱/۵ درصد بتوان این اثرات را به حداقل رساند و البته نمی‌توان از سطوح بالاتر مثلا (۲ یا ۲/۵ درصد) لسیتین سویا در رقیق‌کننده نیز چنین انتظاری را داشت؛ زیرا لسیتین سویا خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد و سطوح بالای آنتی‌اکسیدان‌ها اثرات منفی و مخرب بر عملکرد اسپرم بر جای می‌گذارند. به عبارتی، به همان اندازه که سطوح پایین لسیتین اثر مفیدی بر کیفیت اسپرم دارد، سطوح بالاتر آن با از بین‌بردن تمام گونه‌های فعال اکسیژن، تأثیر مضر بر فعالیت اسپرم خواهد داشت.

تأثیر جایگزینی لسیتین سویا با زرده تخم‌مرغ بر میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ عربی در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم بیان می‌کند تیمار حاوی ۱/۵ درصد لسیتین سویا نسبت به زرده تخم‌مرغ باعث کاهش درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم شد (P<۰/۰۵). نتایج تست سلامت غشای پلاسمایی اسپرم نیز نشان داد که سطوح ۱/۵ و ۲ درصد لسیتین سویا در مقایسه با تیمار حاوی ۱۵ درصد زرده تخم‌مرغ، میزان سلامت غشای پلاسمایی اسپرم بیشتری داشتند (P<۰/۰۵).

ناهنجاری‌های اسپرم معمولاً با ژنتیک حیوان در ارتباط است و بیشتر ناهنجاری‌ها در مرحله اسپرماتوژنسیز رخ می‌دهد. شاید نوع روش انجماد به‌دلیل ایجاد شوک سرمایی نیز منجر به برخی ناهنجاری‌ها در اسپرم شود. غشای سلول اسپرم یکی از اولین قسمت‌هایی است که در طی فرایند انجماد- یخ‌گشایی آسیب می‌بیند (Aitken, 1995). سلامتی و یکپارچگی غشا برای حفظ کیفیت اسپرم در طول فرایند انجماد- یخ‌گشایی یک امر ضروری و مهم است. یکپارچگی غشای پلاسمایی به حفظ عملکرد اسپرم در طول ذخیره‌سازی در دستگاه تناسلی ماده کمک می‌کند. اختلال در یکپارچگی غشا، ناشی از آسیب وارده و اختلال در سازماندهی چربی طی ذخیره‌سازی در دمای پایین است که در نهایت، منجر به مرگ اسپرم می‌شود (Holt & North, 1994). بنابراین، موفقیت سیستم تلقیح مصنوعی در استفاده از رقیق‌کننده‌ای است که بتواند سلامت غشای پلاسمایی اسپرم را طی کاهش دما و ذخیره‌سازی حفظ کند (Marti *et al*., 2003). عملکرد غشای اسپرم، دارای رابطه مستقیم با تحرک اسپرم است. شوک‌های سرمایی (Amann & Graham, 1993)، پیرشدن اسپرماتوزوآ طی ذخیره‌سازی از دلایل عمده خسارت به غشای اسپرم هستند.

جدول ۳. تأثیر سطوح مختلف لسیتین سویا (درصد) و زرده تخم مرغ (۱۵ درصد) برمیزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و سلامت غشای پلاسمایی (درصد) اسپرم قوچ عربی بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی

تیمارهای آزمایشی (٪)	لسیتین ۰/۵	لسیتین ۱	لسیتین ۱،۵	لسیتین ۲	زرده تخم‌مرغ
ناهنجاری‌های مورفولوژیکی	۶±۰.۹۱^{ab}	۶.۶۶±۰.۸۸^{ab}	۵.۶۶±۱.۲۰^{b}	۶.۵±۰.۵۰^{ab}	۸,۵±۰.۶۴^{a}
سلامت غشای پلاسمایی	۷۳.۷۵±۲.۳۹^{bc}	۷۳.۷۵±۳.۷۵^{bc}	۸۳.۷۵±۱.۴۹^{a}	۷۷.۵۰±۱.۴۴^{ab}	۶۷.۵±۳,۲۲^{c}

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

گزارش شده است رقیق‌کننده حاوی لسیتین سویا همانند رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ می‌تواند باعث حفظ یکپارچگی غشای پلاسمایی و تحرک اسپرم شود (Papa *et al*., 2010). همچنین، رقیق‌کننده دارای لسیتین سویا تحرک، یکپارچگی غشای پلاسمایی، وضعیت آپوپتوز و فعالیت میتوکندری را بعد از انجماد اسپرم قوچ بهبود داد (Emamverdi *et al*., 2013). بررسی سطوح مختلف لسیتین سویا در رقیق‌کننده بر پایه تریس روی پارامترهای کیفیت اسپرم از جمله تحرک، یکپارچگی غشا، سلامت آکروزوم و فعالیت میتوکندری نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میان رقیق‌کننده‌ها برای یکپارچگی غشای پلاسمایی و فعالیت میتوکندری اسپرم بعد از انجماد وجود دارد. به طوری که رقیق‌کننده حاوی لسیتین سویا باعث بهبود یکپارچگی غشای پلاسمایی شد. در نتیجه، رقیق‌کننده حاوی لسیتین سویا به‌عنوان منبع لیپید- لیپوپروتئین می‌تواند یک جایگزین مناسب برای منابع حیوانی در رقیق‌کننده برای انجماد منی بز استفاده شود. شاید بتوان چنین استدلال کرد که حداقل لسیتین سویای لازم برای افزودن به رقیق‌کننده به‌منظور ممانعت از خسارت به غشای اسپرم ۰/۵ درصد باشد و افزایش این سطح به سطوح بالاتر کمکی به بهبود شرایط نخواهد کرد، اما با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر، رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ درصد لسیتین سویا به‌عنوان رقیق‌کننده مناسب برای نگهداری اسپرم قوچ عربی در شرایط انجماد است، چراکه زنده‌مانی اسپرم‌ها پس از نگهداری در این نوع رقیق‌کننده بیشتر از زرده تخم‌مرغ بوده و همچنین درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیرطبیعی در آن کمتر از سایر رقیق‌کننده‌های حاوی درصدهای مختلف لسیتین سویا و زرده تخم‌مرغ بوده است. لازم به ذکر است که برای اینکه لسیتین در شرایط انجماد از اثرات محافظتی برخوردار باشد باید از سطح ۱/۵ درصد آن استفاده شود (Sharafi *et al*., 2009).

میزان pH منی قوچ عربی پس از یخ‌گشایی، تحت تأثیر سطوح مختلف لسیتین سویا و زرده تخم‌مرغ قرار نگرفت (P>۰/۰۵، جدول ۴). بهبود پارامترهای اسپرم در رقیق‌کننده سویا به‌دلیل ویسکوزیته پایین آن است. علاوه بر این، فسفولیپیدهای با منشأ سویا در رقیق‌کننده می‌تواند جایگزین برخی فسفولیپیدها در غشای اسپرم شوند که باعث حفظ ساختار و عملکرد غشای اسپرم می‌شوند. از طرفی، فسفولیپیدهای سویا ممکن است با غشای اسپرم ادغام و به‌صورت یک لایه محافظ در برابر عوامل کشنده عمل کنند (Vaseghi Dodaran *et al*., 2015).

جدول ٤. میانگین pH مایع منی قوچ عربی بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی

تیمارهای آزمایشی (٪)	لسیتین ۰/۵	لسیتین ۱	لسیتین ۱/۵	لسیتین ۲	زرده تخم‌مرغ
pH	۶/۵±۰/۱۶	۶/۵±۰/۱۶	۶/۷±۰/۱۰	۶/۸±۰/۰۴	۶/۶±۰/۱۳

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری

به طور کلی، از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که مقدار بهینه لسیتین سویا نقش محافظتی مطلوبی روی غشاها و عملکرد اسپرم بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی دارد و از طرفی جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ بوده و نه تنها کاهش کیفیت اسپرم را به دنبال ندارد، بلکه تیمار حاوی ۱/۵ درصد لسیتین سویا با ویسکوزیته و فشار اسمزی مناسب و همچنین ذرات ریز باقیمانده کمتر در رقیق‌کننده‌های انجمادی قوچ نژاد عربی می‌تواند باعث بهبود کیفیت اسپرم پس از فرایند انجماد- یخ‌گشایی شود. علاوه بر این، اسپرم ممکن است قادر به شناکردن آسان در این سطح از رقیق‌کننده نسبت به سایر سطوح باشد که می‌تواند منجر به تحرک بهتر اسپرم شود.

تشکر و قدردانی

از مسئولان محترم دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اساتید بزرگوار و کارکنان زحمتکش دانشکده علوم دامی، مسئولان محترم آزمایشگاه مرکزی و همچنین پرسنل مرکز اصلاح نژاد گاومیش خوزستان (شرکت نهاده‌های دامی جاهد) جناب آقای مهندس رعیتی و مهندس آسودار به سبب فراهم‌آوردن زمینه پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Aires, V.A.; Hinsch, K.D.; Mueller-Schloesser, F.; Bonger, K.; Mueller-Schloesser, S. and Hinsch, E., 2003. In vitro and Invivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. Journal of Theriogenology; 60: 269-279.

Aisen, E.G.; Alvarez, H.L.; Venturino, A.; Garde, J.J. (2000). Effect of trehalose and EDTA or cryoprotective action of ram semen diluents. Theriogenology; 53: 1053-1061.

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

Amann, R.P.; Graham, J.K. (1993). Spermatozoa function in Equine reproduction. Philadelpha Lea and Febiger. Pp: 715-745.

Amirat, L.; Anton, M.; Tainturier, D.; Chatagnon, G.; Battut, I.; Courtens, G. L. (2005). Odifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. Animal Reprodroduction Science; 129: 535-543.

Amirat, L.; Tainturi, D.; Jeanneau, L.; Thorin, C.; Gerard, O.; Courtens, G. L.; Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. Journal of Theriogenology; 61: 895-907.

Ball, B. A.; Medina, V.; Gravance, C. G.; Bumber, J. (2001). Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at5 degree C. Journal of Theriogenology; 56: 577-589.

Barbas, J.; Mascarenhas, R. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell and tissue banking; 10: 49-62.

Baumber, J.; Ball, B.A.; Gravance, C.; Medina, V.; Davies-Morel, M. C. (2000). The effect of reactive oxygen spieces on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, anel membrane lipid proxidation. Journal of Andrology; 21: 895-902.

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. Nor disk veterinary medicine; 45: 105-113.

Bucak, M.N.; Atessahin, A.; Varish, O.; Yuce, A.; Tekin, N.; Akacy, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaloronan in ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Theriogenology; 67: 1060-1067.

Curry, M.R. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. Reviews of Reproduction; 5:46-52.

Del Valle, I.; Gomez-Duran, A.; Holt, W. V.; Muino-Blanco, T.; Cebrian-Perez, J. A. (2012). Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. Journal Andrology; 33: 717-725.

Emamverdi, M.; Zhandi, M.; ZareShahneh, A.; Sharafi, M.; Akbari-Sharif, A. (2013). Optimization of ram semen Cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin-based extender. Reproduction Domestic Animal; 48: 899-904.

Evans, G.; Maxwell, W. M. C. (1987). Salomon's artificial inseminatiom of sheep and goats. pp: 107-117.

Garcia-Artiga, C. (1994). Test de endosmosis en ovine. International Meeting on Animal Reproduction; 7: 77-81.

Gil, J.; Rodriguez-Irazoqui, M.; Lundeheim, N.; Soderquist, L.; Rodriguez-Martinez, H. (2003). Fertility of ram semen frozen in bioxcell and used for cervical artificial insemination. Theriogenology; 59(5-6): 1157-1170.

Holt, W.; North, R. (1994). Effects of tempreture and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. Biology of Reproduction; 51: 414-424.

Hu, J. H.; Li, Q. V.; Zan, L. S.; Jiang, Z. L.; An, G. H.; Wang, L. Q.; Jia, Y. H. (2010). The cryoprotective effect of low densitylipoproteins in extenders on bullspermatozoa following freezing-thawing.Animal Reproduction Science; 117: 11-17.

Ijaz, A.; Hussain, A.; Aleem, M.; Yousaf, M. S.; Rehman, H. (2009). Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improve the post-thawed semen quality of nili-Ravi buffalo. Theriogenology; 71: 1326-1329.

Jeyendran, R.S.; Vanderven, H.H.; Zaneveld, L.J. (1992). The Hypoosmotic Swelling test: an update. Archives of Andrology; 29: 105-116.

Kulaksiz, R.; Cebi, C.; Akcay, E.; Daskin, A. (2010). The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. Small Ruminant Research; 88: 12-15.

Manteghi, M.; Mamouei, M.; Tabatabaei Vakili, S.; Fayazi, J.; Mirzadeh, Kh. (2016). Evaluation the effect of soybean lecithin in tris extender on spermatozoa quality and viability of ram. Journal of Animal Production, Tehran University; 18(2): 367-375. (In Persian)

Marti, J. I.; Marti, E.; Cebrian-Perez, J. A.; Muino-Blanco, T. (2003). Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. Journal of Theriogenology; 60: 1025-1037.

Maxwell, W. M. C.; Watson, P. F. (1996). Recent progress in the preservatjion of ram semen. Animal Reproduction Science; 42: 55-65.

Medeiros, C.M.O.; Forell, F.; Oliveria, A.T.D.; Rodrigues, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation. Theriogenol; 44: 327.

Papa, F.O.; Felicio, G.B.; Melo, C.M.; Alvarenga, M.A.; De Vita, B.; Avanzi, B. R.; Dell'Aqua, J. A. (2010). Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used for the cryopreservation of stallion semen. Animal Reproduction Science; 121(1): 71-72.

Rad, H. M.; Eslami, M.; Ghanie, A. (2016). Palmitoleate enhances quality of rooster semen during chilled storage. Animal Reproduction Science; 165: 38-45.

Salmani, H.; Towhidi, A.; Zhandi, M.; Bahreini, M.; Sharafi, M. (2014). In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based dilution for cryopreservation of goat semen. Journal of Cryobiology; 68: 276-280.

Sharafi, M.; Forouzanfar, M.; Hosseini, S. M.; Hajian, M.; Ostad Hosseini, S.; Hosseini, L. (2009). Invitro comparison of soybean lecithin based extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation. International Journal Fert Steril; 3: 149-152.

Singh, A. K.; Singh, V. K.; Narwade, B. M.; Mohantyo, T. K.; Atreja, S. K. (2012). Comparative quality assessment of buffalo semen chilled in egg yolk and soya milk- based extenders. Journal of Reproduction im Domestic Animals; 47: 590-600.

Vaseghi Dodaran, H.; Zhandi, M.; Sharafi, M.; Nejati-Amiri, E.; Nejati-Javaremi, A.; Mohammadi Sangcheshmeh, A.; Shehab-El-Deen, M. A.; Malak Shekari. (2015). Effect of ethanol induced mild stress on post thowed bull sperm quality. Cryobiology; 71(1):12-17.

COPYRIGHTS
© 2022 by the authors. Lisensee PNU, Tehran, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY4.0) (http:/creativecommons.org/licenses/by/4.0)