

اثر سطوح مختلف لسیتین سویا بر کیفیت منی و نسبت جنسیت اسپرم گاو هلشتاین با تکنیک Real-time qPCR

سپیده رستمی ^{*}M.Sc، محمدتقی بیگی نصیری Ph.D، محمد نظری Ph.D، صالح طباطبایی وکیلی Ph.D

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

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: s.rostami1585@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۸

چکیده

هدف: پژوهش حاضر به منظور بررسی استفاده از سطوح مختلف لسیتین سویا در رقیق کننده تریس بر کیفیت منی و نسبت جنسیت با استفاده از تکنیک real-time qPCR اجرا شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌گیری از چهار گاو نر نژاد هلشتاین، یک بار در هفته انجام شد و سپس نمونه‌های مناسب با هم مخلوط شدند. نمونه‌های اسپرم (در چهار تکرار) به سه گروه شامل صفر، یک و دو درصد لسیتین سویا اختصاص داده شد. و فراسنجه‌های کیفی و نیز نسبت جنسیت منی در آن‌ها تعیین شد. در این تحقیق به منظور شستشوی منی و حذف سلول‌های مرده، از تکنیک شنا به سمت بالا (pu miwS) استفاده شد. ژن‌های PLP و YRS به ترتیب برای جداسازی قطعات خاصی از توالی‌های کروموزوم X- و Y- تکثیر شدند. در این روش RAP به عنوان ژن مرجع جهت نرمال‌سازی داده‌های حاصل از بیان ژن در واکنش RCPq emit-laer استفاده شد.

نتایج: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تکنیک Swim up و سطوح مختلف لسیتین سویا موجب بهبود کیفیت منی شدند. علاوه بر این، استفاده از تکنیک Swim up باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن PLP (0.75 ± 0.11) و افزایش معنی‌دار بیان ژن SRY (1.37 ± 0.13) شد. اما استفاده از سطوح مختلف لسیتین سویا تغییری در نسبت جنسیت اسپرم ایجاد نکرد.

نتیجه گیری: به‌طور کلی، لسیتین سویا یک جایگزین مناسب برای منابع حیوانی بوده و موجب بهبود کیفیت مایع منی می‌شود. با توجه به محدودیت‌های موجود در استفاده از منابع حیوانی در رقیق کننده گاو، استفاده از لسیتین سویا به‌عنوان یک منبع گیاهی پیشنهاد می‌شود. **واژگان کلیدی:** تکنیک real-time qPCR، لسیتین سویا، نسبت جنسیت

مقدمه

حفظ باروری اسپرم برای مدت طولانی، نیازمند استفاده از رقیق‌کننده‌هایی است که محیط مناسبی را از نظر فیزیولوژیکی و متابولیکی برای بقای اسپرم فراهم کنند. رقیق‌کننده‌های متشکل از مواد مختلف (قند، الکترولیت‌ها، بافر، زرده تخم‌مرغ و لسیتین سویا) برای نگهداری اسپرم در حیوان‌های گوناگون پیشنهاد شده‌اند (۱). بیشتر رقیق‌کننده‌هایی که طی دهه‌های گذشته برای رقیق کردن منی گاو استفاده شده، بر پایه زرده تخم‌مرغ و یا شیر بوده است، به‌علت مشکلات حاصل از رقیق‌کننده‌های با منشا حیوانی از قبیل وجود آلودگی میکروبی و انتقال بیماری، متغیر بودن ترکیبات آن‌ها، دشواری مشاهدات میکروسکوپی و ظرفیت‌دار شدن زود هنگام اسپرماتوزوئید، تمایل به‌عدم استفاده از منابع حیوانی در رقیق‌کننده وجود دارد (۲).

نتایج مطالعه محققان بر منی بز نشان داد که نوع رقیق‌کننده مورد استفاده در این مطالعه با آسیب DNA اسپرم در ارتباط است (۳). تغییر در نسبت اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X و Y تنها می‌تواند با تغییرات نسبت یا عملکرد اسپرم حامل کروموزوم X یا Y زنده در منی به‌دست آید. تفاوت بین اسپرم حامل کروموزوم X و Y در سرعت حمل از طریق دستگاه تولیدمثل جنس ماده و همچنین انتخاب ترجیحی اسپرم که ممکن است اثرات متفاوتی بر بقا یا عمل‌کرد اسپرم حامل کروموزوم X یا Y داشته باشد، که می‌تواند منجر به تغییر در نسبت جنسیت شود (۴).

استفاده از اسپرم تعیین جنسیت شده نقش مهمی در صنایع تولیدی حیوانات دارد. دلیل عمده تعیین جنسیت این است که اغلب یک جنس ارزش بیشتری نسبت به جنس دیگر دارد (۵). برای دستیابی به این هدف، تکنیک جداسازی اسپرم حامل کروموزوم X (ماده) و Y (نر) به‌طور مناسب توسعه یافته است و این کار در چند کشور تجاری برای گاو استفاده می‌شود. این تکنیک به جریان فلوسایتومتری بر اساس دوام اسپرم حامل کروموزوم X و

Y و تفاوت در DNA متکی است و دقت آن بیش از ۹۰ درصد است (۶). این روش تاکنون برای بهبود در زمینه ارزیابی سلول‌های اسپرم قابل قبول بوده است اما گران بوده و به‌دست دامداران کوچک قابل انجام نیست. علاوه‌براین، بعضی از محققان باور دارند که در طول جداسازی اسپرم تابش اشعه در میان سلول‌های اسپرم موجب خسارت به DNA شده و می‌تواند موجب بروز جهش در ژنوم شود (۷). با توجه به ضعف‌های بیولوژیکی و اقتصادی فلوسایتومتری، تلاش برای ایجاد روش‌های متداول برای تشخیص اسپرم بر اساس تراکم و تحرک اسپرم‌های حامل کروموزوم X و Y صورت گرفته است (۸). امروزه استفاده از روش real time qPCR، برای ارزیابی نسبت جنسیت اسپرم‌های منی پیشنهاد شده است، با استفاده از این تکنیک می‌توان نسبت جنسیت را به‌طور آسان‌تر و با دقت ۹۹ درصد ارزیابی کرد (۹). کروموزوم Y حاوی ژن‌هایی است که در تعیین جنسیت جنین در حیوانات اهلی موثرند. SRY یکی از ژن‌های موثر در تعیین جنسیت است (۱۰). بیان ژن SRY که متصل به کروموزوم Y است سبب تمایز سلول‌های سرتولی از سلول‌های پیش‌ساز و در نهایت تشکیل بیضه می‌شود (۱۱). جهت شناسایی کروموزوم X از ژن PLP استفاده می‌شود این ژن مسئول تولید پروتئولیبید پروتئین بر روی کروموزوم X می‌باشد در تمام بافت‌های عصبی و غیر عصبی بیان می‌شود (۱۲).

پژوهش حاضر به‌منظور بررسی استفاده از سطوح مختلف لسیتین سویا در رقیق‌کننده تریس بر کیفیت منی و نسبت جنسیت با استفاده از تکنیک real-time qPCR اجرا شد.

مواد و روش‌ها

تمامی مواد مورد استفاده در استخراج DNA از اسپرم‌ها از شرکت Merck آلمان تهیه شدند، به‌منظور انجام واکنش real-time qPCR از کیت تجاری

Amplicon (Cat. NO: 5000830-1250) استفاده شد.

جهت انجام پژوهش حاضر، نمونه‌گیری در مرکز تولید مواد ژنتیکی دام و طیور خوزستان، واقع در شهر ملاتانی در ۳۷ کیلومتری شمال شرقی اهواز انجام گرفت. مراحل مربوط به استخراج DNA و سایر مراحل آزمایشگاهی، در آزمایشگاه دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد.

نمونه‌گیری: نمونه‌گیری از چهار گاو بالغ نر نژاد هلشتاین در سن چهار سالگی به مدت چهار هفته، و یک بار در هر هفته با استفاده از مهبل مصنوعی انجام شد. بی‌درنگ پس از جمع‌آوری منی و انتقال آن به آزمایشگاه بررسی‌های ابتدایی روی منی اجرا شد. تحرک اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری و نمونه‌های دارای بیشتر از ۷۰ درصد تحرک به‌عنوان منی بهینه در نظر گرفته شد. پس از اطمینان از سالم بودن نمونه‌ها، منی جمع‌آوری شده از چهار گاو نر با هدف از میان برداشتن تاثیرات فردی با یک‌دیگر آمیخته شدند (۱۳).

رقیق‌سازی: نمونه‌های منی به ۳ بخش مساوی تقسیم شدند، به‌هرکدام از بخش‌های جداشده به‌ترتیب رقیق‌کننده تریس حاوی تریس (۰۳/۵۲ گرم در لیتر)، اسید سیتریک (۷۱ گرم در لیتر) و فروکتوز (۲۱/۵ گرم در لیتر) و پنی‌سیلین ۰۰۰۰۰۱ واحد بین‌المللی، استرپتو مایسین ۰۰۱ میلی‌گرم، آب مقطر تا حجم ۰۰۱ میل لیتر) و به اضافه لسیتین ۱ درصد و لسیتین ۲ درصد به‌صورت جداگانه افزوده شد (۱۴).

ارزیابی نمونه‌ها: pH نمونه‌های منی و فراسنجه‌های کیفی اسپرم نظیر تحرک، ناهنجاری، زنده‌مانی و سلامت غشا در طی دو مرحله قبل و بعد از رقیق‌سازی بررسی شدند. درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم با لام‌های رنگ‌آمیزی‌شده با ائوزین و نیگروزین بررسی شد. تحت بزرگنمایی ۱۰۰۰× میکروسکوپ حداقل ۲۰۰ اسپرم زنده

در میدان‌های میکروسکوپی مختلف در هر نمونه مورد ارزیابی قرار گرفته و سپس میزان اسپرم‌های ناهنجار مشاهده شده بر حسب درصد بیان گردید. برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم نقایصی چون سر جدا شده، قطره سیتوپلاسمی دور، دم پیچ‌خورده، سر باریک و سر بزرگ مد نظر قرار گرفت. سپس تخمین درصد اسپرم‌های زنده و مرده بعد از رنگ‌آمیزی با ائوزین و نیگروزین انجام شد. در این روش، اسپرم‌های مرده، رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند، ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای ارزیابی نمونه ده میکرولیتر اسپرم بر روی یک لام گرم تمیز قرار داده شد. لام‌ها پس از رنگ‌آمیزی، زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰× ارزیابی شدند. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های رنگ‌شده (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد (۱۵).

فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم، به‌وسیله آزمایش تورم هایپواسموتیک بررسی شد. مقدار ۳۰ میکرولیتر نمونه منی با ۳۰۰ میکرولیتر محیط هایپواسموتیک، مخلوط و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از مخلوط را روی لام ریخته و پس از تهیه گسترش روی لام و خشک شدن آن، در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰× بررسی شدند. از هر لام، تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. اسپرم‌های با دم گره‌خورده و متورم به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم در نظر گرفته‌شده و اسپرم‌های با دم صاف به‌عنوان اسپرم با غشای آسیب‌دیده تعیین شدند.

جداسازی اسپرم‌ها: در این تحقیق به منظور شستشوی منی و حذف سلول‌های مرده و سایر مواد اضافی منی در مرحله قبل و بعد رقیق‌سازی، از تکنیک شنا به‌سمت بالا (Swim up) استفاده شد (۱۶).

استخراج و تعیین کیفیت DNA جهت استخراج DNA از اسپرماتوزوئیدهای زنده جداسازی شده با تکنیک Swim up، از پروتکل استخراج نمکی استفاده شد (۱۷) و نیز جهت تعیین غلظت و خلوص DNA از

طول قطعه ۷۹ جفت باز و شماره بانک ژنی AC234910-2 مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تایید تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای طراحی شده ابتدا واکنش PCR انجام شد. در صورت تکثیر ژن‌های مورد نظر با استفاده از پرایمرهای مشخص شده، به منظور بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌ها از تکنیک real-time qPCR استفاده شد. لیست پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه از روش خلقی و همکاران (۱۸) گرفته شد؛ توالی، طول قطعه و نیز دمای اتصال هر پرایمر در جدول ۱ آمده است.

دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific) و ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید. **طراحی آغازگرها:** پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد نظر روی کروموزوم Y و X مشخص شدند. ژن SRY به عنوان ژن نرزی روی کروموزوم Y با طول قطعه ۸۹ جفت باز و با شماره بانک ژنی 1-AJ009913 انتخاب شد. همچنین ژن PLP به عنوان ژن ماده‌زایی با طول قطعه ۹۰ جفت باز و با شماره بانک ژنی 1-EU581861 انتخاب شد. از ژن گیرنده پروتئیناز فعال (PAR) به عنوان ژن مرجع استفاده شد. این ژن با

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real-Time qPCR

ژن	آغازگرها	طول محصول (جفت باز)	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
SRY	F:5'CTCAGACATCAGCAAGCAGC3' R:5'-GTAGTCTCTGTGCCTCCTCA-3'	۸۹	۶۰
PLP	F:5'GAGGGAGGGTGGATCATAGA3' R:5':CCTCTGGGACCTTCAACAAT3'	۹۰	۶۰
PAR	F:5'-GCCATCACATCTGAGACCAC-3' R:5'-GACTCAGCATCTCGAAGCAA-3'	۷۹	۶۰

Plusreal time PCR System (کشور آمریکا) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در پلت‌های مجزا انجام شد. جدول ۲ مراحل انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز را نشان می‌دهد.

واکنش real-time qPCR طی این مرحله، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز پیشرفته برای نمونه‌های DNA حاصل از اسپرماتوزوئید با ۲ تکرار آزمایشی برای ژن‌های PLP، SRY و PAR با استفاده از دستگاه (Step one

جدول ۲: چرخه دمایی مورد استفاده در واکنش real-time qPCR

مرحله	تعداد چرخه‌ها	دما	زمان
مرحله اول	۱	۹۵	۱۵ دقیقه
مرحله دوم	۴۰	۹۵	۱۵-۳۰ ثانیه
		۶۰	۳۰ ثانیه
		۷۲	۳۰ ثانیه
مرحله سوم		۷۰-۹۵	۱۰ ثانیه

گزارش از کلیه اطلاعات موجود به صورت فایل Word (نسخه ۲۰۱۳) استخراج شده و سپس به نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۳) انتقال داده شد. برای بررسی و تحلیل

آنالیز آماری جهت تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از real-time PCR ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Step-one ABI، یک

های کیفی اسپرم به حالت مایع مانند تحرک، زنده مانی، سلامت غشا و ناهنجاری و pH در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که تحرک اسپرم، زنده مانی و سلامت غشا تحت تاثیر تکنیک Swim up و سطوح مختلف لسیتین سویا قرار گرفته و در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان دادند ($p < 0.05$) و تکنیک Swim up منجر به کاهش معنی دار ناهنجاری در نمونه های مورد آزمایش نسبت به گروه شاهد گردیده است ($p < 0.05$). با توجه به نتایج ارائه شده، pH منی در همه رقیق کننده های استفاده شده نسبت به گروه شاهد اثر معنی داری را نشان نمی دهد.

مراحل فوق مقادیر مربوط به چرخه آستانه (CT) حاصل از تکرارهای بیولوژیکی و تکنیکی هر نمونه وارد نرم افزار Excel شد. به منظور محاسبه درصد نسبی ژن PLP و SRY در اسپرماتوزوئیدهای جمع آوری شده، میانگین CT برای تکرارهای تکنیکی محاسبه شد و پس از تعیین میزان $\Delta\Delta CT$ برای تمامی نمونه ها، تفاوت نسبی نمونه مورد آزمایش در مقابل نمونه کنترل با فرمول: $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام گردید (۱۹). بررسی آماری داده ها توسط نرم افزار SAS (نسخه ۹/۴) و آزمون t-test انجام شد.

نتایج

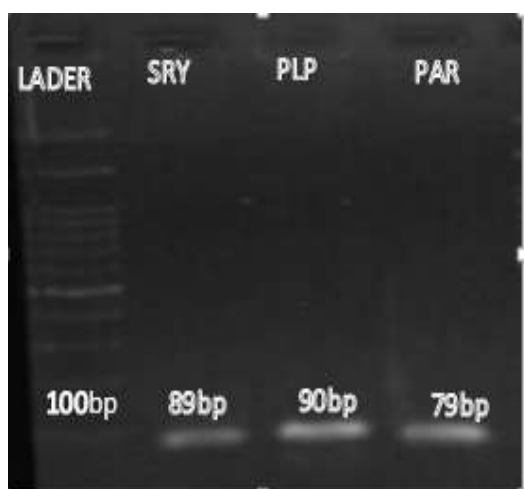
نتایج اثر تکنیک Swim up و افزودن سطوح مختلف لسیتین سویا (۱ درصد و ۲ درصد) در منی بر فراسنجه

جدول ۳: اثر سطوح مختلف لسیتین سویا بر فراسنجه های کیفی اسپرم در حالت مایع

pH	ناهنجاری (درصد)	سلامت غشاء (درصد)	زنده مانی (درصد)	تحرک (درصد)	
± 0.01 ۶/۹۶	4.7 ± 0.4^{abc}	74.2 ± 1.1^c	84 ± 2.16^c	72.2 ± 1.1^c	منی تازه ^۱
0.97 ± 0.0006 ۶	2.0 ± 0.4^d	86.7 ± 1.37^a	92 ± 1.47^{ab}	79.2 ± 1.7^b	Swim up
0.95 ± 0.0007 ۶	5.2 ± 0.4^{ab}	79.2 ± 0.75^b	90.7 ± 1.44^{ab}	81.5 ± 1.32^{ab}	لسیتین ۱
0.95 ± 0.0006 ۶	4 ± 0.4^{bcd}	91.2 ± 1.49^a	92.7 ± 1.43^a	84.7 ± 1.31^a	لسیتین ۲

a-c در هر ستون، میانگین های با حروف نامشابه اختلاف آماری معنی داری دارند ($P < 0.05$).

۱. منی رقیق شده با محیط پایه تریس بدون زرده تخم مرغ بعنوان شاهد در نظر گرفته شده است.



شکل ۱: نتیجه الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز بر روی ژل آگارز دو درصد

تکثیر ژن های SRY، PLP و PAR در شکل ۱ نشان داده شده است که تکثیر مناسب هر سه ژن را تایید نمود. جدول ۴ نتایج اثر تکنیک Swim up و افزودن سطوح مختلف لسیتین سویا (۱ و ۲ درصد) به رقیق کننده تریس بر بیان ژن SRY و PLP نشان می دهد. این نتایج نشان می دهد که تکنیک Swim up منجر به افزایش معنی دار ژن SRY و کاهش معنی دار ژن PLP نسبت به شاهد شده است ($p < 0.05$) و استفاده از سطوح مختلف لسیتین سویا در رقیق کننده تریس اثر معنی داری بر نسبت جنسیت اسپرم نسبت به تیمار شاهد نداشت.

جدول ۴: اثر سطوح مختلف لسیتین سویا بر بیان ژن SRY و PLP (خطای استاندارد \pm میانگین)

PLP	SRY	شاهد
۱ ^a	۱ ^b	Swim up
۰/۷۵ \pm ۰/۱۱ ^b	۱/۳۷ \pm ۰/۱۳ ^a	تریس-لسیتین ۱ درصد
۰/۹۶ \pm ۰/۰۷ ^a	۰/۹۴ \pm ۰/۱۲ ^b	تریس-لسیتین ۲ درصد
۰/۹۷ \pm ۰/۰۷ ^a	۰/۹۲ \pm ۰/۰۷ ^b	

*Arbitray unit (AU) به طور اختیاری بیان ژن شاهد عدد ۱ در نظر گرفته می شود (۲۰)

بحث

موجود در لسیتین سویا باشد که با ایجاد یک لایه محافظتی در سطح غشا باعث جلوگیری از آسیب‌های مکانیکی به غشا باشد (۲۶). پژوهشگران در طی آزمایشی روی رقیق‌کننده‌های مایع منی گاو گزارش کردند که استفاده از سطوح پایین‌تر لسیتین در مقایسه با سطح بالاتر آن باعث کاهش تحرک اسپرم شد که آن را به قدرت حفاظتی پایین سطوح کمتر لسیتین مرتبط ساختند (۲۷). به طور کلی توانایی حرکت اسپرم در رقیق‌کننده حاوی لسیتین، نسبت به رقیق‌کننده‌های حاوی منابع حیوانی که ویسکوزیته بیشتری دارند بهتر است، تاکنون سازوکارهای مولکولی علت تاثیر بهتر لسیتین بر جنبایی اسپرم مشخص نشده است اما گمان می‌رود که تغییر ساختار لیپیدی غشا اسپرم و تاثیرگذاری آن بر روانی غشا از دلایل آن باشد (۲۸). البته علاوه بر ویژگی‌های ذکر شده ویژگی‌های امولسیون‌کننده لسیتین می‌تواند رقیق‌کننده‌ی یکنواختی ایجاد کند که باعث می‌شود تاثیر محافظتی یکنواخت بهتری در سطح مولکولی برای غشا اسپرم ایجاد شود (۲۳).

در تئوری شتلز چنین ذکر شده است که اسپرم Y نسبت به اسپرم X سریع‌تر است و علت آن را سر کوچک‌تر اسپرم Y نسبت به اسپرم X عنوان کردند (۲۹). اسپرم حامل کروموزوم X حاوی DNA بیشتری نسبت به اسپرم حامل کروموزوم Y است که منجر به مهاجرت کندتر می‌شود و سرعت حرکت اسپرم حامل کروموزوم Y بیشتر از اسپرم حامل کروموزوم X است، اسپرم حامل کروموزوم Y دارای ۴ درصد DNA کمتری نسبت به اسپرم حامل کروموزوم X است پس سریع‌تر شنا می‌کند (۳۰). روش شنا کردن اسپرم، نمونه را به دو قسمت حرکتی و غیر

نتیجه گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که لسیتین سویا می‌تواند جایگزین مناسبی برای پروتئین زرده تخم مرغ باشد که بررسی‌های مختلف با نتایج متفاوتی بر روی آن انجام شده است. اما مطالعات در مورد اسپرم انسان و اثرات پروتئین زرده تخم مرغ و لسیتین سویا بر کیفیت اسپرم، سلامت DNA و توانایی اسپرم در اتصال به اسید هیالورونیک نشان دادند که اختلافی بین زرده تخم مرغ و لسیتین سویا در حفاظت اسپرم وجود ندارد (۲۱). سویا حاوی مقدار بالایی از فسفولیپیدهای شبیه زرده تخم مرغ است. لسیتین در حدود ۱۰ درصد از فسفولیپیدهای زرده را تشکیل می‌دهد و با توجه به حضور فسفولیپیدهای مشابه زرده در سویا می‌توان از آن به عنوان یک جایگزین گیاهی مناسب استفاده نمود (۲۲). البته علاوه بر ویژگی‌های ذکر شده ویژگی امولسیون‌کننده لسیتین نیز می‌تواند رقیق‌کننده یکنواختی ایجاد کند که باعث می‌شود تاثیر محافظتی بهتری در سطح مولکولی برای غشا اسپرم ایجاد شود (۲۳).

محققان با بررسی تاثیر رقیق‌کننده سویا بر فراسنجه‌های گاو هلشتاین در شرایط مایع گزارش کردند که زنده‌مانی، تحرک و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در رقیق‌کننده سویا همانند زرده تخم مرغ بوده و می‌تواند جایگزین مناسبی برای زرده تخم مرغ برای مایع منی گاو در ذخیره‌سازی در شرایط مایع باشد (۲۴). از دلایل افزایش تحرک در استفاده از لسیتین سویا می‌توان به غلظت بهینه لسیتین با ویسکوزیته و فشار اسمزی مناسب و همچنین ذرات ریز باقی‌مانده کمتر باشد (۲۵). یک پارچگی غشا اسپرم به دلیل تاثیر فسفولیپیدهای

محافظتی بالای دو رقیق کننده است که منجر به حفظ اسپرماتوزوئیدها و نیز نسبت جنسیت نمونه‌ها شده است. یکی از فاکتورهای ضروری جهت لقاح و باروری، سلامت DNA اسپرم است که هرگونه عوامل آندوژنی و آگزوژنی می‌تواند منجر به آسیب آن گردد و سلامت جنین را به مخاطره بیندازد، از مهم‌ترین عوامل آسیب DNA اسپرم که در اکثر انواع ناباروری‌های مردان تاثیرات مضر دارد می‌توان به افزایش سطح استرس اکسیداتیو اشاره نمود (۳۳). دو عامل می‌تواند اساس منشا آسیب DNA اسپرم باشد: یکی از این عوامل در طی فرایند اسپرمیوزن، نقص در پروتامین منجر به بسته‌بندی ضعیف کروماتین و ایجاد یک وضعیت آسیب‌پذیری در اسپرم می‌گردد و دیگری هنگامی که اسپرم از طریق منابع مختلف از جمله قرار گرفتن در معرض ROS برون‌زاد یا ROS درون‌زاد موجب فعال شدن آبشار آپوپتوزیس ذاتی و در نهایت آسیب اکسیداتیو DNA می‌شود (۳۴).

محققان بر این باورند که اسپرم بالغ به علت دارا بودن مقدار سیتوپلاسم محدود و سطح آنتی‌اکسیدانت پایین نسبت به سایر سلول‌ها و همچنین سطوح بالای اسیدهای چرب اشباع نشده در ساختار غشا خود، نسبت به سایر سلول‌ها، به استرس اکسیداتیو حساس‌تر است (۳۵). در سطوح بالای استرس اکسیداتیو، کروماتین اسپرم شروع به قطعه‌قطعه شدن می‌کند که این موضوع تاثیرات عمده‌ای را بر سلامت نسل‌های آینده اعمال می‌کند (۳۶)، در سطوح بالای استرس اکسیداتیو، کروماتین اسپرم شروع به قطعه‌قطعه شدن می‌کند و در نهایت آسیب DNA اسپرم را به همراه دارد که این موضوع می‌تواند بر میزان تخریب تلومرها کمک کند و باعث کوتاه‌شدگی طول تلومر در رده سلول‌های زایا گردد (۳۷).

منشا استرس اکسیداتیو اسپرم، میتوکندری است که تمایل به تولید سطوح بالای آنیون سوپراکسید دارد که منجر به شروع آبشار آپوپتوزیس می‌گردد، البته تفاوت بین سلول‌های اسپرم با سایر سلول‌ها در این راستا وجود

حرکتی تقسیم می‌کند. پس با توجه به این بیان می‌توان گفت که Swim up منجر به جداسازی اسپرم‌های زنده با تحرک بالاتر از اسپرم‌های مرده یا اسپرم‌های با تحرک پایین‌تر می‌شود. جداسازی اسپرم از اهمیت بالایی برخوردار است. اسپرم حامل کروموزوم X بزرگ‌تر و بلندتر از اسپرم حامل کروموزوم Y است و اسپرم حامل کروموزوم X، DNA بیشتری نسبت به اسپرم حامل کروموزوم Y دارد (۳۱). پس از شنا کردن، سرعت و درصد سلول‌های حرکتی به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند. تکنیک Swim up، اسپرم با حرکت سریع‌تر را انتخاب می‌کند (۳۲). با توجه به این‌که اسپرم‌های حامل کروموزوم X و Y گاو نر با سرعت‌های مختلف شنا می‌کنند و دارای فرصت‌های مختلف برای لقاح هستند. در طی آزمایشات محققان این نتایج به‌دست آمد که شنا کردن با استفاده از ستون عمودی موجب تولید مخزن غنی از اسپرم حامل کروموزوم Y شده که قادر به باروری تخمک‌ها و تولید جنین‌هایی با درصد بالاتر جنس نر می‌شود (۸).

طبق نتایج ارائه شده برای رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح مختلف لسیتین سویا نشان داده شده‌است که این رقیق‌کننده‌ها اثرات مشابهی روی زنده‌مانی و دوام سلول‌های اسپرم حامل کروموزوم X و Y داشته به‌گونه‌ای که استفاده از این رقیق‌کننده‌ها، اثر معنی‌داری در نسبت جنسیت اسپرم ایجاد نکرده است. از آن‌جاکه استفاده از رقیق‌کننده تریس- لسیتین سویا تغییری در نسبت جنسیت ایجاد نکرده است، دو فرضیه ارائه می‌گردد، فرضیه اول این‌که ترکیبات مشترک دو رقیق‌کننده استفاده شده، حساسیت یکسان سلول‌های اسپرم حامل کروموزوم X و Y نسبت به محیط رقیق‌کننده‌ها را نشان می‌دهد به‌گونه‌ای که اگر مرگ و میر و آسیب DNA، در نمونه‌ها رخ داده درصد برابری از اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X و Y را از بین برده است، فرضیه دیگر اثر

3. Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Li WY. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology*. 2008; 57(3): 257-262.
4. Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 1997; 9(5): 481-488.
5. Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of XY homologous gene amelogenin. *Biotechniques*. 1993; 15(4): 636-8.
6. Morrell JM, Keeler KD, Noakes DE, Mackenzie NM, et. Sexing of sperm by flow cytometry. *Vet Rec*. 1988; 122(14): 322-324.
7. Song M, Zhang R, Wang X. Nanotitanium dioxide enhanced biosensing of the interaction of dacarbazine with DNA and DNA bases. *Mater Lett*. 2006; 60(17): 2143-2147.
8. Azizeddin A, Ashkar FA, King WA, Revay T. Enrichment of Y-Chromosome-Bearing Bull Spermatozoa by Swim-up Through a Column. *Reprod Domest Anim*. 2014; 49(1): e1-e4.
9. Delgado PA, Lester TD, Rorie RW. Variation in the Ratio of X-to Y-Chromosome Bearing Spermatozoa in Ejaculates of Semen Collected Weekly from Beef Bulls. *Animal Science*. 2010; 28-30.
10. Said L, Banni M, Kerkeni A, Said K, et al. Influence of combined treatment with zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48(10): 2759-65.
11. Baarske LA, Capel B. B luring the edge in vertebrate sex determination. *Curr Opin Genet Dev*. 2008; 18(6): 499-505.

دارد (۳۸). از طرف دیگر، به نظر می‌رسد لسیتین باعث تخریب میتوکندری و کاهش انرژی در دسترس اسپرم برای جنبایی از طریق کاهش میزان کاردیولیپین و در نهایت تخریب غشا میتوکندری شده باشد (۳۹). نتایج مطالعات گسترده بیانگر خطر بالای انتقال بیماری‌های بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای در استفاده از رقیق‌کننده‌های با منشا گیاهی توسط کشورهای اروپایی به بازار مصرف عرضه شده که فرمول آن‌ها ناشناخته است. با توجه به هزینه نسبتاً بالای خرید این رقیق‌کننده‌ها لازم است که جهت ساخت رقیق‌کننده کارآمد با بهره‌گیری از نگهدارنده‌های با منشا گیاهی در داخل کشور اقدام شود. لسیتین سویا یک جایگزین مناسب برای منابع حیوانی بوده و موجب بهبود کیفیت منی می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که، لسیتین سویا منجر به بهبود فراسنجه‌های کیفی منی و عدم تغییر در نسبت اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X و Y شده است با در نظر گرفتن محدودیت‌های موجود در استفاده از منابع حیوانی در رقیق‌کننده‌ها، استفاده از لسیتین سویا به‌عنوان یک منبع گیاهی پیشنهاد می‌شود.

منابع

1. Hopkins BK, Herr C, Sheppard W. S. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reproduction, Fertility and Development*. 2012; 24(8): 1079-1083.
2. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*. 2003; 59(5-6): 1241-1255.

12. Sharawy SM, Saleh NH, Attalah SA, Absy GM, et al. Effect of plant extract of *Tribulusterrestris* and probiotics on the reproductive performance, total cholesterol and testosterone hormone levels of rams. *MENASJ*. 2015; 1(1): 14-19.
13. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*. 2003; 59(5-6): 1241-1255.
14. Mousavi SM, Tohidi A, Zhandi M, Mohammadi Sang Cheshmeh A, et al. Effect of osmolarity and glycerol different levels in soybean lecithin-based external on bovine sperm quality after cryopreservation. *J Anim Prod*. 2016; 18(3): 593-601.
15. De Graaf SP, Evans GL, Gillan MM, Guerra WM, et al. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*. 2007; 67(2): 217-227.
16. Hansen PJ. Alternative Sperm Purification Proce. University of Florida. Animal Science. 2013.
17. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3): 12-15.
18. Kholghi M, Heidari F, Rostamzadeh J, Razmkabir M. Investigation of the ratio of X and Y chromosomes population in Holstein bulls' ejaculation and the role of blood testosterone concentration on population ratio. *JCMR*. 2016; 29(1):72-79.
19. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(9): 1-10.
20. Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinform*. 2005; 6(62): 1-16.
21. Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. 2016; 85(1): 47-64.
22. Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasa, et al. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *J Reprod Develop*. 2008; 54(4): 286-289.
23. Zhang S, Hu J, Li Q, Jiang, Z. et al. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *Afr J Biotechnol*. 2009; 8(22): 76-80.
24. Rehman FU, Qureshi MS, Khan RU. Effect of soybean based extenders on sperm parameters of Holstein-Friesian bull during liquid storage at 4. *Pakist J Zool*. 2014; 46(1): 185-189.
25. Emamverdi M, Zhandi M, Zare Shahneh A, Sharafi M, et al. Optimization of Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically Defined Soybean Lecithin-Based Extender. *Reprod Domest Anim*. 2013; 48(6): 899-904.
26. Sharafi M, Forouzanfar M, Hosseini SM, Hajian M, et al. In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation. *Int J Fertil Steril*. 2009; 3(3): 149-152.
27. Van Wagendonk-de Leeuw AM, Haring RM, Kaal-Lansbergen LMTE, Den Doas JHG. Fertility result using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology*. 2000; 54(1): 57-67.

28. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 62(1-3): 143-172.
29. Spaulding GF. Sex-associated membrane proteins and methods for increasing the probability that offspring will be of a desired sex. Washington: United States patent; 1995.
30. Yan J, Feng HL, Chen ZJ, Hu J, et al. Influence of swim-up time on the ratio of X-and Y-bearing spermatozoa. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006; 129(2): 150-154.
31. Awan MA, Mehmood A, Sultana T, Shahzad Q, et al. Sperm sexing in Nili-Ravi buffalo through modified swim up: validation using SYBR® green real-time PCR. *Anim Reprod Sci.* 2017; 182: 69-76.
32. Henkel RR, Schill, WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 1(1): 108-130.
33. Gharagozloo P, Gutiérrez-Adán A, Champroux A, Noblanc A, et al. A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. *Hum Reprod.* 2016; 31(2): 252-262.
34. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Tavalae M. Failed fertilization after ICSI and spermogenic defects. *Fertil Steril.* 2008; 89(4): 892-898.
35. Du Plessis SS, Agarwal A, Halabi J, Tvrda E. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J assist Reprod Genet.* 2015; 32(4): 509-520.
36. De Iuliis, GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod.* 2009; 81(3): 517-524.
37. Cariati F, Jaroudi S, Alfarawati S, Raberi A, et al. Investigation of sperm telomere length as a potential marker of paternal genome integrity and semen quality. *Reprod Biomed online.* 2016; 33(3): 404-411.
38. Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, et al. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J.* 2011; 436: 687-698.
39. Del Valle I, Gómez-Durán A, Holt W V, Muiño-Blanco T, et al. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. *J Androl.* 2012; 33(4): 717-725.

The effect of different levels of soybean lecithin on semen quality and sex ratio of Holstien bull sperm by Real-time qPCR technique

Rostami S, M.Sc. *, Beigi Nassiri MT, Ph.D., Nazari M, Ph.D., Tabatabaei Vakili S, Ph.D.

-Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran

* Email corresponding author: s.rostami1585@gmail.com

Received: 19 Mar. 2019

Accepted: 22 Jan. 2020

Abstract

Aim: This study was designed to investigate the use of different levels of soybean lecithin in the Tris extender on semen quality and sex ratio using real-time qPCR technique.

Material and Methods: Sampling of 4 Holstien bulls was performed once a week, then the appropriate samples were mixed. Samples of sperm (in 4 replications) were divided into three groups: zero, one and two percentage soybean lecithin. The qualitative parameters and the sex ratio of the semen were determined. Swim up technique was used to wash the semen and remove the dead cells. Moreover, the PLP and SRY genes were propagated to separate the specific fragments of X- and Y-chromosomes sequences. In this procedure, PAR was used as a housekeeping gene to normalize the gene expression data in real-time qPCR.

Results: The results showed that swim up technique and different levels of soybean lecithin improve the semen quality. In addition, swim up technique significantly reduced PLP gene expression (0.75 ± 0.11), against increased SRY gene expression (1.37 ± 0.13). However, using of different levels of soybean lecithin did not change the sex ratio of the sperms.

Conclusion: In general, soybean lecithin is an appropriate substitute to animal sources and improves the quality of semen. Due to the limitations of using animal resources in bull extenders, the use of soybean lecithin as a plant source is suggested.

Keywords: real- time qPCR technique, Soybean lecithin, Sex ratio