علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۴ (ص ۵۳-۴۷)

تأثیر فیلترکردن رقیق‌کنندهٔ منی دست‌ساز بر پایهٔ لسیتین بر کیفیت اسپرم بز بعد از انجماد

مهدی ژندی[1*]، رضا نوعی رازلیقی[2] و محسن شرفی[3]
۱ و ۲. استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۳. استادیار، گروه علوم طیور، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۱۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۰/۱۲)

چکیده

هدف این مطالعه ارزیابی فیلترکردن رقیق‌کنندهٔ منی بر کیفیت اسپرم بز بعد از انجماد بود. شانزده انزال از چهار رأس بز (چهار انزال از هر بز) دو بار در هفته جمع‌آوری شد. بعد از جمع‌آوری منی و ارزیابی اولیه، نمونه‌های منی جمع‌آوری‌شده با هم مخلوط و سپس به دو قسمت مساوی تقسیم شدند. هر قسمت با یکی از دو رقیق‌کنندهٔ زیر رقیق شد: ۱. رقیق‌کنندهٔ فیلترنشده بر پایهٔ لسیتین و ۲. رقیق‌کنندهٔ فیلترشده بر پایهٔ لسیتین. بعد از یخ‌گشایی، فراسنجه‌های جنبایی و سرعت اسپرم، یکپارچگی و عملکرد غشای پلاسمایی، سطح مالون دی‌آلدئید، یکپارچگی آکروزوم و وضعیت آپوپتوزیس ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که فراسنجه‌های ارزیابی‌شده به‌جز درصد خطی‌بودن جنبایی، با هیچ‌یک از دو رقیق‌کننده تغییر نیافتند (P<۰/۰۵). در نتیجه به‌نظر می‌رسد که فیلترکردن رقیق‌کننده بر پایهٔ لسیتین اثر مخربی روی فراسنجه‌های کیفی آزمایشگاهی اسپرم ندارد. به هرحال، مطالعهٔ بیشتر برای آشکارکردن اثر فیلترکردن رقیق‌کننده به ارزیابی‌های آزمایشگاهی پیشرفته و باروری نیاز دارد.

واژه‌های کلیدی: **اسپرم، انجماد، بز نر، فیلترکردن، لسیتین.**

مقدمه

با توجه به اهمیت مدیریت تولید مثل در دام‌های مزرعه، تاکنون مطالعات گسترده‌ای در این زمینه در نشخوارکنندگان انجام نگرفته است. یکی از فناوری‌های کمک‌کننده به مدیریت تولید مثل دام‌ها، تلقیح مصنوعی است که در سال‌های اخیر در کشور به این موضوع در نشخوارکنندگان کوچک (گوسفند و بز) توجه ویژه‌ای شده است. در مرحلهٔ نخست برای انجام موفقیت‌آمیز تلقیح مصنوعی، به اسپرم مناسب برای تلقیح مصنوعی نیاز است. یکی از راه‌های نگهداری اسپرم بسیاری از گونه‌های حیوانی، منجمدکردن و نگهداری طولانی‌مدت آن‌هاست. از سال‌های دور تاکنون، ترکیبات منشأ گرفته از حیوانات از جمله شیر و زردهٔ تخم مرغ از اجزای اصلی رقیق‌کننده‌های منی در بسیاری از حیوانات از جمله بز بوده است. ترکیبات حیوانی به دلیل داشتن مشکلاتی از جمله انتقال آلودگی (Bousseau *et al*., 1998) و عدم یکنواختی در اجزاء (Emamverdi *et al*., 2013) نمی‌توانند برای رقیق‌کردن مناسب باشند؛ هرچند که قادر به حفاظت مناسب از اسپرم در فرایند انجماد هستند. به دنبال این مشکلات، برخی محققان ترکیبی به نام لسیتین سویا را به عنوان جایگزینی برای ترکیبات حیوانی استفاده می‌کنند. در حال حاضر رقیق‌کننده‌هایی با منشأ لسیتین سویا استفاده می‌شوند که به صورت تجاری تولید شده و از فرایند تولید آن‌ها اطلاعی در دسترس نیست. بنابراین به‌تازگی در کشور تحقیقاتی دربارهٔ تهیهٔ

* تلفن: ۰۹۱۲۷۶۸۸۰۵۱ - ۰۲۶۳۲۲۴۸۰۸۲
E-mail: mzhandi@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

دست‌ساز آن‌ها در آزمایشگاه انجام گرفته است (Emamverdi *et al*., 2013; Salmani *et al*., 2014; Sharafi *et al*., 2014). یکی از مشکلاتی که در تهیهٔ رقیق‌کننده‌های بر پایهٔ لسیتین سویا مشاهده می‌شود، وجود ذرات حل‌نشدهٔ لسیتین در رقیق‌کننده است و به نظر می‌رسد که موجب بروز اشکالاتی در بعضی ارزیابی‌ها خواهد شد. یکی از راه‌های حذف این ذرات، فیلترکردن رقیق‌کننده در حین آماده‌سازی رقیق‌کنندهٔ دست‌ساز است. بنابراین به نظر می‌رسد که رقیق‌کنندهٔ فیلترشده به ارزیابی‌های بهتری از منی رقیق‌شده در مقایسه با رقیق‌کنندهٔ فیلترنشده منجر شود. بنابراین هدف این آزمایش، مطالعهٔ اثر رقیق‌کنندهٔ فیلترشده بر پایهٔ لسیتین سویا بر برخی خصوصیات آزمایشگاهی اسپرم بز بعد از انجماد است.

مواد و روش‌ها

حیوانات و جمع‌آوری منی

در این مطالعه، از چهار رأس بز نر نژاد مهابادی با سنین سه تا چهار سال که در مزرعهٔ آموزشی-پژوهشی گروه علوم دامی دانشگاه تهران نگهداری می‌شد، استفاده شد. مجموع ۱۶ انزال (چهار انزال از هر بز در چهار تکرار) با استفاده از مهبل مصنوعی و هفته‌ای دو بار طی فصل غیرآمیزشی جمع‌آوری شد. بلافاصله بعد از جمع‌آوری، نمونه‌های منی در یک فلاسک حاوی آب ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه، هر نمونه از نظر حجم منی، جنبایی و غلظت مورد ارزیابی اولیه قرار گرفت و فقط نمونه‌هایی که دارای حجم بیشتر از ۰/۷۵ میلی‌لیتر، جنبایی بالاتر از ۰/۷۵ درصد و غلظت بالاتر از $۲/۵ \times ۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر بودند، برای ادامهٔ آزمایش انتخاب و استفاده شدند. بعد از ارزیابی اولیه، انزال‌ها برای جلوگیری از اثر تفاوت‌های فردی هر بز نر، با هم مخلوط شدند.

رقیق‌کردن، انجماد و یخ‌گشایی منی

در این آزمایش از بافر تریس (تریس (۳۰/۷ گرم در لیتر)، اسید سیتریک (۱۶/۸ گرم در لیتر) و فروکتوز (۱۲/۶ گرم در لیتر)) به عنوان بافر پایه استفاده شد. بعد از افزودن ۱ درصد (حجمی/وزنی) لسیتین سویا و ۵ درصد (حجمی/حجمی) گلیسرول، رقیق‌کنندهٔ نهایی بر پایهٔ لسیتین سویا تهیه شد (Salmani *et al*., 2013) و سپس ۱۵ دقیقه ورتکس و بعد از آن به دو قسمت مساوی تقسیم شد. یکی از قسمت‌ها به وسیلهٔ فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر (Jet-Biofil, Canada) فیلتر شد و قسمت دیگر بدون فیلتر استفاده شد. نمونه‌های منی مخلوط‌شده نیز به دو بخش مساوی تقسیم و هر بخش با یکی از رقیق‌کننده‌های گفته‌شده تا رسیدن به غلظت نهایی ۲۴۰ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر رقیق شد. نمونه‌های رقیق‌شدهٔ منی به داخل پایوت ۰/۲۵ میلی‌لیتری (IMV, L'Aigle, France) کشیده و قسمت باز پایوت با پودر پلی‌ونیل الکل بسته شد. سپس پایوت‌ها برای منجمدشدن، ۱۲ دقیقه در ارتفاع ۴ سانتی‌متری سطح نیتروژن مایع قرار گرفتند و بعد از آن تا زمان ارزیابی به نیتروژن مایع انتقال یافتند. برای ارزیابی‌های بعد از یخ‌گشایی، پایوت‌های منجمدشده در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم یخ‌گشایی شدند.

ارزیابی فراسنجه‌های جنبایی و سرعتی اسپرم

فراسنجه‌های جنبایی و سرعتی اسپرم با سیستم آنالیز کامپیوتری (CASA, Version 12 IVOS, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) ارزیابی شدند. فراسنجه‌های به‌دست‌آمده به این شرح هستند: جنبایی کل (TM، درصد)، جنبایی پیش‌رونده (PM، درصد)، میانگین سرعت در مسیر (VAP، میکرومتر در ثانیه)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL، میکرومتر در ثانیه)، سرعت در مسیر منحنی (VCL، میکرومتر در ثانیه)، جنبایی عرضی سر (ALH، میکرومتر)، تناوب عرضی زنش (BCF، هرتز)، درصد خطی‌بودن جنبایی (LIN، درصد) و راستی مسیر طی‌شده (STR، درصد).

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم

برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد (Salmani *et al*., 2013) برای این رنگ‌آمیزی، ۲۰ میکرولیتر از نمونهٔ اسپرم و ۲۰ میکرولیتر از رنگ آماده‌شدهٔ ائوزین- نیگروزین روی لام از پیش گرم‌شده قرار گرفتند و مخلوط شدند. پس از ۳۰

Archive of SID

www.SID.ir

ثانیه از قطرهٔ مخلوط یک گسترش روی لام تهیه شد و لام به‌سرعت خشک شد. لام حاصل زیر میکروسکوپ نوری (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ ارزیابی شد. از هر لام تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های رنگ‌نشده (زنده) محاسبه شد.

ارزیابی فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم

فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم به‌وسیلهٔ آزمایش تورم هایپواسموتیک بررسی شد (Salmani *et al*., 2013). به طور خلاصه، برای این آزمایش ۳۰ میکرولیتر نمونهٔ منی با ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی‌اسمول بر کیلوگرم مخلوط و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس یک قطره از مخلوط روی لام ریخته و گسترش تهیه شد. لام حاصل زیر میکروسکوپ فاز کنتراست (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ ارزیابی شد. از هر لام تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای دم گره‌خورده (اسپرم‌های دارای غشای فعال) محاسبه شد.

ارزیابی مقدار مالون دی‌آلدئید

مقدار مالون دی‌آلدئید (MDA) تولیدشده توسط آزمایش TBARS تعیین شد. به طور خلاصه، برای این آزمایش ۱ میلی‌لیتر از نمونهٔ اسپرم درون لولهٔ مخروطی ریخته شد. سپس به ترتیب ۱ میلی‌لیتر BHT، ۱ میلی‌لیتر EDTA و ۲ میلی‌لیتر TCA به نمونه اضافه شد. بعد از آن نمونه‌ها ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (۱۵۰۰ g) شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته و در یک میکروتیوب ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر TBA به آن افزوده شد و نمونه‌ها ۱۵ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگه داشته شدند تا سرد شوند و در آخر غلظت MDA موجود در نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV-1200, Shimadzu, Japan) در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد.

ارزیابی یکپارچگی آکروزوم

برای ارزیابی یکپارچگی آکروزوم از رنگ PSA-FITC استفاده شد. به طور خلاصه برای این رنگ‌آمیزی، ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپرم با غلظت ۱ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر به یک میکروتیوب اضافه و ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (۶۰۰ g) شد. سپس محیط بالایی برداشته شد و صفحهٔ اسپرم تشکیل‌شده در انتهای میکروتیوب در ۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد حل شد. اسپرم‌ها ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد فیکس شدند. بعد از آن ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم به صورت یک خط روی اسلاید شیشه‌ای قرار گرفت و اجازه داده شد تا اتانول تبخیر شود. سپس ۲۰ میکرولیتر از رنگ PSA-FITC (۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر) بر اسپرم‌های روی اسلاید ریخته شد. اسلاید ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس ۱۵ بار با آب دوبار تقطیرشده شستشو داده شد. در پایان به اسلایدها اجازه داده شد تا خشک شوند و بعد از ریختن گلیسرول روی نمونه، لامل‌گذاری انجام گرفت. در آخر ۲۰۰ اسپرم به وسیلهٔ میکروسکوپ مجهز به فیلتر فلورسنت (BX51, Olympus, Japan) و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ شمارش شدند. اسپرم‌های با سر سبزرنگ و سر بدون رنگ یا باند سبزرنگ در ناحیهٔ استوایی به ترتیب به عنوان اسپرم‌هایی با آکروزوم یکپارچه و اسپرم‌هایی با آکروزوم غیریکپارچه در نظر گرفته شدند (Emamverdi *et al*., 2013).

ارزیابی تغییر مکان فسفاتیدیل سرین

تعیین تغییر مکان فسفاتیدیل سرین غشای پلاسمایی اسپرم برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده، اسپرم‌های آپوپتوزشدهٔ اولیه، اسپرم‌های آپوپتوزشدهٔ انتهایی و اسپرم‌های نکروزشده با استفاده از یک کیت تجاری (IQP, Groningen, the Netherlands) مطابق دستور سازنده، با اندکی تغییر انجام گرفت. به طور خلاصه در این آزمایش، نمونهٔ منی با بافر کلسیم موجود در کیت شستشو و دوباره با آن برای به‌دست‌آوردن غلظت ۱ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر مخلوط شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از Annexin V-FITC به ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم اضافه و ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. بعد از آن، ۱۰ میکرولیتر از رنگ پروپیدیوم آیوداید (PI) به سوسپانسیون اسپرم اضافه و

Archive of SID

www.SID.ir

۱۵ دقیقهٔ دیگر نیز در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. در آخر، نمونه‌ها با دستگاه فلوسایتومتر (Becton Dickinson, San Khosoz, CA, USA) آنالیز شدند. بعد از آنالیز، نمونه‌های اسپرم به چهار زیرجمعیت تقسیم شدند: ۱. اسپرم‌های زندهٔ غیر آپوپتوزشده، ۲. اسپرم‌های آپوپتوزشدهٔ اولیه، ۳. اسپرم‌های آپوپتوزشدهٔ انتهایی، ۴. اسپرم‌های نکروزشده (Emamverdi *et al*., 2013).

آنالیز آماری

داده‌های این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS و رویهٔ GLM آنالیز شدند. نتایج به صورت میانگین حداقل مربعات ± اشتباه استاندارد میانگین نشان داده شده‌اند.

نتایج و بحث

به‌تازگی ساخت رقیق‌کننده‌های دست‌ساز بر پایهٔ لسیتین سویا در چندین مطالعه بررسی شده است (Emamverdi *et al*., 2013; Najafi *et al*., 2013; Salmani *et al*., 2013; Salmani *et al*., 2014). نتایج پژوهش‌های اخیر نشان‌دهندهٔ این است که لسیتین سویا به عنوان یک عامل محافظت‌کننده از سرما می‌تواند جایگزین مناسبی برای زردهٔ تخم‌مرغ باشد که در بیشتر رقیق‌کننده‌ها (Thun *et al*., 2002; Zanganeh *et al*., 2013) استفاده می‌شود. نتایج بیشتر آزمایش‌های گذشته نشان می‌دهد که کیفیت اسپرم بز و گوسفند که با استفاده از رقیق‌کننده‌های بر پایهٔ لسیتین سویا منجمد شده بودند، بعد از یخ‌گشایی در مقایسه با استفاده از رقیق‌کننده بر پایهٔ زردهٔ تخم‌مرغ تفاوتی نداشت؛ هرچند که در بعضی از فراسنجه‌ها در مقایسه با رقیق‌کننده بر پایهٔ زردهٔ تخم مرغ افزایش مشاهده شده است (Emamverdi *et al*., 2013; Salmani *et al*., 2013; Salmani *et al*., 2014). یکی از مواردی که طی آزمایش‌های فوق مشاهده شده است، وجود ذرات حل‌نشدهٔ لسیتین بوده که طبق گزارش‌های موجود، این ذرات می‌توانند به ایجاد اختلال در بعضی از ارزیابی‌های اسپرم به‌خصوص هنگام استفاده از سیستم آنالیز کامپیوتری جنبایی اسپرم و همچنین ارزیابی‌های فلوسایتومتریک بینجامند. برای حل این مشکل و داشتن محیط رقیق‌کنندهٔ شفاف و عاری از ذرات نامحلول راهکارهایی ارائه شده و همچنین راهکارهایی نیز در دست اجراست. یکی از روش‌هایی که تاکنون ارزیابی شده، استفاده از روش شیب غلظت پرکول است (Rodriguez-Martinez *et al*., 1997) که به حذف ذرات اضافی از رقیق‌کننده منجر می‌شود. اما این روش به دلیل گران‌بودن پرکول و همچنین وقت‌گیربودن عملاً به صورت عادی استفاده نمی‌شود. از روش‌هایی که احتمالاً در رقیق‌کننده‌های تجاری بر پایهٔ لسیتین سویا استفاده می‌شود، روش سونیکیت‌کردن و سایر روش‌های فیزیکی برای خردکردن لایه‌های لسیتین است که در حال حاضر پژوهش‌هایی نیز در این زمینه در کشور در حال اجراست (نتایج منتشر نشده است). روش اخیر هرچند که برای تولید رقیق‌کنندهٔ شفاف و کارآمد بسیار مفید است ولی معایبی از جمله نیاز به امکانات خاص و همچنین وقت‌گیربودن دارد. بنابراین با توجه به مشکلات روش‌های ذکرشده در این آزمایش از روش فیلترکردن استفاده شد که نیاز به امکانات خاصی نداشته و در عین حال وقت‌گیر نیز نیست.

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که جنبایی و فراسنجه‌های سرعتی اسپرم، فعالیت و یکپارچگی غشای پلاسمایی، سطح MDA و یکپارچگی آکروزوم و همچنین وضعیت آپوپتوزیس بین دو رقیق‌کنندهٔ فیلترشده و فیلترنشده تفاوت معناداری نداشتند. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد این عدم تفاوت در همهٔ فراسنجه‌ها به نحوی تأییدکنندهٔ همدیگر هستند. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که هرچند رقیق‌کنندهٔ فیلترشده از نظر شفافیت و نبود ذرات لسیتین وضعیت بهتری از رقیق‌کنندهٔ فیلترنشده دارد، ولی دیگر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بعد از یخ‌گشایی در مقایسه با رقیق‌کنندهٔ فیلترنشده که به‌صورت معمول در آزمایشگاه‌ها ساخته می‌شود، وضعیت متفاوتی ندارد. این بدین معناست که احتمالاً ذرات بزرگ‌تر لسیتین در محیط رقیق‌کننده تأثیرات مفیدی ندارند، زیرا حذف آن‌ها تأثیری روی کیفیت اسپرم نداشته است.

جدول ۱ نتایج اثر رقیق‌کننده‌های فیلترشده و فیلترنشده را بر جنبایی و فراسنجه‌های سرعتی اسپرم نشان می‌دهد. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، به جز

Archive of SID

www.SID.ir

LIN، سایر فراسنجه‌ها در دو نوع رقیق‌کننده دارای تفاوت معناداری نبودند. نتایج نشان می‌دهد که درصد LIN به‌طور معناداری در رقیق‌کنندهٔ فیلترنشده بیشتر از رقیق‌کنندهٔ فیلترشده است. در مطالعات گذشته گزارش شده است که لسیتین احتمالاً مانند یک لایهٔ پوششی روی اسپرم قرار می‌گیرد و موجب محافظت از آن در مقابل تنش‌های سرمایی می‌شود (Thun *et al*., 2002; Aires *et al*., 2003). همچنین گزارش شده است که رقیق‌کننده‌های بر پایهٔ لسیتین گرانروی کمتری در مقایسه با رقیق‌کننده‌های بر پایهٔ زردهٔ تخم‌مرغ دارند (Vishwanath & Shannon, 2000; Zhang *et al*., 2009) و احتمالاً حذف ذرات لسیتین درشت به وسیلهٔ فیلترکردن به کمترشدن این گرانروی منجر خواهد شد. نتایج مطالعهٔ حاضر گویایی این مطلب است، زیرا در حالتی که ذرات درشت لسیتین در محیط رقیق‌کننده وجود دارد، دستگاه آنالیز کامپیوتری اسپرم آن‌ها را به عنوان اسپرم جنبا در نظر گرفته و بدین صورت ارزیابی بالاتر از حد واقعی از مقدار اسپرم‌های جنبا ارائه خواهد داد (Vincent *et al*., 2012). با این حال، در این آزمایش و در گروه رقیق‌کنندهٔ فیلترشده، ارزیابی بالاتر از حد واقعی اسپرم‌های جنبا به دلیل حذف ذرات درشت لسیتین وجود ندارد و احتمالاً کاهش بیشتر گرانروی محیط رقیق‌کنندهٔ فیلترشده، به افزایش بیشتر جنبایی اسپرم و نشان‌دادن مقادیر مشابه با جنبایی حاصل از رقیق‌کنندهٔ فیلترنشده انجامیده است. علت دیگر نبود تفاوت در جنبایی هر دو رقیق‌کننده می‌تواند این باشد که ذرات حل‌نشدهٔ لسیتین به اندازه‌ای درشت نبوده‌اند که ارزیابی کامپیوتری اسپرم آن‌ها را به جای اسپرم در نظر گیرد. همچنین در این مطالعه دلیل بالاتربودن LIN در رقیق‌کنندهٔ فیلترنشده در مقایسه با رقیق‌کنندهٔ فیلترشده به‌خوبی مشخص نیست.

جدول ۱. اثر رقیق کننده‌های فیلترشده و فیلترنشده بر جنبایی و فراسنجه‌های سرعتی اسپرم بز (Lsmean±SEM)

رقیق‌کننده	جنبایی و فراسنجه‌های سرعتی								
	TM (درصد)	PM (درصد)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (درصد)	LIN (درصد)
رقیق‌کنندهٔ فیلترنشده	۳۷/۸۳	۲۱/۶۷	۹۱/۳۲	۷۱	۱۵۵/۷۲	۷/۴۷	۲۸/۷۳	۷۵/۸۳	۴۵/۳۳[a]
رقیق‌کنندهٔ فیلترشده	۳۳/۸۳	۲۰/۳۳	۸۴/۱۲	۶۳/۹۳	۱۴۸/۹	۷/۳۸	۲۹/۵۲	۷۳/۱۷	۴۲/۱۷[b]
اشتباه استاندارد میانگین	۲/۲۹	۱/۸۱	۳/۳۹	۲/۶۶	۶/۲۵	۰/۳	۱/۳۱	۱/۰۶	۰/۸۴

a, b. اعداد هر ستون که دارای حروف انگلیسی مشابه نیستند، اختلاف معناداری دارند (p<۰/۰۵).

در مطالعهٔ حاضر، نتایج ارزیابی‌های یکپارچگی (جدول ۲) و فعالیت غشای پلاسمایی (جدول ۲)، یکپارچگی آکروزوم (جدول ۳) و سطوح MDA (جدول ۳) تفاوت معناداری نشان نمی‌دهد و احتمالاً این تفاوت‌نداشتن به دلیل بی‌تأثیربودن حضور یا نبود ذرات حل‌نشدهٔ لسیتین در رقیق‌کننده بر این فراسنجه‌های کیفی اسپرم بوده است. در این زمینه تاکنون هیچ گزارشی منتشر نشده است.

جدول ۲. اثر رقیق‌کنندهٔ فیلترشده و فیلترنشده بر درصد یکپارچگی و فعالیت غشای اسپرم (Lsmean±SEM)

رقیق‌کننده	یکپارچگی غشای اسپرم (درصد)	فعالیت غشای اسپرم (درصد)
رقیق‌کنندهٔ فیلترنشده	۴۳/۶۷	۳۸/۱۷
رقیق‌کنندهٔ فیلترشده	۳۶/۶۷	۳۰
اشتباه استاندارد میانگین	۳/۵۸	۳/۵۸

جدول ۳. اثر رقیق‌کنندهٔ فیلترشده و فیلترنشده بر درصد یکپارچگی اکروزوم و سطح MDA (Lsmean±SEM)

رقیق‌کننده	یکپارچگی آکروزوم (درصد)	سطح MDA (نانومول در میلی‌لیتر)
رقیق‌کنندهٔ فیلترنشده	۶۱/۸۳	۲/۱۵
رقیق‌کنندهٔ فیلترشده	۶۰/۲	۱/۸۴
اشتباه استاندارد میانگین	۱/۱۳	۰/۲۸

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج بررسی تغییر مکان فسفاتیدیل سرین به عنوان شاخصی از وقوع آپوپتوزیس نشان می‌دهد که همهٔ فراسنجه‌های حاصل از این ارزیابی که شامل درصد اسپرم‌های زنده، اسپرم‌های آپوپتوزشدهٔ اولیه، اسپرم‌های آپوپتوزشدهٔ انتهایی و اسپرم‌های نکروزشده است، تفاوت معناداری بین دو رقیق‌کنندهٔ فیلترشده و فیلترنشده نشان نمی‌دهد (جدول ۴). در آخر به نظر می‌رسد که حضور ذرات حل‌نشدهٔ لسیتین بر نتایج حاصل از شمارش سلول‌های مختلف از نظر وضعیت آپوپتوزیس تأثیری نداشته است. این در صورتی است که در سایر پژوهش‌ها، وجود ذرات باعث ارزیابی‌های غیرواقعی از تعداد اسپرم‌های هر گروه شده که با روش‌های شستشو و رنگ‌آمیزی قبل از انجام فلوسایتومتری سعی در رفع مشکل ذرات حل‌نشدهٔ لسیتین شده است (Vincent *et al*., 2012). علت تفاوت در مطالعهٔ حاضر با سایر مطالعات می‌تواند به اندازهٔ ذرات لسیتین و رنگ‌ناپذیری آن‌ها در آزمایش حاضر مرتبط باشد؛ به طوری که احتمالاً ذرات حل‌نشده، رنگ فلورسنت استفاده‌شده در این ارزیابی را به خود جذب نکرده‌اند و دستگاه فلوسایتومتر آن‌ها را به عنوان اسپرم در نظر نگرفته است.

جدول ۴. اثر رقیق‌کنندهٔ فیلترشده و فیلترنشده بر درصد اسپرم‌های زنده، آپوپتوزشدهٔ اولیه، آپوپتوزشدهٔ ثانویه (Lsmean±SEM)

رقیق‌کننده	اسپرم زنده (درصد)	اسپرم آپوپتوزشدهٔ اولیه (درصد)	اسپرم آپوپتوزشدهٔ انتهایی (درصد)	اسپرم مرده (درصد)
رقیق‌کنندهٔ فیلترنشده	۳۶/۴۸	۱۹/۰۹	۳۶/۹۷	۴۴/۴۳
رقیق‌کنندهٔ فیلترشده	۳۵/۸۴	۲۰/۶۷	۳۶/۰۳	۴۳/۴۹
اشتباه استاندارد میانگین	۲/۶۲	۲/۰۹	۴/۰۵	۰/۷۶

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، از این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که فیلترکردن رقیق‌کننده بر پایهٔ لسیتین سویا تأثیر مفیدی بر فراسنجه‌های کیفی بعد از یخ‌گشایی اسپرم بز ندارد و از رقیق‌کنندهٔ حاوی ۱ درصد لسیتین سویا و بدون فیلترکردن می‌توان در انجماد اسپرم بز استفاده کرد.

REFERENCES

1. Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S. & Hinsch, E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60(2), 269-279.
2. Bousseau, S., Brillard, J. P., Marguant-Le Guienne, B., Guerin, B., Camus, A. & 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*, 50(5), 699-706.
3. Emamverdi, M., Zhandi, M., Zare Shahneh, A., Sharafi, M. & Akbari-Sharif, A. (2013). Optimization of ram semen cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin-based extender. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(6), 899-904.
4. Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B. & Pertoft, H. (1997). Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction Fertility and Development*, 9(3), 297-308.
5. Salmani, H., Nabi, M. M., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, M. B., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Towhidi, A., Zare Shahneh, A. & Zhandi, M. (2013). Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Research*, 112(1-3), 123-127.
6. Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M. & Sharafi, M. (2014). In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, 68(2), 276-280.
7. Sharafi, M., Zhandi, M. & Akbari Sharif, A. (2015). Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and Tissue Banking*, 16(2), 261-269.
8. Thun, R., Hurtadom M. & Janett, F. (2002). Comparison of Biociphos-Plus® and tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, 57(3), 1087-1094.
9. Vishwanath, R. & Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 23-53.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Vincent, P., Underwood, S. L., Dolbec, C., Bouchard, N., Kroetsch, T. & Blondin, P. (2012). Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Animal Reproduction*, 9(3), 153-165.
11. Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneha, A., Najafia, A., Nabia, M. M. & Mohammadi-Sangcheshmeh, A. (2013). Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? *Small Ruminant Research*, 114(1), 120-125.
12. Zhang, S. S., Hu, J. H., Li, Q. W., Jiang, Z. L. & Zhang, X. Y. (2009). The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology*, 8(22), 6476-6480.

Archive of SID

www.SID.ir