DOI: 10.22092/vj.2019.127902.1623
شماره ۱۲۹ زمستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

اثر نانوذرات لسیتین سویا در رقیق‌کننده بر ماندگاری اسپرم قوچ در شرایط سرد

• **لیلا افضلی چگنی**
دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
• **سید مجتبی موسوی (نویسنده مسئول)**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
• **مجید خالداری**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
• **سعید محمد زاده**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۷-۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۹-۱۳
Email: mousavi.sym@lu.ac.ir

چکیده

از آنجاکه نگهداری اسپرم قوچ در شرایط سرد از راندمان کافی برخوردار نیست، لذا هدف از این پژوهش، بررسی اثر نانوذرات لسیتین سویا در رقیق‌کننده اسپرم قوچ در شرایط سرد بود. بر این اساس، از سه رأس قوچ بالغ لری بختیاری با استفاده از واژن مصنوعی، دوبار در هر هفته اسپرم‌گیری شد. بعد از ارزیابی اولیه، نمونه‌های منی با هم مخلوط شده و به هفت قسمت مساوی تقسیم شدند و با تیمارهای مختلف، رقیق شدند. تیمارها شامل رقیق‌کننده حاوی سطوح مختلف نانو-ذرات لسیتین سویا (نیم، یک، یک‌ونیم، دو، دوونیم و سه درصد (وزن/حجم) و زرده تخم‌مرغ بودند. سپس نمونه‌ها در یخچال نگهداری شدند و در زمان‌های سه، شش، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، از لحاظ درصد جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی اسپرم، فعال بودن غشای اسپرم، ریخت‌شناسی و نرخ قطعه قطعه شدن DNA ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که رقیق‌کننده حاوی ۱/۵٪ نانوذرات لسیتین، پس از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای سرد، دارای بیشترین درصد اسپرم با جنبایی کل و پیش‌رونده بود. درصد زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده حاوی سه درصد لسیتین سویا نسبت به سایر تیمارها، کمترین مقدار را داشت (P<۰/۰۵). رقیق‌کننده‌ها از لحاظ درصد اسپرم با غشای فعال و ریخت‌شناسی تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. نرخ قطعه قطعه شدن DNA در تیمارهای نیم و سه درصد نانوذرات لسیتین نسبت به سایر تیمارها، به طور معنی‌داری بیشتر بود. در کل، رقیق‌کننده دارای ۱/۵٪ نانوذرات لسیتین سویا در قوچ لری بختیاری، می‌تواند جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ در حفظ کیفیت اسپرم در شرایط سرد باشد.

کلمات کلیدی: اسپرم، رقیق‌کننده، شرایط سرد، قوچ

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 129 pp: 142-150

The effect of soy lecithin nano particles in extender on durability of ram sperm in cool conditions

By: Afzali Chegeni, L., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Mousavi, S.M., (Corresponding Author) Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Khaldari, M., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. and Mohammadzadeh, S., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

Received: 2019-09-28 **Accepted: 2019-12-04**

Email: mousavi.sym@lu.ac.ir

Since preserve ram sperm in cold condition has not sufficient efficiency, the objective of the present study was to assess the effect of different levels (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3%) of soy lecithin nano particles and egg yolk in extender on ram sperm quality during storage cool conditions. Semen samples were collected from three Lori Bakhtiari rams using artificial vagina. Afterward, ejaculates were pooled and then divided into seven aliquots. Aliquots were diluted with extenders and stored at 5°C for 72 hours. Total and progressive motility, sperm viability, plasma membrane functionality (HOS), morphology and DNA fragmentation were evaluated at 0, 3, 6, 24, 48 and 72 hours after starting the experiment. The results showed that the extender containing 1.5% nano-lecithin had the highest percentage of total and progressive motility of sperm after 72 hours of storage at cold conditions. The extender containing 3% nano-lecithin had the lowest viable sperm compared to other treatments ($p \leq 0.05$). There was no significant difference between all of the extenders for plasma membrane functionality and morphology parameters. DNA fragmentation rate was bigger in treatments containing 0.5 and 3% lecithin nano particles than other treatments. In general, it seems that extender containing 1.5% nano-lecithin can be an appropriate substitute for semen extenders containing egg yolk to store ram sperm in cool conditions.

Keyword: Extender, Cold conditions, Ram, Sperm

مقدمه

تلقیح مصنوعی یکی از فن‌آوری‌های تولیدمثلی است که به طور تجاری برای پیشرفت ژنتیکی حیوانات از اواسط دهه ۱۹۰۰ استفاده شده است. از منی تازه و رقیق شده قوچ‌های با نژاد برتر برای تولید انبوه گوسفندها، استفاده شده است. بارور نمودن همزمان تعداد زیادی میش با استفاده از اسپرم قوچ‌های با نژاد برتر، نیازمند انتقال منی از مرکز تولید و جمع آوری به مزارع، در فواصل دور است. همچنین امکان استفاده از اسپرم در زمان‌های مختلف سال، مشوق محققان برای ذخیره اسپرم در شرایط آزمایشگاهی شده است. برای این منظور باید از روش‌هایی استفاده شود که با کاهش یا توقف سوخت‌وساز، عمر باروری اسپرم‌ها افزایش یابد (۲۶). بر این اساس، یکی از راههای پیشنهادی محققین، نگهداری اسپرم در حالت مایع و کاهش دمای آن به ۱۰-۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط آزمایشگاهی است. نگهداری در حالت مایع، تنها برای نگهداری و ذخیره کوتاه مدت امکان پذیر است. اما به دلیل مشکلاتی که در زرده تخم‌مرغ وجود دارد، پژوهشگران در صدد جایگزینی آن با منابع دیگری از جمله منابع گیاهی بوده‌اند. با توجه به این که فسفولیپیدها و به ویژه فسفاتیدیل‌کولین، مهم‌ترین بخش تاثیرگذار در نگهداری و بازسازی غشای اسپرم است، پس می‌توان از ترکیب همانند موجود در لیپیدهای دانه سویا که لسیتین سویا می‌باشد، به عنوان جایگزین زرده استفاده نمود (۱).

اگرچه مزیت رقیق‌کننده‌های اسپرم بر پایه لسیتین سویا، از لحاظ بهداشتی، مورد پذیرش است، اما بازده اثر رقیق‌کننده‌های بر پایه لسیتین سویا، هنوز مورد بحث است. لسیتین در ساختمان خود دارای اسیدچرب است و به آسانی در آب. حل نمی‌شود. در پژوهش‌های مختلف در محیط تریس و گلیسرول برای حل کردن لسیتین از دستگاه ورتکس استفاده شده است. از آنجاکه وجود ذرات با اندازه درشت در رقیق‌کننده، جنبایی و زنده‌مانی اسپرم را کاهش می‌دهد (۱۸)، از اینرو، در تحقیق حاضر، جهت کمتر کردن گرانروی لسیتین، افزایش انحلال و تولید ذرات نانو، ابتدا ذرات چربی لسیتین، در حد نانومتر خرد شدند، سپس اثر سطوح مختلف نانوذرات لسیتین بر روی کیفیت اسپرم پس از فرآیند نگهداری در شرایط سرد ارزیابی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از تعداد سه رأس قوچ بالغ نژاد لری-بختیاری (۳ تا ۵ ساله) با استفاده از واژن مصنوعی، دو بار در هفته اسپرم‌گیری صورت گرفت. نمونه‌های منی در درون لوله‌های مدرج ریخته شده و با کمک فلاسک حاوی آب ۳۵ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده کشاورزی منتقل شدند. نمونه‌ها بلافاصله در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. انزال‌هایی که معیارها و شرایط ذیل را داشتند، برای انجام آزمایش انتخاب شدند: حجم ml ۲-۰/۵؛ غلظت بیشتر از ۳×۱۰^{۹} اسپرم در هر ml؛ جنبایی بالای ۸۰٪ و کمتر از ۱۰٪ اسپرم ناهنجار. بلافاصله بعد از جمع‌آوری و ارزیابی اولیه نمونه‌ها، به منظور جلوگیری از اثرات و پراکنش فردی قوچ‌ها، انزال‌های جمع‌آوری‌شده همه باهم مخلوط شده و برای آزمایش استفاده شدند. منی مخلوط شده به هفت قسمت مساوی تقسیم گردید و هر قسمت به نسبت یک به ۲۰، با رقیق‌کننده‌های مختلف، رقیق شدند. شش رقیق‌کننده با اضافه کردن سطوح مختلف نانوذرات لستین سویا (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵٪ (وزن/حجم) و زرده تخم‌مرغ (۱۵٪ (حجم/حجم)) به رقیق‌کننده پایه، آماده شدند. رقیق‌کننده پایه بر پایه‌ی تریس حاوی (۲/۷ g) تریس، ۱ g فروکتوز، ۱/۴ g سیتریک اسید در ml ۱۰۰ آب دو بار تقطیر)، با PH =۷/۲ و اسمولاریته ۳۲۰ mOsm، به عنوان رقیق‌کننده پایه استفاده شد (۱۱). سپس لوله‌های مخروطی حاوی نمونه‌های مایع منی رقیق‌شده، در ظرف حاوی ml ۱۰۰ آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (برای سرد شدن تدریجی) و در یخچال با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. نمونه‌های هر تیمار در زمان‌های صفر، سه، شش، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از نگهداری در یخچال، از لحاظ درصد جنبایی کل و پیش‌رونده (به روش چشمی)، زنده‌مانی اسپرم (با رنگ‌آمیزی ائوزین نیگروزین)، ریخت‌شناسی (با محلول هانکوک)، یکپارچگی غشای اسپرم (با روش‌هاس) و نرخ قطعه قطعه شدن DNA (با استفاده از کیت) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای تولید نانوذرات لسیتین، پس از آماده‌سازی محیط‌های حاوی سطوح مختلف لسیتین، ابتدا به مدت نیم ساعت ورتکس شدند سپس در دستگاه اولتراسوند قرار داده شدند و پس از مدت زمان تعیین شده برای دستگاه اولتراسونیک که معمولاً برای هر نمونه ۴۵ دقیقه (پنج ثانیه کار و ۱۰ ثانیه استراحت) به طول انجامید، نمونه‌های حاوی نانوذرات لسیتین آماده شدند. سپس، نمونه‌ها با نیروی g × ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شده و با فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ mμ، فیلتر شدند (۱۹).

ارزیابی‌های کیفیت اسپرم بعد از زمان‌های مختلف نگهداری

فراسنجه‌های جنبایی اسپرم

بررسی درصد جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم با روش ارزیابی چشمی و با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست (بزرگنمایی ۴۰) انجام شد (۵). در این روش مقدار ۵ µl از نمونه مستقیماً روی لام از قبل گرم شده (در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار داده و بعد از پوشش با لامل، روی صفحه میکروسکوپ قرار داده شد. تخمین جنبایی اسپرم در سه میدان مختلف میکروسکوپی برای هر نمونه انجام گردید. میانگین سه برآورد متوالی به عنوان مقدار جنبایی نهایی ثبت شد.

یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم (زنده‌مانی اسپرم)

برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد (WHO). برای آماده‌سازی رنگ ۱/۶۷ g ائوزین Y به همراه ۲/۹ g سیترات سدیم در ml ۱۰۰ آب مقطر با حرارت ملایم حل شد. سپس، ۱۰ g رنگ نیگروزین به محلول قبلی اضافه گردید و جوشانده شد. در مرحله پایانی، محلول رنگ تهیه‌شده در دمای اتاق سرد و برای جداسازی ذرات ژله‌ای، با فیلتر ۰/۲ mμ، فیلتر شد. برای ارزیابی نمونه، ۱۰ µl اسپرم به‌وسیله سمپلر بر روی یک لام گرم و تمیز قرار داده شد. پس از رنگ‌آمیزی، لام‌ها زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ ارزیابی شدند. از هر لام، ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده)، محاسبه گردید.

فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم

فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم، به‌وسیله آزمایش تورم هایپواسموتیک (هاس) بررسی شد. برای ساخت محیط هاس، ۰/۹ g فروکتوز و ۰/۴۹ g سدیم سیترات در ml ۱۰۰ آب مقطر حل شد. ابتدا ۳۰ µl از نمونه منی با ۳۰۰ µl از محیط هاس مخلوط و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شد. سپس، ۱۰ µl از مخلوط روی لام ریخته و گسترش تهیه شد. لام حاصل، زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، ارزیابی گردید. از هر لام، تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای دم گره‌خورده (اسپرم‌های دارای غشای فعال) محاسبه شد.

ریخت‌شناسی اسپرم

برای ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم، از محلول هانکوک استفاده شد. محیط هانکوک شامل ml ۶۲/۵ فرمالین (۳۷٪)، ml ۱۵۰ محلول سالین، ml ۱۵۰ محلول بافر و ml ۵۰۰ آب دو بار تقطیر بود. محلول بافر از دو محیط جداگانه تشکیل‌شده است. محیط نخست شامل g ۲۱/۶۸۲ دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبدار در ml ۵۰۰ آب دو بار تقطیر و محیط دوم، از g ۲۲/۲۵۴ فسفات پتاسیم در ml ۵۰۰ آب دو بار تقطیر، تشکیل‌شده است. با مخلوط کردن ml ۲۰۰ از محیط نخست با ml ۸۰ از محیط دوم، ml ۲۸۰ محلول بافر تهیه شد. برای ارزیابی ناهنجاری‌های اسپرم سه قطره از هر نمونه اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به میکروتیوب حاوی یک ml از محلول هانکوک افزوده شد. سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفت و لامل گذاری شد و با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. برای محاسبه درصد کل اسپرم‌های غیرطبیعی (غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) تعداد ۲۰۰ اسپرم از هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت و شمارش شد.

آسیب به DNA اسپرم

به منظور ارزیابی سلامت کروماتین و DNA اسپرم از کیت (SDFA Sperm DNA Fragmentation Assay) استفاده گردید که روش آن به شرح زیر است:

در این آزمایش در یک بستر میکرو ژلی تحت تأثیر یک تیمار اسیدی، کروماتین و DNA اسپرم دناتوره می‌شود. در مرحله بعد با حذف

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئین‌های کروماتین، رشته‌های DNA تا حد ممکن در اطراف سر اسپرم پخش می‌گردند که طی رنگ‌آمیزی به‌صورت هاله‌ای در اطراف سر اسپرم قابل مشاهده هستند. این در حالی است که شکست DNA اسپرم منجر به عدم گسترش رشته‌های DNA و نیز عدم مشاهده هاله یا هاله‌های خیلی کوچک در اطراف سر اسپرم می‌گردد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت اندازه‌گیری‌های مکرر انجام شد و بعد از تجزیه و تحلیل آماری دادها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS، با استفاده از proc MIX، میانگین تیمارها با آزمون LSMeans مقایسه شدند. هر تیمار شش تکرار داشت. برای هر تکرار، پایوت برای ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم، استفاده شد. داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین حداقل مربعات بیان شدند و اختلافات در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. مدل مورد استفاده برای آنالیز متغیرها در این آزمایش به صورت زیر بود:

$$Yijk = \mu + Ti + Pj + (T\times P)ij + eijk$$

که در این مدل Yijk: بیانگر مشاهده مربوط به اثر i امین تیمار و j امین زمان،μ: بیانگر میانگین جامعه برای صفت مورد نظر، Ti: اثر تیمار، Pj: اثر زمان و T×P(ij): بیانگر برهمکنش اثر تیمار و زمان و eijk: اثر تصادفی باقیمانده است.

نتایج

در پژوهش حاضر، اثر سطوح مختلف نانوذرات لسیتین بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم قوچ پس از فرآیند نگهداری در شرایط سرد معنی‌دار بود (جدول ۱ و ۲)، به طوریکه رقیق‌کننده حاوی ۱/۵٪ نانوذرات لسیتین نسبت به سایر رقیق‌کننده‌های حاوی لسیتین، پس از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای سرد، دارای بیشترین درصد جنبایی کل (۴۹٪) و پیشرونده (۴۰٪) بود.

درصد اسپرم با غشای یکپارچه (درصد زنده‌مانی) در رقیق‌کننده حاوی سه درصد نانوذره لسیتین سویا نسبت به سایر تیمارها، کمتر بود (P<۰/۰۵) و سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۳).

پس از نگهداری اسپرم‌ها به مدت ۷۲ ساعت در شرایط سرد، رقیق‌کننده‌ها از نظر درصد اسپرم با غشای فعال (جدول ۴) و درصد اسپرم هنجار (جدول ۵) تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند.

علاوه بر این، نرخ شکستگی DNA در تیمارهای نیم و سه درصد نانوذرات لسیتین سویا نسبت به سایر تیمارها، بیشتر بود (جدول ۶).

بحث

ذخیره اسپرم تازه قوچ در چهار درجه سانتی‌گراد می‌تواند یک جایگزین

جدول ۱- درصد جنبایی کل اسپرم‌ها در زمان‌های مختلف در رقیق‌کننده‌های متفاوت

نوع رقیق‌کننده	ساعات پس از اسپرم‌گیری				
	۳	۶	۲۴	۴۸	۷۲
Yolk	۸۰/۰۰ a	۶۸/۰۰ b	۶۴/۰۰ a	۵۴/۰۰ a	۴۵/۰۰ ab
۰,۵-L	۷۳/۰۰ abc	۶۶/۰۰ b	۵۲/۰۰ b	۴۳/۰۰ b	۳۴/۰۰ b
۱-L	۷۴/۰۰ abc	۶۷/۰۰ b	۵۴/۰۰ b	۴۴/۰۰ b	۴۰/۰۰ ab
۱,۵-L	۷۸/۰۰ ab	۷۶/۰۰ a	۶۶/۰۰ a	۵۵/۰۰ a	۴۹/۰۰ a
۲-L	۷۲/۰۰ bc	۶۷/۰۰ b	۵۵/۰۰ b	۴۳/۰۰ b	۳۴/۰۰ b
۲,۵-L	۷۲/۰۰ bc	۶۲/۰۰ bc	۵۴/۰۰ b	۴۶/۰۰ b	۳۳/۰۰ b
۳-L	۶۷/۰۰ c	۵۸/۰۰ c	۵۴/۰۰ b	۴۶/۰۰ b	۲۷/۰۰ c
SEM	۲/۴۹	۲/۳۶	۱/۹۷	۱/۹۸	۳/۹۱

Yolk: زرده تخم‌مرغ، ۰,۵-L، ۱-L، ۱,۵-L، ۲-L، ۲,۵-L و ۳-L به ترتیب، مقدار نیم، یک، یک‌ونیم، دو، دوونیم، و سه درصد نانوذرات لسیتین سویا است. در هر ستون، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- درصد جنبایی پیش رونده اسپرم‌ها در زمان‌های مختلف در رقیق‌کننده‌های متفاوت

نوع رقیق‌کننده	ساعات پس از اسپرم‌گیری				
	۳	۶	۲۴	۴۸	۷۲
Yolk	۷۴/۰۰ a	۶۲/۰۰ b	۵۷/۰۰ a	۵۰/۰۰ a	۳۵/۰۰ ab
۰,۵-L	۳۶/۰۰ bc	۵۸/۰۰ bc	۴۵/۰۰ b	۳۸/۰۰ b	۲۵/۰۰ c
۱-L	۶۸/۰۰ bc	۶۱/۰۰ b	۴۸/۰۰ b	۳۹/۰۰ b	۲۹/۰۰ bc
۱,۵-L	۷۲/۰۰ ab	۷۰/۰۰ a	۶۰/۰۰ a	۵۰/۰۰ a	۴۰/۰۰ a
۲-L	۶۶/۰۰ bc	۶۱/۰۰ b	۴۹/۰۰ b	۳۸/۰۰ b	۲۷/۰۰ bc
۲,۵-L	۶۶/۰۰ bc	۵۶/۰۰ bc	۴۷/۰۰ b	۴۲/۰۰ b	۲۴/۰۰ c
۳-L	۶۱/۰۰ c	۵۲/۰۰ c	۴۸/۰۰ b	۴۱/۰۰ b	۲۲/۰۰ c
SEM	۲/۴۳	۲/۳۴	۲/۱۲	۱/۷۶	۳/۱۰

Yolk: زرده تخم‌مرغ، ۰,۵-L، ۱-L، ۱,۵-L، ۲-L، ۲,۵-L و ۳-L به ترتیب، مقدار نیم، یک، یک‌ونیم، دو، دوونیم، و سه درصد نانوذرات لسیتین سویا است. در هر ستون، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

جدول ۳- درصد اسپرم‌های زنده در زمان‌های مختلف در رقیق‌کننده‌های متفاوت

نوع رقیق‌کننده	ساعات پس از اسپرم‌گیری				
	۳	۶	۲۴	۴۸	۷۲
Yolk	۹۸/۲۳ a	۹۶/۶۷ a	۹۰/۳۲ a	۸۷/۱۴ a	۶۸/۵۳ a
۰,۵-L	۷۳/۵۱ b	۷۲/۲۳ b	۶۱/۶۴ bc	۶۰/۳۲ bc	۴۴/۰۱ abc
۱-L	۷۷/۶۴ b	۷۰/۴۱ b	۷۰/۱۵ b	۶۹/۶۳ b	۶۵/۴۸ ab
۱,۵-L	۷۷/۴۴ b	۷۵/۵۴ b	۷۲/۰۰ b	۷۱/۷۸ b	۶۱/۸۳ ab
۲-L	۷۸/۴۱ b	۷۱/۶۷ b	۷۱/۹۵ b	۷۱/۰۹ b	۶۷/۲۲ ab
۲,۵-L	۷۹/۴۳ b	۷۳/۹۳ b	۷۱/۸۹ b	۶۹/۷۵ b	۴۴/۵۰ abc
۳-L	۷۱/۹۴ b	۷۰/۳۵ b	۷۰/۱۲ b	۶۹/۷۴ b	۳۲/۰۶ c
SEM	۴/۳۱	۴/۷۷	۴/۵۸	۵/۳۶	۸/۸۵

Yolk: زرده تخم‌مرغ، ۰,۵-L، ۱-L، ۱,۵-L، ۲-L، ۲,۵-L و ۳-L به ترتیب، مقدار نیم، یک، یک‌ونیم، دو، دوونیم، و سه درصد نانوذرات لسیتین سویا است. در هر ستون، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- درصد اسپرم‌های با غشای فعال در زمان‌های مختلف در رقیق‌کننده‌های متفاوت

نوع رقیق‌کننده	ساعات پس از اسپرم‌گیری				
	۳	۶	۲۴	۴۸	۷۲
Yolk	۷۰/۷۰	۶۳/۳۱	۷۶/۱۲	۶۲/۳۰	۵۲/۶۹
۰,۵-L	۷۳/۲۴	۷۲/۴۹	۷۶/۱۹	۶۳/۹۲	۶۵/۱۳
۱-L	۷۶/۲۴	۷۰/۱۱	۷۳/۷۲	۶۶/۳۶	۵۹/۴۳
۱,۵-L	۷۵/۷۸	۷۲/۷۵	۷۰/۶۴	۶۰/۵۵	۵۷/۷۲
۲-L	۷۳/۹۶	۷۱/۸۳	۷۲/۷۲	۶۴/۳۷	۵۶/۵۳
۲,۵-L	۷۶/۶۶	۷۴/۲۸	۷۲/۵۷	۶۹/۹۰	۵۹/۸۰
۳-L	۸۱/۷۱	۷۸/۰۸	۷۱/۵۷	۶۶/۶۹	۵۸/۳۳
SEM	۴/۵۹	۴/۸۴	۳/۰۲	۵/۴۹	۵/۷۳

Yolk: زرده تخم‌مرغ، ۰,۵-L، ۱-L، ۱,۵-L، ۲-L، ۲,۵-L و ۳-L به ترتیب، مقدار نیم، یک، یک‌ونیم، دو، دوونیم، و سه درصد نانوذرات لسیتین سویا است.

جدول ۵- درصد اسپرم‌های هنجار در زمان‌های مختلف در رقیق‌کننده‌های متفاوت

نوع رقیق‌کننده	ساعات پس از اسپرم‌گیری				
	۳	۶	۲۴	۴۸	۷۲
Yolk	۸۷/۹۴	۸۵/۶۴	۸۳/۷۳	۸۲/۵۱	۸۱/۲۱
۰,۵-L	۸۶/۵۷	۸۵/۸۲	۸۶/۷۶	۸۲/۸۴	۸۰/۳۷
۱-L	۸۸/۸۱	۷۹/۷۹	۸۲/۸۴	۷۸/۹۱	۷۷/۸۴
۱,۵-L	۸۴/۱۹	۸۱/۸۶	۸۰/۱۲	۸۰/۳۲	۷۹/۱۹
۲-L	۸۶/۷۴	۸۵/۶۹	۸۳/۸۳	۸۳/۱۲	۸۰/۱۵
۲,۵-L	۸۳/۰۵	۸۲/۹۳	۸۰/۰۳	۷۹/۴۷	۷۵/۵۴
۳-L	۸۵/۷۰	۸۴/۱۰	۸۱/۰۱	۸۱/۴۳	۷۸/۱۱
SEM	۴/۴۹	۴/۵۱	۴/۲۲	۴/۷۱	۴/۱۶

Yolk: زرده تخم‌مرغ، ۰,۵-L، ۱-L، ۱,۵-L، ۲-L، ۲,۵-L و ۳-L به ترتیب، مقدار نیم، یک، یک‌ونیم، دو، دوونیم، و سه درصد نانوذرات لسیتین سویا است.

www.SID.ir

Archive of SID

با ارزش برای اسپرم منجمد باشد. در صورت انجام تلقیح مصنوعی در مزرعه، استفاده از اسپرم سرد شده کاربردی است، زیرا استفاده از اسپرم منجمد نیاز به ابزارهای گران قیمت و تهاجمی برای لقاح لاپاراسکوپی و پرسنل آموزش دیده دارد. با این حال، اگرچه درجه حرارت پایین استفاده شده برای ذخیره‌سازی اسپرم با کاهش متابولیسم سلولی، طول عمر اسپرم را افزایش می‌دهد، با افزایش مدت زمان نگهداری، کیفیت اسپرم، پایین می‌آید. از طرف دیگر، ذخیره طولانی مدت باعث تغییرات شدید ساختارهای مورفولوژیکی و عملکردی می‌شود که پتانسیل باروری را مختل می‌کند (۱۰). ما در این تحقیق اثر نانوذرات لسیتین سویا در رقیق‌کننده اسپرم قوچ در شرایط سرد را بررسی کردیم.

یکی از مهم‌ترین عواملی که در مرحله نخست، نشان از نگهداری موفق اسپرم دارد، جنبایی آن است. در این تحقیق، رقیق‌کننده حاوی ۱/۵٪ نانوذرات لسیتین نسبت به سایر سطوح لسیتین، دارای بیشترین درصد جنبایی کل و پیش‌رونده بود. این نتایج مشابه با گزارش‌های ارائه‌شده در بحث ذخیره‌سازی اسپرم قوچ در شرایط سرد (۱۶) و در شرایط انجماد اسپرم قوچ (۸) است. در این تحقیق استفاده از سطوح پایین‌تر نانوذرات لسیتین سویا (۰/۵٪ و ۱) در مقایسه با سطح ۱/۵٪ آن باعث کاهش جنبایی اسپرم شد. این نتایج به قدرت حفاظتی پایین سطوح کمتر لسیتین مرتبط است. جنبایی اسپرم‌ها در همه تیمارها با افزایش مدت زمان نگهداری، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. آسیب‌های ساختاری و غیر ساختاری غشاء به علت نگهداری در سرما و کاهش فسفریلاسیون پروتئین آکسونیم طی نگهداری در سرما می‌توانند از دلایل کاهش جنبایی اسپرم باشند (۳).

پژوهش‌هایی در کشور با هدف توسعه رقیق‌کننده‌های اسپرم بر پایه لسیتین سویا بر روی گوسفند صورت گرفته است. فروزانفر و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای بر انجماد اسپرم قوچ با جایگزینی زرده تخم‌مرغ با لسیتین سویا گزارش کردند که یک درصد لسیتین سویا می‌تواند جایگزین زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کنندهٔ منی قوچ شود (۱۱). همچنین انجماد اسپرم قوچ با غلظت یک درصد لسیتین سویا، اثرات محافظتی برابری نسبت به رقیق‌کننده تجاری بایوکسل داشته است (۲۸).

در مطالعه حاضر، احتمالا کاهش اندازه ذرات در حد نانومتر و در نتیجه اصطکاک کمتر و گرانروی کمتر در محیط نسبت به رقیق‌کننده مشابه، منجر به جنبایی بهتر اسپرم شده است. از طرفی، با توجه به اینکه سیالیت، جنبایی و یکپارچگی ساختاری برای زنده‌مانی اسپرم، وابسته به غلظت اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه در غشای پلاسمایی اسپرم هستند (۱۲)، لسیتین سویا احتمالا سبب افزایش سیالیت غشاء و انعطاف‌پذیری آن شده و در نتیجه جنبایی سلول‌ها را افزایش داده است. گزارش شده که افزودن لسیتین منجر به افزایش نسبت اسپرم زنده و غیر آپوپتوزیس در اسپرم تازه و پس از فرآیند انجماد-ذوب می‌گردد (۷). با این‌حال، سلمانی و همکاران (۲۰۱۴) با جایگزینی زرده‌ی تخم‌مرغ با لسیتین سویا در رقیق-کننده‌ی اسپرم بز نشان دادند که اختلاف معنی‌داری در درصد جنبایی و جنبایی پیش‌رونده بین زرده و ۱/۵٪ لسیتین نیست (۲۷). پژوهشگران، انواع زیادی از رقیق‌کننده‌ها را برای نگهداری اسپرم استفاده کرده‌اند. اما نتایج متفاوتی را گزارش کرده‌اند. بنابراین، تعریف ترکیب رقیق‌کننده و تعیین غلظت هر یک از اجزای آن، برای هر گونه و حتی نژاد، ضروری به نظر می‌رسد.

یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم (زنده‌مانی)، یک شرط لازم برای حفظ عملکرد اسپرم طی ذخیره‌سازی در مجرای تناسلی ماده و نفوذ از لایه پیش‌زرده تخمک است (۱۴). در تحقیق حاضر، به استثنای تیمار حاوی سه درصد نانوذره لسیتین که کمترین درصد زنده‌مانی را داشت، بین سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در ضمن زنده‌مانی اسپرم با افزایش زمان ذخیره‌سازی کاهش یافت (جدول ۳). یک دلیل برای کاهش زنده‌مانی اسپرم با گذشت زمان می‌تواند تأثیر رادیکال‌های آزاد بر ساختار غشاء باشد (۱۰). بخصوص اسپرم قوچ نسبت به پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشاء نسبت به سایر گونه‌ها حساس‌تر است (۲۰). همچنین ممکن است به علت تنش‌های سرمایی باشد. حساسیت اسپرم به ذخیره طولانی مدت در دماهای پایین با افزایش نسبت اسیدهای چرب اشباع نشده به اشباع در ترکیب فسفولیپیدهای غشای سیتوپلاسم قابل توضیح است، که منجر به از دست دادن کلسترول و کاهش پایداری و مقاومت در برابر تنش می شود (۱۰). لسیتین سویا قادر به محافظت اسپرم در برابر سرما است و باعث افزایش نسبت اسپرم‌های زنده می‌شود (۸).

پس از نگهداری اسپرم‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای سرد، رقیق‌کننده‌ها از نظر درصد اسپرم با غشای فعال تفاوت معنی‌داری با هم نداشته‌اند

جدول ۶- درصد اسپرم‌های با DNA سالم در تیمارهای مختلف

نوع رقیق‌کننده							
Yolk	۰,۵-L	۱-L	۱,۵-L	۲-L	۲,۵-L	۳-L	SEM
۸۸/۰۸ ab	۶۷/۳۴ b	۷۵/۲۵ ab	۹۰/۵۳ ab	۹۲/۵۷ a	۸۲/۳۱ ab	۷۲/۳۶ b	۶/۶۴

Yolk: زرده تخم‌مرغ، ۰,۵-L، ۱-L، ۱,۵-L، ۲-L، ۲,۵-L و ۳-L به ترتیب، مقدار نیم، یک، یک‌ونیم، دو، دوونیم، و سه درصد نانوذرات لسیتین سویا است.

www.SID.ir

Archive of SID

(جدول ۴). یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم به حفظ عملکردی اسپرم در طول ذخیره‌سازی در دستگاه تناسلی ماده کمک می‌کند. اختلال در یکپارچگی غشای پلاسمایی ناشی از آسیب وارده و اختلال در سازمان‌دهی چربی طی ذخیره‌سازی در دمای پایین می‌شود که در نهایت منجر به مرگ اسپرم می‌گردد (۱۴). لسیتین سویا یک ترکیب طبیعی از فسفاتیدیل‌کولین و چندین اسید چرب نظیر استئاریک، اولئیک و پالمیتیک است. چنین اسیدهای چربی در اکثر غشاءهای بیولوژیکی پستانداران وجود دارند و برای پایداری ساختاری سلول‌ها مناسب‌اند (۲۱).

در تحقیق حاضر، تیمارهای حاوی نانوذرات لسیتین سویا نسبت به تیمار حاوی زرده از لحاظ درصد اسپرم هنجار، تفاوتی باهم نداشتند (جدول ۵). در تحقیق سلمانی و همکاران (۲۰۱۴) نیز اختلاف معنی‌داری در درصد زنده‌مانی و یکپارچگی غشا بین زرده و ۱/۵٪ لسیتین مشاهده نشده است (۲۷). گزارش شده است که گاوهای نر با باروری پایین، از نظر ریخت‌شناسی اسپرم، محتوی اسپرم‌های غیرطبیعی بیشتری بوده‌اند. وجود اسپرم با شکل غیرطبیعی سر، می‌تواند نشانه غیرطبیعی بودن کروماتین و عدم شایستگی لقاح در یک نمونه منی باشد (۲۵). همچنین داشتن ریخت نابهنجار اسپرم، مانع رسیدن اسپرم به ناحیه لقاح در دستگاه تولیدمثلی جنس ماده می‌شود (۲۵). با حضور لسیتین سویا در رقیق‌کننده، فسفولیپیدهای با منشأ سویا می‌توانند جایگزین برخی از فسفولیپیدها در غشاء اسپرم شوند که باعث حفظ ساختاری و عملکردی غشای اسپرم می‌شود (۱۸). بر اساس فرضیه دیگر فسفولیپیدهای سویا ممکن است با غشای اسپرم ادغام و به صورت یک‌لایه محافظ در برابر عوامل کشنده عمل کنند (۳۰). سازوکار دقیقی که لسیتین اثراتش را روی غشای پلاسمایی اسپرم اعمال می‌کند، مشخص نیست. اما گزارش شده است که سازوکار محافظتی لسیتین، به خاطر جایگزینی فسفولیپیدهای غشای اسپرم است. همچنین لسیتین ممکن است یک فیلم محافظتی در اطراف اسپرم تشکیل دهد و با این کار، از وارد شدن آسیب مکانیکی به غشای اسپرم جلوگیری کند (۶).

یکپارچگی DNA اسپرم، اهمیت حیاتی در آن دارد و یک نشانه واقعی از کارکرد اسپرم است. وجود DNA طبیعی در اسپرم، به کاهش مرگ‌ومیر اولیه رویانی، کمک می‌کند (۴). گزارش شده است که توان باروری اسپرم گاوها با افزایش صدمه به DNA، کاهش یافته است (۹). در این تحقیق، نرخ شکستگی DNA در تیمارهای نیم و سه درصد نانوذرات لسیتین سویا نسبت به سایر تیمارها، بیشتر بود (جدول ۶). این نشان دهنده حفاظت بهتر از اسپرم در سطوح یک، یک‌ونیم، دو و دوو نیم، نسبت به سطوح نیم و سه درصد نانوذرات لسیتین سویا در رقیق‌کننده است.

افزایش تدریجی و قابل توجهی در نرخ قطعه قطعه شدن DNA، هنگامی که اسپرم قوچ در چهار درجه سانتی‌گراد در رقیق-کننده بر پایه لسیتین سویا ذخیره شده، گزارش شده است (۱۵). ذخیره اسپرم قوچ در شرایط سرد منجر به آسیب DNA شده است که مقدار آسیب در اسپرم قوچ، تحت تأثیر نوع رقیق‌کننده قرار گرفته است به طوریکه در رقیق‌کننده بر پایه شیر پس چرخ نسبت به رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ، کمتر بوده است (۲). همچنین رقیق کردن اسپرم بز بر پایه یک درصد لسیتین سویا نسبت به زرده، یکنواختی DNA و آکروزوم بیشتر، نرخ پراکسیداسیون چربی کمتر و نرخ لقاح بیشتری داشته است (۶). اما به‌هرحال، نتایج تحقیق حاضر، در تناقض با تحقیقات قبلی روی گاو (۱۷) است که گزارش کرده‌اند که طی فرآیند انجماد-یخ‌گشایی، یکنواختی DNA اسپرم تحت تأثیر نوع رقیق‌کننده قرار نگرفته است. ازآنجاکه برهمکنش بین اسپرم و ترکیبات رقیق‌کننده‌ها، کاملاً روشن نشده است، مطالعات بیشتری برای بهبود عملکرد این رقیق‌کننده، با افزودن سایر مواد به آن، مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری

نتیجه کلی که می‌توان از این تحقیق گرفت، این است که رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ ٪ نانوذرات لسیتین سویا، می‌تواند جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ در حفظ کیفیت اسپرم قوچ نژاد لری بختیاری طی نگهداری در شرایط سرد باشد.

منابع مورد استفاده

1. Aires, V. A., K.-D. Hinsch, F. Mueller-Schloesser, K. Bogner, S. Mueller-Schloesser and E. Hinsch. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60: 269-279.

2.Allai, L., X. Druart, M. Öztürk, A. BenMoula, B. Nasser and B. El Amiri. 2016. Protective effects of Opuntia ficus-indica extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. *Animal reproduction science* 175: 1-9.

3.Baumber, J., B. A. Ball, C. G. Gravance, V. Medina and M. C. Davies-Morel. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of andrology* 21: 895-902.

4.Bilodeau, J. F., S. Chatterjee, M. A. Sirard and C. Gagnon. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular reproduction and development* 55: 282-288.

5.Bucak, M. N., S. Sarıözkan, P. B. Tuncer, P. A. Ulutaş and H. İ. Akçadağ. 2009. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small ruminant research* 81: 90-95.

6.Chelucci, S., V. Pasciu, S. Succu, D. Addis, G. G. Leoni, M. E. Manca, S. Naitana and F. Berlinguer. 2015. Soybean lecithin–based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology* 83: 1064-1074.

7.Del Valle, I., A. Gomez-Duran, W. Holt, T. Muino-Blanco and J. Cebrian-Perez. 2012. Soy Lecithin Interferes With Mitochondrial Function in Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. *Journal of andrology* 33: 717.

www.SID.ir

Archive of SID

8.Emamverdi, M., M. Zhandi, A. Zare Shahneh, M. Sharafi and A. Akbari-Sharif. 2013. Optimization of Ram semen cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin-based extender. *Reproduction in Domestic Animals* 48: 899-904.

9.Evenson, D. and L. Jost. 2000. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in Cell Science* 22: 169-189.

10.Falchi, L., G. Galleri, M. Zedda, S. Pau, L. Bogliolo, F. Ariu and S. Ledda. 2018. Liquid storage of ram semen for 96 hours: effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livestock science* 207:1-6.

11.Forouzanfar, M., M. Sharafi, S. Hosseini, S. Ostadhosseini, M. Hajian, L. Hosseini, P. Abedi, N. Nili, H. Rahmani and M. Nasr-Esfahani. 2010. In vitro comparison of egg yolk–based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 73: 480-487.

12.Hammerstedt, R. H., J. K. Graham and J. P. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of andrology* 11: 73-88.

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

14.Kasimanickam, R., V. Kasimanickam, A. Tibary and K. Pelzer. 2011. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 C. *Small ruminant research* 99: 208-213.

15.Manteghi, M., M. Mamouei, V. S. Tabatabaei, J. Fayazi and K. Mirzadeh. 2016. Evaluation the effect of soybean lecithin in tris extender on spermatozoa quality and viability of ram. *Journal Of Animal Production* 18: 367-375.

16.Martin, G., O. Sabido, P. Durand and R. Levy. 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biology of Reproduction* 71: 28-37.

17.Moussa, M., V. Martinet, A. Trimeche, D. Tainturier and M. Anton. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695-1706.

18.Mozafari, M., A. Pardakhty, S. Azarmi, J. Jazayeri, A. Nokhodchi and A. Omri. 2009. Role of nanocarrier systems in cancer nanotherapy. *Journal of liposome research* 19: 310-321.

19.Muiño-Blanco, T., R. Pérez-Pé and J. Cebrián-Pérez. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in domestic animals* 43: 18-31.

20.Oke, M., J. K. Jacob and G. Paliyath. 2010. Effect of soy lecithin in enhancing fruit juice/sauce quality. *Food research international* 43: 232-240.

21.Overton, M. 2005. Cost comparison of natural service sires and artificial insemination for dairy cattle reproductive management. *Theriogenology* 64: 589-602.

22.Saacke, R. 2008. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* 70: 473-478.

23.Salmani, H., A. Towhidi, M. Zhandi, M. Bahreini and M. Sharafi. 2014. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology* 68: 276-280.

24.Sharafi, M., S. Eghbalsaied, N. Nili and M. Nasr-Esfahani. 2009. Ram semen in vitro fertility after cryopreservation using soybean lecithin and egg yolk based extenders. *Reproduction In Domestic Animals* 44: 90-90.

25.Zhang, S., J. Hu, Q. Li, Z. Jiang and X. Zhang. 2009. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology* 8: 6476-6480.

www.SID.ir