نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۶، پاییز ۱۳۹۶
ص‌ص: ۲۹~۴۰

مقایسه غلظت‌های مختلف زرده تخم مرغ و لستین سویا بر عملکرد اسپرم بز مرخز

- **حمیدرضا نائیجیان** (نویسنده مسئول)
باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران.
- **حسن صادقی پناه**
استادیار موسسه تحقیقات علوم دامی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
- **رضا مسعودی**
باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

تاریخ دریافت : فروردین ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش : آذر ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۱۳۲۰۰۰۲۱
Email: hamid.naijian@gmail.com

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف زرده تخم مرغ (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) و لستین سویا (۱، ۱/۵ و ۲درصد) بر فراسنجه‌های اسپرم بز مرخز پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی انجام شد. نمونه‌های منی توسط واژن مصنوعی از ٤ رأس بز نر بالغ، هفته ای ۲ بار جمع آوری شد. نمونه‌های منی رقیق شده در معرض بخار ازت منجمد و در تانک حاوی ازت مایع ذخیره شد و سپس یخ گشایی پایوت‌های حاوی اسپرم در آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. تحرک کل و تحرک پیشرونده اسپرم با کمک سامانه آنالیز رایانه‌ای اسپرم اندازه‌گیری شد. سلامت غشا، درصد اسپرم‌های زنده، مورفولوژی اسپرم‌ها و غلظت مالون‌دی‌آلدهید بعد از فرآیند یخ‌گشایی اندازه گیری شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که رقیق‌کننده حاوی ۱۵ درصد زرده و ۱/۵ درصد لستین موجب بهبود در میزان تحرک، تحرک پیشرونده و اسپرم‌های زنده نسبت به سایر سطوح‌ها شد (P<۰/۰۵). سطوح مختلف زرده تخم مرغ و لستین اثر معنی‌داری روی سلامت غشاء، مورفولوژی، مالون‌دی‌آلدهید و حالت اکروزومی اسپرم‌ها نداشتند. مطابق با نتایج این پژوهش به نظر می‌رسد که استفاده از ۱۵ درصد زرده در رقیق کننده‌های بر پایه حیوانی و ۱/۵ درصد لستین در رقیق کننده‌های بر پایه گیاهی بز مرخز باعث بهبود معنی‌دار فراسنجه های اسپرم از جمله تحرک و درصد اسپرم‌های زنده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسپرم ، انجماد ، لستین، زرده تخم مرغ

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 116 pp: 29-40

Comparison different concentration of egg yolk and soybean lecithin on the function of Marghoz goat spermatozoa

ByH.R. Naijian*[1], H. SadeghiPanah[2], R. Masoudi[1]
1: Young Researchers Club and Elites, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2: Animal Science Research Institute of Iran (AREEO).

Received: April 2016 **Accepted: December 2016**

This study was designed to investigate the effects of various concentrations of egg yolk (5, 10, 15 and 20%) and Lecithin (1, 1.5 and 2%) in the extenders based on tris (with 5% glycerol) on the Marghoz goat spermatozoa after freezing-thawing. Semen samples were collected by an artificial vagina, twice a week from four matured goat. The extender containing semen was frozen in liquid nitrogen and then was stored until using for assessment. Semen was thawed at 37°C and then motility and progressive motility were assessed by CASA. Membrane integrity and viability, morphology were assessed as well and Malondialdehiyde (MDA) were assessed as well. The results of this experiment showed that extender containing 15% egg yolk and 1.5% Lecithin significantly improved motility, progressive motility and viability compare to other levels (P<0.05). Membrane integrity, morphology, malondialdehiyde and acrosome status were not affected significantly by the different level of egg yolk and Lecithin. It can be concluded that use of 15% egg yolk in animal extender and 1.5% Lecithin in vegetable extender is suitable for cryopreservation of Marghoz goat semen.

Key words: Sperm, Freezing, Lecithin, Egg yolk

مقدمه

با استفاده از انجماد اسپرم‌ها و تکنیک‌های تولیدمثلی، می‌توان بسیاری از مشکلات باروری حیوانات آزمایشگاهی، دامی و انسانی را حل نمود (Leboeuf و همکاران، ۲۰۰۰). به‌طور کلی، کیفیت اسپرم یخ‌گشایی شده از روی فاکتورهای مهمی مانند تحرک (Purdi، ۲۰۰۶)، درصد اسپرم‌های زنده و سلامت آکروزوم آن‌ها ارزیابی می‌شود (Leboeuf و همکاران، ۲۰۰۰). حفظ انجماد منی و تلقیح مصنوعی فواید زیادی را برای صنعت پرورش حیوانات اهلی، به ویژه برای بهبود تولید مثلی و ژنتیکی انجام می‌دهد. اما بزرگترین مانع در حفظ انجماد منی، آسیبی است که به ساختمان اسپرم در طول فرآیند انجماد- ذوب وارد می‌شود که منجر به باروری ضعیف اسپرم منجمد می‌گردد. در طول سال‌های اخیر، ابداع و توسعه‌ی انواع رقیق کننده‌های منی جهت انجماد اسپرم و در نتیجه افزایش بازده و موفقیت تلقیح مصنوعی گسترش زیادی پیدا کرده است. لذا محققین مطالعات گسترده‌ای برای تولید رقیق کننده‌هایی که بتواند باعث حفظ انجمادی اسپرم شوند، انجام دادند. از مهمترین مزایای منجمد کردن منی بز، می‌توان به بارور نمودن همزمان تعداد زیادی بز ماده با استفاده از اسپرم بزهایی با نژاد برتر و چندقلوزا، انتقال آسان منی از مراکز تولید و جمع آوری به دورترین دامداری‌ها، انجام زایش خارج از فصل تولید مثلی، جلوگیری از انقراض گونه‌های در معرض خطر اشاره

نمود (Salamon and Maxwell، ۲۰۰۰). ترکیبات موجود در رقیق کننده‌ها باید بتوانند اسپرم را نسبت به شرایط متغیر بوجود آمده حفاظت نموده و دچار صدمات کمتری کنند (Holt، ۲۰۰۰). غشاهای سلولی در برابر آسیب ناشی از انجماد حساسیت بالایی دارند، به طوریکه طی فرآیند سرد شدن تنشی بر غشا اعمال شده که اثرات زیان‌آوری را به دنبال خواهد داشت. در نتیجه‌ی این تغییر، سلول ممکن است آسیب دیده که منجر به مرگ آن می‌شود (Parks and Graham،۱۹۹۲). این تغییرات ممکن است باعث مرگ اسپرم گردد بنابراین حفظ سلامت غشا برای تولید اسپرم با کیفیت، بعد از انجماد بسیار اهمیت دارد (Purdi، ۲۰۰۶). رقیق‌کننده‌های منی دارای خواص ویژه‌ای هستند که موجب نگهداری طولانی تر اسپرم‌ها می‌شوند. این مواد در تأمین انرژی مورد نیاز، حفاظت اسپرم از آسیب‌های دمایی، کاهش استرس‌های فیزیکی و شیمیایی ناشی از سرد کردن، انجماد- یخ گشایی اسپرم‌ها و در نهایت ایجاد یک محیط مناسب برای زنده ماندن موقت اسپرم‌ها نقش دارند (curry،۲۰۰۰). گلیسرول، دی متیل سولفوکساید و اتیلن گلیکول دارای وزن مولکولی کم بوده و عوامل محافظ انجمادی درون سلولی یا نفوذکننده هستند و منابع لیپوپروتئینی یا مواد با وزن مولکولی بالا مثل زرده تخم مرغ، شیر یا لسیتین سویا برای جلوگیری از شوک سرمایی و گلوکز یا فروکتوز به عنوان منابع انرژی و سایر افزودنی‌ها مانند آنزیم‌ها و آنتی بیوتیک‌ها به رقیق کننده اضافه می‌شود (Evans and Maxwell، ۱۹۸۷).

بنابراین، هدف پژوهش حاضر، بررسی استفاده از سطوح مختلف لسیتین سویا (۱، ۱/۵ و ۲ درصد) و زرده تخم مرغ (۵، ۱۰، ۱۵ و۲۰ درصد) و انتخاب بهترین سطوح آن‌ها برای استفاده در رقیق-کننده منی بز مرخز، ارزیابی اثر آن بر خصوصیات جنبایی، زنده مانی، مورفولوژی و یکپارچگی غشای اسپرم بز مرخز در طی فرآیند انجماد- یخ‌گشایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از منی ۴ رأس بز نر بالغ نژاد مرخز، با سن ۴-۳ سال و متوسط وزن۵۰ - ۶۵ کیلوگرم در مؤسسه علوم دامی کشور (واقع در حصارک کرج) استفاده شد. جمع‌آوری منی بزهای آموزش‌دیده به صورت هفته‌ای ۲ بار و در فصل تولید مثلی (اواخر شهریور تا اواسط دی ماه) صورت گرفت (Amoah and Gelayes، ۱۹۹۷). بلافاصله پس از اسپرم‌گیری، نمونه منی در آب ۳۷ °C قرار داده شده و برای ارزیابی کیفیت اسپرم به آزمایشگاه انتقال داده شد. فقط از نمونه‌هایی برای انجماد استفاده شد که دارای منی با غلظت بیشتر از $۲/۵ \times ۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر، حداقل جنبایی ۷۵٪ و مورفولوژی طبیعی بیش از ۸۵٪ بودند. از نمونه‌های منی هر دام به یک مقدار مساوی در یک لوله آزمایش مجزا ریخته و با توجه به احتمال اثرات متقابل بین نمونه‌ها، نمونه-های منی با هم مخلوط شده است.

رقیق کننده پایه

برای ساخت رقیق‌کننده از یک محیط بر پایه تریس استفاده گردید. محیط پایه مورد استفاده شامل تریس (۳۰/۷گرم/لیتر)، سیتریک اسید (۱۶/۴گرم/لیتر)، فروکتوز (۱۲/۶گرم/لیتر)، گلیسرول ۵ درصد (حجمی) و جنتامایسین (۰/۶گرم/لیتر) بود. اسمولاریتی محیط پایه ۴۲۵ میلی اسمولار و pH آن ۷ تنظیم شد (Bucak و همکاران، ۲۰۰۹). تمامی مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک تهیه شده است.

سطوح آزمایشی رقیق‌کننده‌های این آزمایش شامل سطوح مختلف زرده تخم مرغ که عبارتند از سطح ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد و همچنین سطوح مختلف لستین که عبارتند از: سطح ۱، ۱/۵ و ۲ درصد می‌باشد.

روش تهیه رقیق کننده‌های حاوی زرده تخم مرغ

در این قسمت آزمایش ۴ رقیق‌کننده حاوی ۴ سطح (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) زرده تخم مرغ تهیه شد. تخم‌مرغ‌های استفاده شده در این تحقیق تخم‌مرغ‌های تازه روز بوده اند تا جداشدن زرده از سفیده براحتی امکان‌پذیر باشد. جهت تهیه رقیق‌کننده حاوی زرده تخم مرغ، براساس روش Evans and Maxwell (۱۹۸۷)، پوستهٔ آنها کاملاً با آب گرم شسته شده و بوسیلهٔ دستمال کاغذی آغشته به الکل پاک، ضدعفونی و خشک شدند. سپس برای جدا سازی زرده از سفیده، پس از شکافتن قسمت کوچکی از پوسته

تخم مرغ، محتوی آن روی کاغذ صافی قرار داده، سپس با غلتانیدن آرام زرده روی کاغذ صافی، تمام سفیده از زرده تخم مرغ جدا گردیده و بعد لایه پوششی نازک دور زرده را با استفاده از شی نوک تیز، سوراخ و زرده خالص درون بشر ریخته شده، پس از آن، به وسیله همزن، زرده خوب به هم زده شد، تا مخلوط یکنواختی بدست آید. سپس در سطوح مذکور به رقیق کنندهٔ پایه اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه بوسیلهٔ هات پلت بهم زده شدند. سپس رقیق کننده‌های تهیه شده از کاغذ صافی ۰/۴۵ میلی متری عبور داده شدند تا رسوبات جدا شوند. پس از آماده شدن محلول-ها، pH آن‌ها بوسیلهٔ pH متر دیجیتالی اندازه گیری شد. براساس روش Evans and Maxwell (۱۹۸۷)، رقیق‌کننده‌ها در این پژوهش با pH مساوی ۷ تنظیم شدند.

مراحل آماده سازی محیط های انجماد حاوی لستین سویا

برای ساخت محیط‌های انجماد گیاهی حاوی لسیتین سویا و گلیسرول از روز قبل محیط بر پایه بافر تریس تهیه و در یخچال در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. غلظت‌های مورد استفاده از لسیتین (۱، ۱/۵ و ۲ درصد) در این آزمایش به صورت درصد وزنی- حجمی بودند. به عنوان مثال مقدار ۱ درصد از لسیتین استفاده شده در ۱۰۰ میلی لیتر محیط انجماد، ۱ گرم می-باشد که با استفاده از ترازوی با دقت بالا مقدار مورد نیاز را وزن کرده و در محیط بر پایه بافر تریس حل می‌شود. برای وزن کردن لسیتین باید به این نکته توجه داشت که که لسیتین جاذب رطوبت است و باید پس از خارج کردن آن از یخچال با سرعت بالایی آن را وزن نمود تا خطایی در وزن کشی و دیگر مراحل کار ایجاد نشود. حل شدن لسیتین در بافر تریس نیاز به زمان دارد. بدین ترتیب با کمک مخلوط کن و به آرامی در طی مدت زمانی ۴۵-۳۰ دقیقه مقدار مورد نیاز لسیتین در بافر تریس حل شد.

انجماد

برای انجماد ابتدا نمونه‌های آزمایشی در پایوت های ۰/۵ میلی-لیتری بسته‌بندی شده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی-گراد قرار گرفتند و پس از طی دوره تعادل، پایوت‌ها در فاصله ۴ سانتی‌متری به مدت ۱۵ دقیقه در معرض بخار ازت مایع منجمد و سپس در ازت مایع غوطه ور شده و برای نگه‌داری به تانک ازت منتقل شدند (Bucak و همکاران، ۲۰۰۷).

ذوب منی

پس از ۳۰ روز نگهداری پایوت‌ها در تانک ازت، برای یخ‌گشایی پایوت‌ها آنها را از تانک خارج کرده و به مدت ۳۰ ثانیه در داخل آب گرم ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و سپس پایوت‌ها به داخل لوله‌های اپندورف تخلیه شدند (Ijaz و همکاران، ۲۰۰۹).

ارزیابی اسپرم ها پس از ذوب شدن

تحرک

اولین فراسنجه مورد ارزیابی در این تحقیق بررسی تحرک اسپرم پس از ذوب شدن بود. به این منظور ۳ پایوت از هر گروه تیماری ذوب شده و به داخل لوله‌های اپیندورف انتقال داده شدند. پس از آن با سمپلر مدرج و با برداشتن ۱۰ میکرولیتر از منی مورد آزمایش و ریختن روی لام و گذاشتن یک لامل تمیز برروی آن، نمونه مورد نظر با استفاده از میکروسکوپ CASA بررسی می-شود. پس از بررسی نمونه‌های اسپرم بوسیله نرم افزار CASA، میزان تحرک اسپرم‌ها ثبت گردید. در این آزمایش فراسنجه های ارزیابی تحرک مانند درصد کل اسپرم‌های متحرک و درصد اسپرم‌های پیشرونده محاسبه گردید (Bucak و همکاران، ۲۰۱۰).

سلامت غشاء

در این مطالعه برای بررسی سلامت غشای اسپرم‌ها از محلول هیپواسموتیک استفاده شد. محیط هیپواسموتیک بر اساس اسمولاریتی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. در این آزمایش از محیط با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی اسمولار استفاده گردید. فشار اسمزی طبیعی برای اسپرم‌های بز ۴۲۵ میلی اسمولار در لیتر می‌باشد. بنابراین اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به سرعت واکنش نشان می‌دهد. واکنش اسپرم‌ها به محیط هیپواسمول بصورت تورم دم می‌باشد. در این حالت اسپرم‌هایی که غشاء پلاسمایی سالمی دارند به محلول واکنش داده ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. در واقع پس از انجام این تست اسپرم‌های با دم گره خورده به عنوان

اسپرم‌های زنده و اسپرم‌هایی که دم آن‌ها صاف است به عنوان اسپرم مرده تلقی می‌شوند. در تحقیق حاضر آزمایش تورم هیپواسمتیک مطابق با روش Revell and Mrode (۱۹۹۴)، انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از اسپرم ذوب شده با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک که حاوی فروکتوز (۹گرم/لیتر) و سیترات سدیم (۴/۹گرم/لیتر) بود مخلوط گردید سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل ۳ قطره (۱۰µl) از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. بررسی میکروسکوپی با استفاده از یک صفحه داغ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ صورت گرفت. در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های دارای غشای یک‌پارچه محاسبه شد (Purdi، ۲۰۰۶).

رنگ آمیزی حیاتی

برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین- نیگروزین استفاده گردید. مواد تشکیل‌دهنده این محیط شامل رنگ ائوزین (۱۶/۷گرم/لیتر)، رنگ نیگروزین (۱۰۰ گرم/لیتر) و سیترات سدیم (۲۹گرم/لیتر) می‌باشد. اساس این رنگ آمیزی بدین صورت است که رنگ ائوزین به داخل اسپرم-های مرده نفوذ می‌کند در حالیکه اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی ۲۰µl از نمونه‌ی اسپرم را برداشته و بر روی لام قرار گرفت. ۲۰µl از رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین برداشته و روی نمونه ریخته و با سر سمپلر به آرامی نمونه را هم زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ۳۰ ثانیه ۲۰µl از نمونه را برداشته و بر گوشه‌ی لام دیگری گذاشته و با یک لام دیگر بر روی لام به آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن لام را زیر میکروسکوپ با بزرگ نمایی ۴۰۰ قرار داده و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد (Evans and Maxwell، ۱۹۸۷).

مورفولوژی

برای ارزیابی اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱ سی‌سی محلول هانکوک که شامل فرمالین ۳۷ درصد (۶۲/۵ میلی‌لیتر)، محلول سالین (۱۵۰ میلی‌لیتر)، محلول بافر (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دو بار تقطیر (۵۰۰ میلی‌لیتر) می‌باشد، افزوده شده و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شده و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوا زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگ-نمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه شده است. میانگین سه مشاهده به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شده است (Schafer and Holzmann، ۲۰۰۰).

اندازه‌گیری سطح مالون‌دی‌آلدئید

برای اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید که نشان دهنده لیپید-پراکسیداسیون در نمونه‌های منی است از تست تیوباربوتیریک اسید طبق روش یوشیکا و همکاران استفاده می‌شود (Esterbauer و همکاران، ۱۹۹۰).

حالت آکروزومی

ارزیابی حالت آکروزومی بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی از این جهت بسیار مهم است که آسیب‌های ناشی از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی ممکن است واکنش آکروزم را در بعضی از اسپرم‌ها تحریک کرده باشد و یا ناحیه آکروزم آن‌ها آسیب دیده باشد که در این صورت قادر به اتصال به تخمک نیستند و در نتیجه علیرغم داشتن تحرک نابارور می‌باشند. برای ارزیابی حالت آکروزمی در اسپرم روش‌های متفاوتی وجود دارند که اساس اکثر آن‌ها رنگ آمیزی با رنگ‌های فلورسنت می‌باشد. در تحقیق حاضر از روش اندازه گیری کلروتتراسایکلین فلورسنت استفاده شد که به روش CTC معروف است. انجام این تست مطابق با روش پرز و همکاران صورت گرفت (Perez و همکاران، ۱۹۹۶).

تحلیل آماری

این آزمایش ۵ مرتبه تکرار شد. داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی و بر اساس مدل‌های آماری زیر به کمک رویه Proc GLM نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین‌ها به روش دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند.

$$y_{ijk} = \mu + b_j + e_{ij} \qquad y_{ijk} = \mu + a_i + e_{ij}$$

Y: خصوصیات کمی و کیفی اسپرم µ: میانگین جامعه a_i: اثر سطوح مختلف زرده b_j: اثر سطوح مختلف لستین e_{ij}: اثر باقیمانده

نتایج

ویژگی‌های اسپرم بز مرخز در جدول یک و دو نشان داده شده است، رقیق‌کننده حاوی ۱۵ درصد زرده و ۱/۵ درصد لستین باعث تغییر صفات تحرک، تحرک پیشرونده و درصد اسپرم‌های زنده پس از انجماد و یخ‌گشایی می‌شود. در بین غلظت‌های مختلف زرده و لستین، سطح ۱۵ درصد زرده و ۱/۵ درصد لستین باعث افزایش معنی‌دار در میزان تحرک، درصد اسپرم‌های پیشرونده و اسپرم‌های زنده در مقایسه با سایر سطوح‌ها شده است (P<۰/۰۵).

نتایج حاصل از آنالیز کامپیوتری (CASA) مرتبط با تحرک در جدول دو و چهار نشان داده شده است. در بین ویژگی‌های CASA اختلاف معنی‌داری در بین سطوح مختلف لستین و زرده تخم مرغ مشاهده نشد.همچنین نتایج حاصل از آنالیز داده‌های آزمایش یکپارچگی غشا و مورفولوژی نشان می‌دهد که هیچ اختلاف معنی‌داری در بین هیچ یک از سطوح زرده تخم مرغ و لستین مشاهده نشده است.

جدول ۱- اثر سطوح مختلف زرده تخم مرغ(درصد) بر ویژگی‌های کیفی منی بز مرخز پس از انجماد- یخ‌گشایی

صفات کیفی اسپرم(٪)	سطح ۵ ٪ زرده تخم مرغ	سطح ۱۰ ٪ زرده تخم مرغ	سطح ۱۵ ٪ زرده تخم مرغ	سطح ۲۰ ٪ زرده تخم مرغ
تحرک	۴۲/۶ ± ۰/۷۸ b	۴۴/۴ ± ۰/۸۲ b	۵۲/۴ ± ۱/۰۲ a	۳۸/۴ ± ۰/۷۵ c
پیشرونده	۳۳/۱ ± ۰/۷۸ b	۳۴/۴ ± ۰/۷۶ b	۳۷/۹ ± ۰/۸۴ a	۲۹/۱ ± ۰/۷۶ c
اسپرم زنده	۴۷/۲ ± ۰/۸۵ b	۴۸/۱± ۰/۹۲ b	۵۹/۱ ± ۱/۲۳ a	۴۶/۲ ± ۰/۸۱ b
یکپارچگی غشا	۳۸/۴ ± ۰/۷۲	۳۸/۶ ± ۰/۸۲	۳۹/۸ ± ۰/۹۶	۳۸/۱ ± ۰/۸۱
مورفولوژی	۸/۶± ۰/۶۰	۸/۴ ± ۰/۵۸	۸/۱ ± ۰/۳۲	۸/۶ ± ۰/۴۶

حروف بالانویس غیر مشابه نشان دهنده تفاوت میانگین سطوح (با سطح احتمال ۵ درصد) در هر ردیف می‌باشد. اعداد بصورت میانگین±میانگین انحراف معیار نمایش داده شده اند

جدول ۲- اثر سطوح مختلف زرده تخم مرغ (درصد) بر صفات وابسته به تحرک منی بز مرخز پس از انجماد- یخ‌گشایی

صفات کمی وابسته به تحرک اسپرم	سطح ۵ ٪ زرده تخم مرغ	سطح ۱۰ ٪ زرده تخم مرغ	سطح ۱۵ ٪ زرده تخم مرغ	سطح ۲۰ ٪ زرده تخم مرغ	سطح معنی داری	SEM
میانگین سرعت در مسیر (µm/s)	۹۲/۴	۹۴/۳	۹۶/۶	۹۴/۷	۰/۴۲	۳/۰۲
سرعت در مسیر مستقیم (µm/s)	۷۵/۸	۷۶/۹	۷۹/۸	۷۸/۱	۰/۶۵	۳/۳۲
خطی بودن جنبایی (٪)	۴۲/۴	۴۲/۹	۴۴/۷	۴۳/۴	۰/۳۸	۰/۳۱
جنبایی عرضی سر (٪)	۷/۹	۸/۲	۷/۷	۸/۱	۰/۴۴	۱/۶۲

جدول ۳- اثر سطوح مختلف لستین (درصد) بر ویژگی‌های کیفی منی بز مرخز پس از انجماد- یخ‌گشایی

صفات کیفی اسپرم(٪)	سطح ۱ ٪ لستین	سطح ۱/۵ ٪ لستین	سطح ۲ ٪ لستین
تحرک	۴۸/۴ ± ۱/۳۴ [b]	۵۶/۴ ± ۱/۰۶ [a]	۳۵/۲ ± ۰/۹۹ [c]
پیشرونده	۳۴/۶ ± ۰/۸۸ [b]	۳۹/۴ ± ۰/۸۶ [a]	۲۰/۸ ± ۰/۸۴ [c]
اسپرم زنده	۵۴/۲ ± ۰/۶۵ [b]	۶۲/۴± ۰/۳۳ [a]	۴۳/۹ ± ۱/۰۳ [c]
یکپارچگی غشا	۳۸/۶ ± ۰/۷۲	۳۸/۴ ± ۰/۸۲	۳۷/۸ ± ۰/۹۶
مورفولوژی	۸/۲± ۰/۶۴	۸/۲ ± ۰/۹۸	۸/۴ ± ۰/۷۸

حروف بالانویس غیر مشابه نشان دهنده تفاوت میانگین سطوح (با سطح احتمال ۵ درصد) در هر ردیف می‌باشد. اعداد بصورت میانگین±میانگین انحراف معیار نمایش داده شده اند

جدول ٤- اثر سطوح مختلف لستین (درصد) بر صفات وابسته به تحرک منی بز مرخز پس از انجماد- یخ¬گشایی

صفات کمی وابسته به تحرک اسپرم	سطح ۱ ٪ لستین	سطح ۱/۵ ٪ لستین	سطح ۲ ٪ لستین	سطح معنی داری	SEM
میانگین سرعت در مسیر (µm/s)	۹۴/۸	۹۷/۶	۹۳/۹	۰/۵۲	۳/۳۲
سرعت در مسیر مستقیم(µm/s)	۷۹/۳	۸۱/۷	۷۸/۶	۰/۴۸	۲/۶۵
خطی بودن جنبایی(٪)	۳۹/۲	۴۲/۴	۳۸/۶	۰/۷۲	۰/۴۰
جنبایی عرضی سر (٪)	۷/۵	۷/۱	۷/۴	۰/۶۱	۲/۷۵

نتایج حاصل از لیپید پراکسیداسیون تیمارهای آزمایشی در جدول پنج و شش نمایش داده شده است. همانطور که نشان داده شده است. سطوح مختلف زرده تخم مرغ و لستین تأثیر معنی‌داری در کاهش میزان لیپید پراکسیداسیون نداشته است. همچنین نتایج میانگین الگوهای آکروزومی اسپرم پس از انجماد- یخ‌گشایی با استفاده از رنگ‌آمیزی کلروتتراسایکلین در جدول هفت و هشت نشان داده شده است. مقایسه الگوهای F، B و AR در بین تیمارهای آزمایشی نشان داد که سطوح مختلف لستین و زرده تخم مرغ در محیط انجماد اسپرم تاثیری بر روی حالت آکروزومی اسپرم‌ها نداشته است و اختلاف بین هیچ کدام از سطوح‌ها از نظر آماری معنی دار نبوده است.

جدول ۵- اثر زرده تخم مرغ (درصد) بر میزان لیپیدپراکسیداسیون منی منجمد بز مرخز پس از یخ‌گشایی

صفت(نانومول/ میلی‌لیتر)	سطح ۵ ٪ زرده تخم مرغ	سطح ۱۰ ٪ زرده تخم مرغ	سطح ۱۵ ٪ زرده تخم مرغ	سطح ۲۰ ٪ زرده تخم مرغ	سطح معنی‌داری	SEM
مالون‌دی-آلدهاید	۱/۷۲	۱/۶۶	۱/۴۲	۱/۶۵	۰/۳۴	۰/۰۷

جدول ٦- اثر لستین (درصد) بر میزان لیپیدپراکسیداسیون منی منجمد بز مرخز پس از یخ‌گشایی

صفت(نانومول/ میلی‌لیتر)	سطح ۱ ٪ لستین	سطح ۱/۵ ٪ لستین	سطح ۲ ٪ لستین	سطح معنی‌داری	SEM
مالون‌دی‌آلدهاید	۱/۴۱	۱/۳۱	۱/۴۴	۰/۲۱	۰/۰۹

جدول ۷- اثر سطوح مختلف زرده تخم مرغ (درصد) بر حالت آکروزومی منی منجمد بز مرخز پس از یخ‌گشایی

تیمار	الگوهای آکروزومی		
	F	**B**	**AR**
۵	۱۲/۳۲	۶۴/۲۸	۲۳/۴
۱۰	۱۲/۷۸	۶۶/۶۸	۲۰/۵۴
۱۵	۱۴/۳۴	۶۳/۲۲	۲۲/۴۴
۲۰	۱۱/۵۱	۶۵/۴۳	۲۳/۰۶

در جدول بالا الگوی F نشان دهنده اسپرم سالم، الگوی B نشان دهنده اسپرم ظرفیت‌پذیر شده و الگوی AR نشان دهنده اسپرمی که آکروزوم آن آسیب دیده هست می‌باشد.

جدول ۸- اثر سطوح مختلف لستین (درصد) بر حالت آکروزومی اسپرم منجمد بز مرخز پس از یخ‌گشایی

تیمار	الگوهای آکروزومی		
	F	**B**	**AR**
۱	۱۱/۲۸	۶۸/۳۱	۲۰/۴۱
۱/۵	۱۳/۳۳	۶۵/۷۲	۲۰/۹۵
۲	۱۲/۹۲	۶۷/۵۴	۱۹/۵۴

در جدول بالا الگوی F نشان دهنده اسپرم سالم، الگوی B نشان دهنده اسپرم ظرفیت‌پذیر شده و الگوی AR نشان دهنده اسپرمی که آکروزوم آن آسیب دیده هست می‌باشد.

بحث

یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم یک شرط لازم برای حفظ عملکردهای اسپرماتوزوا در طول ذخیره سازی در مجرای تناسلی ماده و نفوذ از لایه پری ویتیلین تخمک است. آسیب دیدن غشای پلاسمایی اسپرم ناشی از از بین رفتن آرایش لیپید ها در غشای اسپرم بوده که منجر به مرگ سلول اسپرم میشود (Purdi، ۲۰۰۶). پیشنهاد شده است که لستین (فسفاتیدیل کولین) موجود در سویا و زرده تخم مرغ، فسفولیپیدهای غشای اسپرم را با قرارگیری روی سطح غشاها محافظت کرده و تحمل و مقاومت اسپرم به آسیب-های فرآیند انجماد- یخ گشایی را افزایش می‌دهد (Bucak و همکاران، ۲۰۰۹). حدود ۶۰ درصد زرده تخم مرغ را لیپوپروتئین-های با چگالی کم تشکیل می‌دهند که ۱۰ تا ۱۵ درصد از این مقدار را منابع فسفولیپیدی از جمله فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل سرین تشکیل می‌دهد. به نظر می‌رسد که بخش تاثیر گذار لیپوپروتئین‌های با چگالی کم منابع فسفولیپیدی هستند که با تشکیل لایه محافظتی در اطراف غشای اسپرم باعث محافظت اسپرم در برابر آسیب‌های سرمایی می‌شوند. Quinn و همکاران (۱۹۸۰)، پیشنهاد دادند که فسفولیپیدها می‌توانند یک لایه محافظتی را در سطح غشای اسپرم بعد از ژلاتینه شدن لیپوپروتئین-ها به وجود بیاورند. همچنین Graham و همکاران (۱۹۸۷) و Trimeche و همکاران (۱۹۹۷)، گزارش دادند که فسفولیپیدهای موجود در لیپوپروتئین‌های با چگالی کم می‌توانند مقداری از فسفولیپیدهای غشای اسپرم که در حین آسیب سرمایی از بین می‌روند، جایگزین کنند. Graham and Foote (۱۹۸۷)، نیز مشاهده نمودند که فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل سرین مؤثرترین بخش فسفولیپیدی برای حفاظت از اسپرماتوزوا هستند. نتایج این مطالعه تقریبا مشابه با نتایج گزارش‌های قبلی در انجماد منی گوسفند (Forouzanfar و همکاران، ۲۰۱۰)، گاو (Amirat و همکاران، ۲۰۰۴)، سگ (Beccaglia و همکاران، ۲۰۰۹) و گربه (Vick و همکاران، ۲۰۱۲) بود. برخی از پژوهشگران نیز گزارش دادند که اثر محافظتی لستین سویا برای انجماد اسپرم مشابه یا کمی پایین تر از زرده تخم مرغ بود (Watson، ۱۹۷۶). با این حال محققان متعددی گزارش داده‌اند که غلظت بالای لستین سبب افزایش ویسکوزیته، سمیت و ذرات باقیمانده در رقیق کننده و در نتیجه باعث کاهش کیفیت اسپرم و کاهش باروری می‌گردد. افزایش فشار اسمزی محیط انجماد حاوی ۲ درصد لستین سویا فرضیه‌ای است که می‌تواند دلیل مناسبی برای کاهش جنبایی اسپرم پس از انجماد- یخ گشایی باشد زیرا که لستین سویا می‌تواند در محیط انجماد با حل شدن سایر اجزا و نمک‌ها مانند فروکتوز تداخل پیدا کند که باعث افزایش فشار اسمزی محیط انجماد شود که این امر با نتایج آزمایش ما مطابقت داشته و می‌تواند دلیل مناسبی برای کاهش کیفیت اسپرم حاوی ۲ درصد لستین باشد. Moussa و همکاران (۲۰۰۲)، پیشنهاد دادند که افزایش غلظت منابع لیپوپروتئینی و فسفولیپیدی باعث جمع شدگی آن‌ها می‌شوند، بطوریکه جذب و ژلاتینه شدن آن‌ها را با مشکل مواجه می‌کنند که این امر سبب می‌شود که تشکیل غشای محافظتی در اطراف غشای اسپرم به سختی تشکیل شود و در نتیجه کاهش جنبایی و باروری اسپرم را پس از انجماد- یخ گشایی به دنبال داشته باشد. برخی از مواد موجود در زرده تخم مرغ مانع تنفس و کاهش جنبایی اسپرم می-شود که این عمل با افزایش درصد زرده بیشتر می‌شود که عملا در این تحقیق مشاهده شد که رقیق کننده حاوی ۲۰ درصد زرده باعث کاهش تحرک اسپرم شده است. میکروارگانیسم‌های موجود در زرده تخم مرغ با تولید سمومی می‌تواند روی اسپرم‌ها تاثیر گذاشته و باعث مرگ آن‌ها شود. همچنین گرانول‌های زرده برای انجماد اسپرم مضر بوده و سبب آسیب اسپرم در طول انجماد- یخ گشایی می‌گردد. احتمالا ذرات ریز زرده تخم مرغ ویسکوزیته آن را افزایش می‌دهد و می‌تواند باعث کاهش جنبایی و باروری اسپرم شود (Aires و همکاران، ۲۰۰۳). غلظت پایین لستین نیز برای محافظت اسپرم در طی انجماد- یخ گشایی ناکافی به نظر می‌رسد. بررسی نتایج درصد کل اسپرم ناهنجار (مورفولوژی) در هر دو آزمایش اول و دوم بین رقیق کننده‌ها تفاوت معنی داری را نشان نداد که این امر به ژنتیک حیوان مرتبط

است و بیشتر ناهنجاری‌های اسپرم در مرحله اولیه اسپرم سازی رخ می‌دهد. شاید نوع روش انجماد به دلیل ایجاد شوک سرمایی نیز منجر به بعضی ناهنجاری‌ها در اسپرم شود. بررسی اثر محافظتی لیپیدهای سویا بر روی کیفیت اسپرم گاوهای وحشی اروپایی نشان داده است که اختلاف معنی داری در تحرک، خصوصیات حرکتی و مورفولوژی اسپرم بعد از انجماد- یخ گشایی در رقیق کننده‌های حاوی شیره سویا در مقایسه با زرده تخم مرغ وجود ندارد (Pérez و همکاران، ۲۰۰۶).

تاکنون مکانیسم دقیقی که چگونه لستین سویا سبب محافظت اسپرم در طول فرآیندهای انجماد و ذوب می‌شود بطور کامل روشن نشده است. به همین دلیل این تحقیق به منظور دستیابی اطلاعات بیشتر در مورد مکانیسم حفاظتی لستین سویا روی کیفیت اسپرم در طی حفظ انجماد منی و تشخیص آسیب‌های حاصل از انجماد به اسپرم بود، بطوریکه کیفیت اسپرم پس از یخ گشایی بهبود یابد. بنابراین مشاهده شد که یک سطح بهینه‌ای از لستین سویا (۱/۵ درصد) و زرده تخم مرغ (۱۵ درصد) با ایجاد شرایط محیطی مطلوب در رقیق کننده (فشار اسمزی اپتیمم، عدم سمیت، حل شوندگی خوب) و اثر محافظتی مناسب برای اسپرم در طول فرآیندهای انجماد و ذوب توانسته است سبب جلوگیری از آسیب به ساختار و کیفیت اسپرم نسبت به سایر سطوح رقیق کننده‌ها شود.

نتیجه گیری کلی

استفاده از رقیق کننده بر پایه حیوانی که حاوی ۱۵ درصد زرده تخم مرغ بوده و رقیق کننده بر پایه گیاهی که حاوی ۱/۵ درصد لستین بوده است باعث بهبود معنی‌دار کیفیت اسپرم بز مرخز بعد از فرآیند یخ‌گشایی شدن می‌شود.

منابع

Aires, V.A., Hinsch, K.D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S. and 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: 269-279.

Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J.L. and Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL :a comparison with Optidy commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61: 895-907.

Amoah, E.A. and Gelayes, S. (1997). Biotechnological advances in goat reproduction. *Animal Reproduction Science*. 75: 578- 585.

Beccaglia, M., Anastasi, P., Chigioni, S. and Luvoni, G. (2009). Tris-Lecithin Extender Supplemented With Antioxidant Catalase for Chilling of Canine Semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 44: 345-349.

Bucak, M.N., Atessahin, A., Varıslı, O., Yuce, A., Tekin, N. and Akcay, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine andhyaluronan on ram semenMicroscopic and oxidative stress parameters afterfreeze–thawing process.*Theriogenology*. 67:1060–1067.

Bucak, M.N., Sarıözkan, S., Tuncer, P.B., Sakinand, F. and Kulaksız, R. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircusancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*. 89: 24-30.

Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sarıözkan, S., Ulutas, P.A., Çoyan, K. and Baspınar, N. (2009). Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thawmicroscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Research in Veterinary Science*. 87: 468–472.

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

Del Valle, I., Gomez-Duran, A., Holt, W., Muino-Blanco, T. and Cebrian-Perez, J. (2012). Soy Lecithin Interferes With Mitochondrial Function in Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology*. 33: 717-725.

Esterbauer, H. and Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*. 186: 407-421.

Evans, G. and Maxwell, W.M.C. (1987). Handling and examination semen. In:Maxwell WMC, editor. Salamon's artificial insemination of sheep and goat. Sydney: *Butterworths*. PP: 93–106.

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

Graham, J. and Foote, R. (1987). Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*. 24: 42-52.

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

Holt, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 3-22.

Ijaz, A., Hussain, A., Aleem, M., Yousaf, M.S. and Rehman, H. (2009). Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-ravi buffalo. *Theriogenology*. 71:1326-1329.

Leboeuf, B., Restall, B. and Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 62: 113-141.

Maxwell, W.M. and Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction and Fertility Development*. 5: 613–638.

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

Parks, J. and Graham, J. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38: 209-222.

Pérez-Garnelo, S,. Oter, M., Borque, C., Talavera, C. and De la Fuente, J. (2006). Post-thaw viability of European Bison (Bison Bonasus) semen frozen with extenders containing egg yolk or lipids of plant origin and examined with a heterologous in vitro fertilization assay. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 37: 116-125.

Perez, L.J., Valcarcel, A., Heras, M.A., Moses, D.F. and Baldassarre, H. (1996). In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. *Theriogenology*. 45: 1037–1046.

Purdi, P.H. (2006) . A review on goat cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 63: 215-225.

Quinn, P., Chow, P. and White, I. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*. 60: 403-407.

Revell, S.G. and Mrode, R.A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*. 36: 77–86.

Salamon, S. and Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 77-111.

Schafer, S. and Holzmann, A. (2000). The use of transmigration and spermac stain toevaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 59: 201–211.

Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G. and Tainturier, D. (1997). Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*. 34: 385-393.

Vick, M., Bateman, H., Lambo, C. and Swanson, W. (2012). Improved cryopreservation of domestic cat sperm in a chemically defined medium. *Theriogenology*. 78: 2120-2128.

Watson, P. (1976). The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5 C and deep-freezing. *Journal of Thermal Biology*. 1: 137-141.