اثرات غلظت‌های مختلف رقیق‌کننده منی عاری از ترکیبات حیوانی بر ویژگی‌های اسپرم بز در شرایط سرد

- **کاظم کریمی***: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
- **مهدی ژندی**: گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران، صندوق پستی: ٤١١١

تاریخ دریافت: شهریور ١٣٩٤ تاریخ پذیرش: آذر ١٣٩٤

چکیده

یک حجم منی به‌دست آمده از ٤ راس بز نژاد مهابادی ٤-٣ ساله در فصل تولیدمثلی در ٢٠ حجم رقیق‌کننده بر پایه بافر تریس حاوی مقادیر ٠/٥، ١، ١/٥، ٢ و ٢/٥ درصد لسیتن سویا به‌عنوان افزودنی با منشا غیرحیوانی و یک درصد زرده تخم‌مرغ به‌عنوان افزودنی با منشا حیوانی مخلوط شد و اثرات افزودنی‌ها بر جنبایی کل و پیشرونده، زنده مانی، یک‌پارچگی غشاء و میزان اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیرطبیعی در ٢، ٦، ٢٤ و ٤٨ ساعت پس از نگه‌داری منی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد بررسی شدند. نتایج نشان دادند که با افزایش زمان نگه‌داری میزان جنبایی کل و پیشرونده، یک‌پارچگی غشاء، زنده مانی و درصد اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند (P<٠/٠٥). در زمان‌های مورد ارزیابی هیچ تفاوت معنی‌داری در جنبایی کل و پیشرونده و یک‌پارچگی غشاء بین رقیق‌کننده‌های مختلف وجود نداشت (P>٠/٠٥). در ٢٤ ساعت پس از نگه‌داری منی در شرایط سرد زنده مانی اسپرم در رقیق‌کننده حاوی ١/٥ درصد لسیتین بیش‌تر از رقیق‌کننده حاوی ٠/٥ درصد لسیتین بود. در ٦، ٢٤ و ٤٨ ساعت پس از نگه‌داری منی در شرایط سرد درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی در رقیق‌کننده حاوی ١/٥ درصد لسیتین به‌طور معنی‌داری کم‌تر از سایر رقیق‌کننده‌های حاوی زرده و برخی از سطوح مختلف لسیتین بودند (P<٠/٠٥). با توجه به نتایج به‌دست آمده، رقیق‌کننده حاوی ١/٥ درصد لسیتین سویا به‌عنوان رقیق‌کننده مناسب برای نگه‌داری اسپرم بز در شرایط سرد می‌باشد.

کلمات کلیدی: لسیتین سویا، رقیق‌کننده، اسپرم بز، شرایط سرد ذخیره

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: karimikazem@gmail.com

مقدمه

نگه‌داری اسپرم یک روش مناسب برای مطالعات آزمایشگاهی و تلقیح مصنوعی در دام‌های اهلی است و بخش اساسی و ضروری در فن‌آوری‌های تولیدمثل به‌حساب می‌آید. از این فن‌آوری در تولیدمثل، برای انتخاب دام نر دارای ارزش اصلاحی بالا و توزیع ژن‌های برتر در گله‌ها بدون در نظرگرفتن محدودیت زمانی و مکانی استفاده می‌شود (Maia، ۲۰۱۰). طی فرآیند نگه‌داری، عوامل مهمی مانند ترکیب پلاسمای منی (Alaud و همکاران، ۱۹۸۱)، ترکیب شیمیایی رقیق‌کننده‌ها، دمای نگه‌داری و میزان سردسازی، می‌تواند بر کیفیت و باروری اسپرم تأثیرگذار باشد. اضافه کردن نگه‌دارنده‌ها، مهم‌ترین و در حال حاضر اصلی‌ترین موضوع تحقیقات در دهه اخیر در مورد نگه‌داری اسپرم می‌باشد (Aitken و همکاران، ۱۹۹۳). هدف از اضافه کردن نگه‌دارنده به محیط‌های نگه‌داری، تأمین انرژی مورد نیاز سلول‌های اسپرم، حفاظت سلول‌ها از آسیب‌های دمایی، کاهش تنش‌های فیزیکی و شیمیایی ناشی از سرد کردن و در نهایت ایجاد یک محیط مناسب برای زنده ماندن اسپرم‌ها می‌باشد. از وقتی‌که Philips و همکاران (۱۹۳۹) اثرات مثبت زرده تخم‌مرغ را برای ذخیره‌سازی منی پستانداران ثابت نمودند، زرده به‌عنوان یکی از اجزاء معمول در محیط انجماد اسپرم پستانداران مورد استفاده قرار گرفت. لیپوپروتئین‌های با چگالی کم (LDL) بخش زرده تخم‌مرغ با اتصال به غشای اسپرم طی فرآیند نگه‌داری باعث بالا بردن مقاومت اسپرم در برابر آسیب‌های حرارتی می‌شود و اسپرم را در برابر تنش سرمایی محافظت می‌کند (Watson، ۱۹۷۶). هم‌چنین LDL حاوی مقادیری فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدل سرین است که طی فرآیند انجماد-یخ‌گشایی به‌طور مرتب جایگزین فسفولیپیدهای از دست رفته غشای اسپرم می‌شوند (Graham و Foote، ۱۹۸۷). با وجود اثرات بسیار مثبت زرده تخم‌مرغ برای رقیق‌سازی منی در تمامی گونه‌های پستانداران، در سال‌های اخیر استفاده از آن با مشکلاتی روبرو شده است و تلاش‌هایی برای حذف و یا کاهش مقدار آن در رقیق‌کننده‌ها صورت گرفته است. مهم‌ترین مشکلات زرده به‌عنوان یک افزودنی متغیر بودن میزان LDL موجود در آن، آلودگی‌های میکروبی قابل انتقال و تولید سموم میکروبی موثر بر افزایش مرگ اسپرم می‌باشند که باعث می‌شوند تا رقیق‌کننده‌های حاوی زرده تخم‌مرغ به‌عنوان رقیق‌کننده‌های غیراستاندارد شناخته شوند (Gil و همکاران ۲۰۰۳؛ Bousseau و همکاران، ۱۹۹۸). هم‌چنین Moussa و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که حضور یک‌سری مواد در زرده تخم‌مرغ که می‌تواند باعث ممانعت از تنفس اسپرم شود جنبایی و زنده‌مانی اسپرم را کاهش می‌دهد. این امر سبب شده است که تقاضا برای جایگزین کردن زرده با بخش مؤثر آن یا دیگر مواد جایگزین افزایش یابد. یکی از اولین رقیق‌کننده‌های تجاری که در آن زرده تخم‌مرغ با یک نگه‌دارنده غیرحیوانی جایگزین شده است، بیوسیفوس پلاس (رقیق‌کننده حاوی عصاره سویا) نام دارد (Bousseau و Brillard، ۱۹۹۴). این رقیق‌کننده ساخت کشور فرانسه می‌باشد که برای انجماد اسپرم گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. Gil و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که رقیق‌کننده تجاری بیوسیفوس باعث بهبود جنبایی و خصوصیات حرکتی اسپرم گاو در مقایسه با رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ می‌شود. منابع گیاهی هم‌چون عصاره سویا، دارای اثر محافظتی بهتری در مقایسه با زرده تخم‌مرغ است و ساختار اسپرم در این رقیق‌کننده‌ها کم‌تر تحت تأثیر صدمات ناشی از آسیب سرمایی قرار می‌گیرند (Hinsch و همکاران، ۱۹۹۷). Aires و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که رقیق‌کننده آندرومد باعث افزایش معنی‌دار درصد آبستنی در بیش از ۲۰۰۰۰ گاو فحل تلقیح شده با اسپرم منجمد شده با آن رقیق‌کننده در مقایسه با رقیق کننده حاوی زرده تخم‌مرغ شد. Fukui و همکاران (۲۰۰۸) در مقایسه رقیق‌کننده حاوی افزودنی گیاهی با رقیق‌کننده‌های حاوی زرده تخم‌مرغ نشان دادند که بین درصد آبستنی و درصد بره‌زایی در میش‌های تلقیح شده با اسپرم منجمد در دو رقیق کننده تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. بررسی اثر محافظتی لیپیدهای سویا بر کیفیت منی گاوهای وحشی اروپایی نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری در جنبایی، خصوصیات حرکتی و ریخت‌شناسی اسپرم بعد از انجماد- یخ‌گشایی در رقیق‌کننده‌های حاوی شیره سویا در مقایسه با زرده تخم‌مرغ وجود نداشت (Perez-Garnelo و همکاران، ۲۰۰۶). Agarwal و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که لسیتین سویا به‌عنوان یک ماده نگه‌دارنده قادر نیست همانند زرده باعث محافظت از اسپرم انسان طی فرآیند انجماد- یخ‌گشایی شود و کاهش معنی‌داری در جنبایی را به‌دنبال دارند. Forouzanfar و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ای بر انجماد اسپرم قوچ با جایگزینی زرده تخم‌مرغ با لسیتین سویا گزارش کردند که ۱٪ لسیتین سویا می‌تواند جایگزین زرده تخم‌مرغ در رقیق-کننده منی قوچ شود. Sharafi و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ای بر انجماد اسپرم قوچ نشان دادند که غلظت ۱٪ لسیتین سویا اثرات محافظتی برابری با محیط تجاری بایوکسل به‌منظور انجماد اسپرم قوچ نژاد لری بختیاری دارد. در این مطالعه میزان

جنبایی، زنده‌مانی، وضعیت آکروزومی و توانایی لقاح آزمایشگاهی اسپرم در دو محیط انجماد بر پایه یک درصد لسیتین سویا و محیط تجاری بایوکسل برابر بود.

هدف از تحقیق حاضر بررسی و مقایسه نسبت‌های مختلف لسیتین سویا به‌عنوان افزودنی با منشا غیرحیوانی و البته انتخاب بهترین نسبت از نظر اثرات محافظتی در شرایط سرد به عنوان رقیق‌کننده مناسب برای سپرم بز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مکان و حیوانات مورد استفاده در آزمایش: در این تحقیق از منی چهار راس بز نژاد مهابادی با سن ۴-۳ سال استفاده شد. جمع‌آوری منی بزهای آموزش دیده به‌صورت هفته‌ای دوبار و در فصل تولیدمثلی در مهر ماه ۱۳۹۳ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه تهران به‌مدت ۴ هفته صورت گرفت. بلافاصله پس از جمع‌آوری منی و انتقال آن به آزمایشگاه دانشگاه تهران، بررسی‌های اولیه روی منی صورت گرفت.

تغذیه و مدیریت حیوانات مورد آزمایش: بزهای مذکور در یک جایگاه نیمه‌مسقف با کف سیمانی تحت شرایط نور طبیعی قرار گرفته و با جیره در حد نگه‌داری تغذیه شدند. در طول تحقیق بزها به‌صورت آزاد به آب و آجر معدنی دسترسی داشتند.

جمع‌آوری منی و ارزیابی پیش از نگه‌داری: نمونه‌های منی هفته‌ای دوبار به‌وسیله مهبل مصنوعی از بزهای مورد آزمایش جمع‌آوری شدند. قبل از نمونه‌گیری، مهبل‌ها شستشو و استریل شده و در حین جمع‌آوری نمونه، برای سهولت در دخول آلت حیوان سطح داخلی مهبل با ژل لغزنده کننده آغشته گردید. فشار درون مهبل مصنوعی با باز کردن شیر و دمیدن هوا به درون محفظه تنظیم شده و برای جلوگیری از ایجاد شوک سرمایی به اسپرم‌ها، نمونه‌های منی تا زمان انتقال به آزمایشگاه، درون فلاسک عایق دارای آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و پس از اتمام نمونه‌گیری به سرعت به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. حجم بین ۲- ۰/۷۵ میلی‌لیتر، غلظت بیش‌تر از $۲/۵\times۱۰^{۹}$ اسپرم درمیلی‌لیتر، جنبایی بیش‌تر از ۷۰ درصد و مورفولوژی اسپرم غیرطبیعی کم‌تر از ۱۰ درصد در هر انزال به عنوان نمونه طبیعی در نظر گرفته شد. سپس از نمونه‌های منی هر دام به یک مقدار مساوی در یک لوله آزمایش مجزا ریخته و با توجه به احتمال اثرات متقابل بین نمونه‌ها، نمونه‌های منی مخلوط شده نیز از نظر رنگ و جنبایی تقریبی ارزیابی مجدد شدند تا از سلامت نمونه برای انجماد اطمینان حاصل شود (Fazeli و همکاران، ۲۰۱۰).

مواد و محیط‌های آزمایش: برای ساخت رقیق‌کننده از یک محیط بر پایه تریس استفاده گردید. محیط پایه حاوی ۲۷/۱ گرم بر لیتر تریس، ۱۴ گرم بر لیتر سیتریک اسید، ۱۰ گرم بر لیتر فروکتوز و ۱٪ لیسیتین سویا بود. برای ارزیابی یک‌پارچگی غشای اسپرم از محیط هاست (Hypo=HOST osmotic swelling test) متشکل از ۹ گرم بر لیتر فروکتوز، ۴/۹ گرم بر لیتر سیترات سدیم استفاده شد که اسمولالیتی آن ۱۰۰ میلی اسمول بود. برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین متشکل از ۱۶/۷ گرم در لیتر ائوزین، ۲۹ گرم در لیتر سیترات سدیم و ۱۰۰ گرم در لیتر رنگ نگروزین استفاده شد . برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی و اسپرم‌ها با آکروزوم غیرطبیعی از محلول هانکوک متشکل از ۶۲/۵ میلی‌لیتر فرمالین۳۷٪، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سالین، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر استفاده شد. در این مطالعه برای ساخت انواع رقیق‌کننده‌های حاوی نگه‌دارنده با منشأ گیاهی از یک محیط بر پایه بافر تریس استفاده شد (Fazeli و همکاران، ۲۰۱۰).

تیمارهای آزمایشی: برای ساخت محیط‌های انجماد گیاهی حاوی لسیتین سویا از روز قبل محیط بر پایه بافر تریس تهیه و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. غلظت‌های مختلف لیستین سویا (۰/۵، ۰، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد) به‌عنوان یکی از اجزای افزودنی رقیق‌کننده به محیط پایه حاوی بافر تریس اضافه گردید. سپس نمونه‌های رقیق شده تا ۴۸ ساعت نگه‌داری شدند. در این تحقیق علاوه بر ۵ تیمار مذکور یک تیمار که در آن به جای لسیتین سویا از زرده تخم‌مرغ به‌عنوان افزودنی با منشاء حیوانی استفاده شده بود برای مقایسه با تیمارهای فوق به‌صورت جداگانه در نظر گرفته شد (Fazeli و همکاران، ۲۰۱۰).

پردازش و ارزیابی‌های اسپرم: رقیق‌سازی به نسبت ۱ حجم منی و ۲۰ حجم رقیق‌کننده انجام شد. سپس لوله منی در ظرف محتوی ۱۰۰ سی‌سی آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از قرار گرفتن در یخچال ۵ درجه سانتی‌گراد طی ۴۸ ساعت نگه‌داری شد. اولین فراسنجه مورد ارزیابی در این تحقیق بررسی جنبایی اسپرم پس از شروع سردسازی بود. به این منظور منی روی لام قرار گرفت و با گذاشتن یک لامل تمیز روی آن، لام با روش چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت و جنبایی پشرونده هر نمونه ثبت گردید. بررسی یک‌پارچگی

غشاء اسپرم با تست هاست انجام شد. تست هاست براساس اسمولاریتی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. اسمولاریتی محیط هاست ۱۰۰ میلی‌اسمول و اسمولاریته مورد نیاز برای اسپرم ۴۲۵ میلی‌اسمول است. بنابراین، اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن گره می‌خورد. بدیهی است که تنها اسپرم‌های زنده قادر هستند به این نوع تغییر واکنش دهند و اسپرم‌های مرده که در این محیط قرار می‌گیرند هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند. در واقع پس از انجام این تست اسپرم‌های با دم گره خورده به‌عنوان اسپرم‌های زنده و اسپرم‌هایی که دم آن‌ها صاف است به‌عنوان اسپرم مرده تلقی می‌شوند. به این منظور، ده میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاست که حاوی فروکتوز و سیترات سدیم بود اضافه و سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، 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 با دم گره خورده (زنده) نسبت به گره نخورده (مرده) محاسبه شد. برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. این روش بر این اساس می‌باشد که اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. رنگ نیگروزین برای رنگ‌آمیزی پس زمینه و ایجاد اختلاف میان اسپرم و رنگ زمینه برای دید بهتر است. برای این رنگ‌آمیزی ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ی اسپرم را برداشته و روی لام قرار داده و سپس ۲۰ میکرولیتر از رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین روی نمونه ریخته و با سر سمپلر به آرامی نمونه را هم زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از خشک شدن لام را زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ قرار داده و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس شد و سپس از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کم رنگ به‌خود گرفته یا تنها بخشی از گردن آن‌ها رنگ گرفته بود به‌عنوان اسپرم زنده درنظر گرفته شدند. برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱ سی‌سی محلول هانکوک 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 بزرگ‌نمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و اسپرم با آکروزوم غیرطبیعی محاسبه شده است. میانگین سه مشاهده به‌عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شده است (Fazeli و همکاران، ۲۰۱۰).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های حاصل از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (موسسه SAS، ۲۰۰۳) و با رویه MIX و آنالیز مشاهدات تکرار شونده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌ها به‌صورت LSmean و SEM نمایش داده شده‌اند.

نتایج

نمونه‌های جمع‌آوری شده منی از نظر ویژگی‌های اولیه (رنگ، حجم و جنبایی) مورد ارزیابی قرار گرفت تا مطلوب بودن آن‌ها برای انجام آزمایش مشخص گردد. تمام نمونه‌های ارزیابی شده، دارای رنگ مناسب (کرم) بودند و براساس روش ارزیابی اولیه ایوانس دارای جنبایی بیش از ۷۰ درصد بودند.

نتایج نشان داد که با افزایش زمان نگه‌داری میزان جنبایی کل (جدول ۱)، پیشرونده (جدول ۲) و یک‌پارچگی غشاء (جدول ۳) به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($P<0/05$) اما در فراسنجه‌های جنبایی کل هیچ تفاوت معنی‌داری در زمان‌های مورد ارزیابی بین رقیق‌کننده‌های مختلف وجود ندارد ($P>0/05$).

نتایج مربوط به زنده‌مانی(جدول ۴) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین رقیق‌کننده‌ها در ۲۴ ساعت پس از نگه‌داری اسپرم می‌باشد به‌طوری‌که در ساعت ۲۴ زنده‌مانی اسپرم در رقیق کننده‌های حاوی ۱/۵ درصد لسیتین بیش‌تر از رقیق‌کننده حاوی ۰/۵ درصد لسیتین بود. از سوی دیگر با افزایش زمان نگه‌داری میزان زنده‌مانی کاهش معنی‌داری را نشان داد. در ۶ ساعت پس از نگه‌داری منی درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی در رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ درصد لسیتین به‌طور معنی‌داری کم‌تر از رقیق‌کننده‌های حاوی زرده، ۲ و ۲/۵ درصد لسیتین بودند. در ساعت ۲۴ نیز درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی در رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ درصد لسیتین به‌طور معنی‌داری کم‌تر از سایر رقیق‌کننده‌ها (به‌استثنای رقیق کننده حاوی ۲ درصد لسیتین) بودند. در ساعت ۴۸ نیز اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی در رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ درصد لسیتین به‌طور معنی‌داری کم‌تر از رقیق‌کننده‌های حاوی زرده، ۰/۵ و ۲/۵٪ لسیتین بودند ($P<0/05$). درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی نیز همسو با تغییرات در سایر فراسنجه‌های کیفی اسپرم با افزایش زمان نگه‌داری افزایش یافت.

جدول ۱: درصد جنبایی کل اسپرم‌های موجود در رقیق کننده‌های حاوی مقادیرمتفاوت لسیتین سویا در زمان‌های مختلف نگه‌داری اسپرم به حالت سرد

درصد لسیتسن سویا در رقیق‌کننده	زمان نگه‌داری اسپرم (ساعت)				معنی داری اثر زمان نگه‌داری	SEM کل
	۲	۶	۲۴	۴۸		
۰/۵	۷۲/۴[a]	۶۸/۶[a]	۵۷/۶[b]	۴۹/۴[c]	*	
۱	۷۴/۲[a]	۷۴/۲[a]	۶۴/۶[b]	۵۳/۴[c]	*	
۱/۵	۸۱/۲[a]	۷۷/۶[a]	۶۶/۸[b]	۵۵/۴[c]	*	
۲	۷۸/۲[a]	۷۵/۴[a]	۶۴/۰[b]	۵۲/۲[c]	*	
۲/۵	۷۶/۲[a]	۷۴/۸[a]	۶۶/۶[b]	۵۴/۰[c]	*	
۱٪ زرده تخم‌مرغ	۷۸/۶[a]	۷۵/۴[a]	۶۰/۶[b]	۵۰/۰[c]	*	
معنی‌داری اثر تیمار	Ns	Ns	Ns	Ns		۴/۰۳

[abc]: حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های مربوطه می‌باشند (P<۰/۰۵).

Ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار (P>۰/۰۵)، *: وجود تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵

جدول ۲: درصد جنبایی پیشرونده اسپرم‌های موجود در رقیق کننده‌های حاوی مقادیر متفاوت لسیتین سویا در زمان‌های مختلف نگه‌داری اسپرم به حالت سرد

درصد لسیتسن سویا در رقیق‌کننده	زمان نگه‌داری اسپرم (ساعت)				معنی داری اثر زمان نگه‌داری	SEM کل
	۲	۶	۲۴	۴۸		
۰/۵	۵۴/۸[a]	۵۴/۰[a]	۴۴/۴[b]	۳۸/۶[c]	*	
۱	۵۸/۸[a]	۵۵/۰[a]	۴۷/۲[b]	۳۷/۲[c]	*	
۱/۵	۶۳/۲[a]	۵۸/۸[a]	۵۰/۶[b]	۴۲/۰[c]	*	
۲	۵۹/۸[a]	۵۸/۲[a]	۴۶/۰[b]	۳۷/۲[c]	*	
۲/۵	۵۷/۰[a]	۵۶/۶[a]	۴۶/۲[b]	۳۶/۰[c]	*	
۱٪ زرده تخم‌مرغ	۵۸/۶[a]	۵۶/۴[a]	۴۴/۲[b]	۳۴/۶[c]	*	
معنی‌داری اثر تیمار	Ns	Ns	Ns	Ns		۳/۹

[abc]: حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های مربوطه می‌باشند (P<۰/۰۵).

Ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار (P>۰/۰۵)، *: وجود تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵

جدول ۳: درصد یک‌پارچگی غشای اسپرم‌های موجود در رقیق کننده‌های حاوی مقادیر متفاوت لسیتین سویا در زمان‌های مختلف نگه‌داری اسپرم به حالت سرد

درصد لسیتسن سویا در رقیق‌کننده	زمان نگه‌داری اسپرم (ساعت)				معنی داری اثر زمان نگه‌داری	SEM کل
	۲	۶	۲۴	۴۸		
۰/۵	۶۹/۸a	۶۶/۲a	۵۴/۶b	۴۴/۸c	*	
۱	۷۰/۸a	۶۸/۲a	۶۰/۶b	۴۸/۲c	*	
۱/۵	۷۵/۸a	۷۲/۲a	۶۱/۶b	۴۹/۰c	*	
۲	۷۳/۰a	۶۹/۸a	۵۸/۲b	۴۸/۶c	*	
۲/۵	۷۱/۶a	۷۱/۰a	۵۸/۸b	۴۹/۶c	*	
۱٪ زرده تخم‌مرغ	۷۲/۴a	۷۱/۲a	۵۷/۰b	۴۶/۸c	*	
معنی‌داری اثر تیمار	Ns	Ns	Ns	Ns		۳/۹۹

[abc]: حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های مربوطه می‌باشند (P<۰/۰۵).

Ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار (P>۰/۰۵)، *: وجود تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵

جدول ۴: درصد زنده‌مانی اسپرم‌های موجود در رقیق کننده‌های حاوی مقادیر متفاوت لسیتین سویا در زمان‌های مختلف نگه‌داری اسپرم به حالت سرد

درصد لسیتسن سویا در رقیق‌کننده	زمان نگه‌داری اسپرم (ساعت)				معنی داری اثر زمان نگه‌داری	SEM کل
	۲	۶	۲۴	۴۸		
۰/۵	۷۵/۸a	۷۰/۶a	۵۹/۰bB	۵۱/۸c	*	
۱	۷۷/۶a	۷۶/۰a	۶۴/۰bAB	۵۸/۲c	*	
۱/۵	۸۳/۰a	۷۹/۴a	۷۱/۴bA	۶۰/۰c	*	
۲	۸۰/۲a	۷۸/۰a	۶۵/۸bAB	۵۷/۰c	*	
۲/۵	۷۹/۲a	۷۷/۶a	۶۸/۰bAB	۵۹/۰c	*	
۱٪ زرده تخم‌مرغ	۸۳/۰a	۷۸/۰a	۶۴/۸bAB	۵۵/۲c	*	
معنی‌داری اثر تیمار	Ns	Ns	*	Ns		۳/۸۹

abc: حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های مربوطه می‌باشند (P<۰/۰۵).

Ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار (P>۰/۰۵)، *: وجود تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵

جدول ۵: درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیرطبیعی در رقیق‌کننده‌های حاوی مقادیر متفاوت لسیتین سویا در زمان‌های مختلف نگه‌داری اسپرم به حالت سرد

درصد لسیتسن سویا در رقیق‌کننده	زمان نگه‌داری اسپرم (ساعت)				معنی داری اثر زمان نگه‌داری	SEM کل
	۲	۶	۲۴	۴۸		
۰/۵	۹/۸b	۹/۸bAB	۱۰/۹bA	۱۳/۰aA	*	
۱	۹/۷c	۱۰/۲bcAB	۱۱/۵abA	۱۲/۴aAB	*	
۱/۵	۷/۶b	۸/۲bB	۸/۶bB	۱۰/۲aB	*	
۲	۸/۴c	۱۰/۵bA	۱۰/۷abAB	۱۲/۱aAB	*	
۲/۵	۹/۹b	۱۱/۲abA	۱۱/۴abA	۱۳/۸aA	*	
۱٪ زرده تخم‌مرغ	۹/۹c	۱۱/۸bA	۱۲/۱bA	۱۳/۷aA	*	
معنی‌داری اثر تیمار	Ns	*	*	*		۰/۸۱

abc: حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های مربوطه می‌باشند (P<۰/۰۵).

Ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار (P>۰/۰۵)، *: وجود تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵

بحث

در تحقیق حاضر با افزایش زمان جنبایی کل و پیشرونده و یک‌پارچگی غشاء کاهش معنی‌داری نشان داد که با سایر مطالعات هم‌خوانی دارد (فولادوند و همکاران، ۱۳۸۲). آسیب‌های ساختاری و غیرساختاری غشاء به‌علت نگه‌داری در سرما و کاهش فسفریلاسیون پروتئین آکسونم طی نگه‌داری در سرما می‌توانند از دلایل کاهش جنبایی اسپرم باشد (Baumber و همکاران، ۲۰۰۰) یک دلیل کاهش تحرک پیشرونده اسپرم می‌تواند اثر فرآیند سردسازی باشد (Maxwell و Watson، ۱۹۹۶). در مطالعه‌ای بر اسپرم قوچ مشخص شد که در روز دوم نگه‌داری اسپرم در ۴ درجه سانتی‌گراد میزان جنبایی پیشرونده در رقیق کننده حاوی لسیتین سویا بهتر از رقیق‌کننده حاوی شیر است (Kasimanickam و همکاران، ۲۰۱۱). هم‌چنین در پژوهشی دیگر نشان داده شد که رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ توانایی بهتری برای نگه‌داری اسپرم بعد از ۳۰ ساعت نگه‌داری داشت (Paulenz و همکاران، ۲۰۰۳). در مطالعه فولادوند و همکاران (۱۳۹۳)، در زمان‌های مختلف نگه‌داری اسپرم قوچ در شرایط سرد تفاوتی بین سه رقیق‌کننده حاوی ۱٪ شیر، زرده و یا لسیتین سویا از نظر تاثیر بر زنده‌مانی اسپرم مشاهده نشد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. اما نتایج مطالعه اخیر علاوه بر آن نشان داد که هرچند از نظر زنده‌مانی اسپرم در ۲۴ ساعت ذخیره در شرایط سرد بین دو رقیق‌کننده حاوی ۱٪ لسیتین سویا و یا ۱٪ زرده تخم‌مرغ تفاوتی وجود ندشت اما هنگامی‌که

سطح لسیتین موجود در رقیق‌کننده به ۱/۵ ٪ افزایش یافت اثرات آن بر زنده‌مانی بهتر شد بنابراین سطوح مختلف لسیتین سویا در رقیق‌کننده خود به‌عنوان یک عامل اثرگذار و بسیار مهم مطرح می‌باشد و بیانگر این واقعیت است که هرچند اثرات رقیق‌کننده‌ها در افزایش زنده‌مانی به کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش تنش‌های سرمایی مربوط است (Ball، ۲۰۰۱) اما این امکان وجود دارد که با افزایش سطح لسیتین سویا در رقیق کننده از ۱ درصد به ۱/۵ درصد بتوان این اثرات را به حداقل رساند و البته نمی‌توان از سطوح بالاتر (مثلاً ۲ یا ۲/۵ درصد) لسیتین سویا در رقیق‌کننده نیز چنین انتظاری را داشت. شوک‌های سرمایی (Amann و Graham، ۱۹۹۳)، پیر شدن اسپرماتوزوا در طی ذخیره‌سازی (Watson، ۱۹۸۱) و افزایش تولید اکسیژن‌های واکنش‌پذیر (Alvarez و همکاران، ۲۰۱۱) می‌توانند از دلایل خسارت غشایی اسپرم باشند. در آزمایش حاضر تفاوت معنی‌داری از نظر سلامت غشای اسپرم بین سطوح مختلف لسیتین سویا در رقیق‌کننده وجود نداشت و هیچ تفاوتی این سطوح با زرده از خود نشان ندادند که با نتایج برخی محققین مطابقت ندارد (فولادوند و همکاران،۱۳۹۳؛ Bohlooli و همکاران، ۲۰۱۲). شاید بتوان چنین استدلال کرد که حداقل لسیتین سویای لازم برای افزودن به رقیق‌کننده به جهت ممانعت از خسارت به غشای اسپرم ۰/۵ درصد می‌باشد و افزایش این سطح به سطوح بالاتر کمکی به بهبود بیش‌تر شرایط نخواهد کرد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ درصد لسیتین سویا به‌عنوان رقیق کننده مناسب برای نگه‌داری اسپرم بز در شرایط سرد می‌باشد چراکه در شرایط سرد زنده‌مانی اسپرم‌ها در ۲۴ ساعت پس از نگه‌داری در این نوع رقیق‌کننده بیش‌تر از سایر رقیق‌کننده‌های گیاهی و زرده بود و هم‌چنین در ۶ تا ۲۴ ساعت پس از نگه‌داری درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیرطبیعی در آن کم‌تر از سایر رقیق‌کننده‌های حاوی درصدهای متفاوت لسیتین سویا و زرده بود اسپرم و با توجه به نگه‌داری اسپرم در شرایط سرد که تنش کم‌تری نسبت به شرایط انجماد ایجاد می‌کند، سطح ۰/۵ درصد لسیتین در رقیق‌کننده کافی است و قادر است که اسپرم را در این شرایط نگه‌داری کند. لازم به ذکر است که برای اینکه لسیتین در شرایط انجماد اثرات محافظتی خود را دارا باشد باید از سطح ۱/۵٪ آن استفاده شود (Sharafi و همکاران، ۲۰۰۹). از طرف دیگر، استفاده از زرده تخم‌مرغ در محیط‌های نگه‌داری اسپرم در سال‌های اخیر با بروز مشکلاتی همراه بوده است. متغیطر بودن کیفیت زرده تخم‌مرغ و وابستگی آن به عواملی مانند وراثت، تعداد روزهای تخم‌گذاری و شرایط نگه‌داری آن باعث شده است که تهیه غلظت‌های استاندارد از آن در محیط‌های نگه‌داری با مشکل روبرو شود. هم‌چنین، زرده تخم‌مرغ احتمال انتقال آلودگی به‌وسیله باکتری‌ها و مایکوپلاسماها را افزایش می‌دهد. زرده دارای پروژسترون است که سبب ظرفیت‌پذیری زود هنگام اسپرم شده و به آکروزوم اسپرم آسیب وارد می‌کند. از معایب دیگر آن وجود ذراتی است که ارزیابی‌های میکروسکوپی به‌خصوص با CASA را دچار مشکل می‌کند، زیرا ذرات را نیز اسپرم مرده در نظر می‌گیرد. برخلاف بدن که HDLها به‌عنوان لیپوپروتئین‌های خوب و LDLها به‌عنوان لیپوپروتئین‌های بد نامیده می‌شوند، می‌توان در این‌جا نام آن‌ها را جایگزین یکدیگر نمود، زیرا HDLهای زرده اثر معکوس با LDL داشته و اثرات مفید آن‌ها را از میان برمی‌دارند. با توجه به این‌که اثر اصلی زرده تخم‌مرغ در نگه‌داری سلول‌ها مربوط به بخش لیپوپروتئین‌های با چگالی کم مانند لسیتین می‌باشد لذا استفاده از لسیتین سویا به‌عنوان ماده تجاری قابل دسترس در محیط رقیق‌کننده منی می‌تواند کیفیت محیط را تا حد قابل قبولی افزایش دهد. با توجه به مواردی که ذکر شد در این تحقیق لسیتین سویا جایگزین زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده منی شد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ درصد لسیتین سویا به‌عنوان رقیق‌کننده مناسب برای نگه‌داری اسپرم بز در شرایط سرد می‌باشد چرا که در زنده مانی اسپرم‌ها در ۲۴ ساعت پس از نگه‌داری منی در شرایط سرد در این رقیق کننده بیش‌تر از سایر رقیق‌کننده‌های گیاهی و زرده بود و هم‌چنین در ۶ تا ۲۴ ساعت پس از نگه‌داری اسپرم بز در شرایط سرد، درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیرطبیعی در آن کم‌تر از سایر رقیق‌کننده‌های حاوی درصدهای متفاوت لسیتین سویا و زرده بود.

منابع

۱. **فولادوند، ف.؛ کریمی، ک. و ژندی م.، ۱۳۹۳.** مقایسه اثر سه رقیق کننده لسیتین، شیر و زرده تخم‌مرغ بر نگهداری منی قوچ نژاد زندی در شرایط سرد. فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری. سال۶، شماره ۲، صفحات۸۳ تا۸۸.

2. **Agarwal, A.; Prabakaran, SA. and Said T.M., 2005.** Prevention of oxidative stress injury to sperm. J androl, Vol. 26,pp: 654.

3. **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 cryo

4. **Aitken, R.J., Harkiss, D. and Buckingham, D., 1993.** Relationship betweeniron-catalysed lipid peroxidation potential and human spermfunction. Journal of Reproduction and Fertility. Vol. 98, pp: 257-265.

5. **Alaud, D.; Chaudhry, R.A. and Ahmad, K., 1981.** Effect of different extenders on freezability of buffalo semen. J PakVet. Vol. 1, pp: 59-61.

6. **Amann, R.P. and Graham, J.K., 1993.** Spermatozoa function in: Kinnor.A.O. and Voss, J.L., Equine reproduction. Philadelpha: Lea and Febiger. pp: 715-745.

7. **Ball, B.A.; Medina, V.; Gravance, C.G. and Bumber, J., 2001.** Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at ۵ degree C. Theriogenology. Vol. 56, No. 4, pp: 577-589.

8. **Baumber, J.; Ball, B.A.; Gravance, C.G.; Medina, V. and Davies, M.C.G., 2000.** The effect of reactive oxygen Species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. Andrology. Vol. 21, No. 6, pp: 895-902.

9. **Bohlooli, S.; Cedden, F.; Pisjang, J.; Razzaghzadeh, S. and Bozoglu, S., 2012.** The effect of different extenders .on post thaw sperm viability, motility and membrane integrity in cryopreserved semen of zandi ram. J. Basic. Appl. Sci. Vol 2, pp: 1120-1123.

10. **Bousseau, S.; Brillard, J.; Marquant-Le Guienne, B.; Guerin, B.; Camus, A. and 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. Vol. 50, pp: 699-706.

11. **Bousseau, S. and Brillard, J., 1994.** In vitro and in vivo results of fertility in cattle, following inseminations performed with semen diluted and frozen in a diluent free of animal origin products (Biociphos Plus).

12. **Fazeli, P.; Zamiri, M.J.; Farshad, A. and Khalili, B., 2010.** Effects of vitamin C on testicular and seminal characteristics of Markhoz goats. Iranian Journal of Veterinary Research. Vol. 11, No. 3, Ser. No. 32, pp: 267-272.

13. **Forouzanfar, M.; Sharafi, M.; Hosseini, S.M.; Ostadhosseini, S.; Hajian, M. and Hosseini, L., 2010.** In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. Theriogenology. Vol. 73, pp: 480-487.

14. **Fukui, Y.; Kohno, H.; Togari, T.; Hiwasa, M. and Okabe, K., 2008.** Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender (AndroMed) in sheep. Journal of Reproduction and Development. Vol. 73, pp: 480-487.

15. **Gil, J.; Januskauskas, A.; Haard, M.C.; Haard, M.; Johanisson, A. and Soderquist, L., 2000.** Functional Sperm Parameters and Fertility of Bull Semen Extended in Biociphos Plus® and Triladyl®. Reproduction in Domestic Animals. Vol. 35. pp: 69-77.

16. **Gil, J.; Rodriguez-Irazoqui, M.; Lundeheim, N.; Soderquist, L. and Rodriguez-Martinez, H., 2003.** Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. Theriogenology. Vol, 59, pp: 1157-1170.

17. **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. Vol, 24, pp: 42-52.

18. **Hinsch, E.; Hinsch, K.D.; Boehm, J.; Schill, W.B. and Mueller-Schloesser, F., 1997.** Functional Parameters and Fertilization Success of Bovine Semen Cryopreserved in Egg yolk Free and Egg yolk Containing Extenders. Reproduction in Domestic Animals. Vol, 32, pp: 143-149.

19. **Kasimanickam, R.; kasimanickam, V.; Tibary, A. and Pelzer, K., 2011.** Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at °۴C. Small Ruminant Research. Vol. 99, No. 2-3, pp: 208-213.

20. **Maia, M.S.; Bicudo, S.D.; Sicherle, C.C.; Rodello, L. and Gallego, I.C.S., 2010.** Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. Anim Reprod Sci. Vol. 122, pp: 118-123.

21. **Maxwell, W.M.C. and Watson, P.F., 1996.** Recent progress in the preservation of ram semen. Animal Reproduction Science. Vol. 42, No. 1-4, pp: 55-65.

22. **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. Vol, 57, pp: 1695-1706.

23. **Paulenz, H.; Soderquist, L.; Perez-Pe, R. and Berg, K.A., 2002.** Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. Theriogenology. Vol. 57, No. 2, pp: 823-836.

24. **Perez-Garnelo, S.; Oter, M.;Borque, C.; Talavera, C.; Delclaux, M. and Martinez-Nevado, E., 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. J Zoo and Wildlife Med. Vol. 37, pp: 116-125.

25. **Phillips, P.H., 1939.** Preservation of bull semen. Journal of biological chemistry. Vol, 130, pp: 415.

26. **Sharafi, M.; Forouzanfar, M.; Hosseini, S.M.; Hajian, M.; Ostadhosseini, S. and Hosseini, L., 2009.** In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for Ram semen cryopreservation. International J Fert Steril. Vol, 3, pp: 149-152.

27. **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. Vol. 1, pp: 137-141.