مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۹ شماره ۱/ سال۱۳۹۸/ صفحات ۴۹ تا ۶۰

اثر سطوح مختلف لسیتین سویا بر کیفیت، پراکسیداسیون لیپیدها و یکپارچگی غشاء آکروزومی اسپرم بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

محمد شمس الهی[۱]، حسین دقیق‌کیا[۲*]، غلامعلی مقدم[۲] و اکبر تقی‌زاده[۲]

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۱

[۱]دانش آموخته دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
[۲] استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
[*] مسئول مکاتبه: Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: لسیتین‌سویا می‌تواند بعنوان رقیق‌کننده در فرآیند انجماد اسپرم مورد استفاده قرار گیرد. **هدف**: هدف از این مطالعه بررسی اثر سطوح مختلف لسیتین‌سویا بعنوان رقیق‌کننده بر روی کیفیت اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی می‌باشد. **روش کار**: در این تحقیق نمونه‌های منی با استفاده از واژن مصنوعی از پنج راس قوچ نژاد قزل به صورت هفته‌ای دوبار جمع‌آوری شد. برای حذف اثرات فردی، نمونه‌ها پس از ارزیابی اولیه با هم مخلوط شدند. سطوح مختلف لسیتین‌سویا بعنوان رقیق‌کننده (۱، ۱/۵ و ۲ درصد) به بافر تریس اضافه گردید. بعد از فرآوری و انجماد، نمونه‌ها تا زمان ارزیابی در ازت مایع نگهداری شدند. بعد از ذوب، تحرک اسپرم و پارامترهای حرکتی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء پلاسمایی و آکروزومی، اسپرم‌های غیرطبیعی و مقدار لیپید پراکسیداسیون (MDA) مورد ارزیابی قرار گرفتند. **نتایج**: نتایج نشان داد که تحرک کل و برخی پارامترهای حرکتی اسپرم (VSL، VCL، VAP و ALH) بطور معنی‌داری در گروه تیماری ۱/۵ درصد لسیتین‌سویا بیشتر بود ($P<۰/۰۵$). بین تیمارها به لحاظ زنده‌مانی، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی، یکپارچگی غشاءپلاسمایی و پراکسیداسیون لیپیدها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. یکپارچگی غشاءآکروزوم در گروه تیماری ۱/۵ درصد لسیتین‌سویا نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود ($P<۰/۰۵$). **نتیجه گیری کلی**: بطورخلاصه سطح ۱/۵ درصد لسیتین‌سویا نسبت به سایر سطوح عملکرد بهتری بر کیفیت اسپرم بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی داشت.

واژگان کلیدی: آکروزوم، اسپرم، انجماد-یخ‌گشایی، قوچ، لسیتین‌سویا

مقدمه

نگهداری و حفظ طولانی مدت اسپرم در ازت مایع یکی از تکنیک‌های با ارزش برای حفظ ذخایر ژنتیکی می‌باشد (مازور و همکاران ۲۰۰۸). انجماد اسپرم شامل اضافه نمودن مواد محافظ، فریزکردن و ذخیره نمونه‌های اسپرم می‌باشد. وجود هرگونه اشکالی در مراحل ذکر شده سبب آسیب‌های جبران‌ناپذیر به اسپرم شده و در نتیجه باروری آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد (کوپیکا و همکاران ۲۰۰۳). بنابر این قبل از انجماد اسپرم ارزیابی رقیق‌کننده‌های مورد استفاده، یک امر ضروری برای دست یافتن به یک دستورالعمل مناسب انجماد اسپرم قوچ می‌باشد.

یک رقیق‌کننده خوب باید دارای یک منبع انرژی (گلوکز و فروکتوز)، یک منبع از لیپوپروتئین‌ها و یا مواد با وزن مولکولی کم جهت جلوگیری از شوک سرمایی (زرده تخم مرغ، شیر و لسیتین سویا)، ترکیبات یونی و غیریونی جهت حفظ فشار اسمزی و pH و سایر افزودنی‌ها مانند آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (آیرس و همکاران ۲۰۰۳). رقیق‌کننده حاوی زرده تخم مرغ بخاطر حضور ترکیبات لیپوپروتئینی با وزن مولکولی کم مانند لسیتین باعث حفاظت از غشاء پلاسمایی اسپرم در طول فرآیند انجماد می‌شوند (آمیرات و همکاران ۲۰۰٤). لسیتین همان فسفاتیدیل کولین می باشد و یکی از ترکیبات زرده تخم مرغ می باشد که در طول فرآیند انجماد مانع از شوک سرمایی می شود. بهرحال استفاده از زرده تخم‌مرغ بخاطر مسائل بهداشتی، تولید مواد متابولیک و سمی و همچنین عوامل عفونی، سبب کاهش کیفیت اسپرم می‌شود (التوز و همکاران ۲۰۰۸). بنابر این پیشنهاد شده که استفاده از یک منبع گیاهی مانند لسیتین‌سویا بجای زرده تخم‌مرغ سبب کاهش ریسک و بهبود کیفیت اسپرم و باروری شود (اختر و همکاران ۲۰۱۲). لسیتین سویا بطور قابل ملاحظه‌ای باعث افزایش درصد اسپرم‌های متحرک و زنده‌مانی از طریق تشکیل یک لایه اطراف اسپرم و مقابله با ترکیبات فعال اکسیژن می‌شود (فروزانفر و همکاران ۲۰۱۰). لسیتین سویا همچنین باعث بهبود پتانسیل میتوکندری و یکپارچگی غشاء آکروزومی در قوچ (امام‌وردی و همکاران ۲۰۱۳) و کاهش پراکسیداسیون لیپیدها در بز می‌شود (سلمانی و همکاران ۲۰۱۳).

در برخی از مطالعات لسیتین‌سویا بصورت تجاری و با فرمول ناشناخته در گاو نر مورد استفاده قرار گرفته است و در تعداد کمی از مطالعات مقدار و ترکیب آن لسیتین گزارش شده است. دیپاز و همکاران (۲۰۱۰) در آزمایشی سطوح مختلف لسیتین سویا (۰/۵، ۲ و ۳/۵ درصد) در رقیق‌کننده حاوی فروکتوز را بر کیفیت اسپرم قوچ مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که تحرک اسپرم در تیمار ۲ درصد بیشترین مقدار بود. فروزانفر و همکاران (۲۰۱۰) دو سطح (۱ و ۲ درصد) لسیتین سویا را بر روی اسپرم قوچ بکار برده و نتایج مطالعه آنها نشان داد که سطح ۱ درصد اثر بهتری بر روی کیفیت اسپرم داشت. از آنجائیکه غلظت‌های متفاوتی از لسیتین سویا (۰/۵ تا ۳/۵ درصد) در مطالعات مختلف بر روی قوچ مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج متفاوتی هم حاصل گردیده است، لذا در این مطالعه تلاش شد تا سطوح مناسب لسیتین سویا بر کیفیت اسپرم قوچ بعد از فرایند انجماد یخ‌گشایی (تحرک کل، پارامترهای تحرک اسپرم، یکپارچگی آکروزوم، زنده‌مانی، مورفولوژی و ...) بدست آید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز واقع در استان آذربایجان شرقی صورت گرفت. جمع‌آوری منی از پنج راس قوچ قزل با شرایط تغذیه‌ای و محیطی یکسان، با استفاده از واژن مصنوعی و بصورت دوبار در هفته صورت گرفت. نمونه‌های منی هر یک از قوچ‌ها از نظر حجم، رنگ، غلظت اولیه، تحرک، عدم آلودگی به ادرار و خون و میزان اسپرم با مورفولوژی طبیعی بررسی و سپس نمونه‌های منی با رنگ کرمی، غلظت بیش از یک میلیارد اسپرم در هر میلی‌لیتر، تحرک بیشتر از ۷۰ درصد و مورفولوژی کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیرطبیعی بعنوان منی نرمال در نظر گرفته شده و در غیر این صورت، نمونه حذف گردید. برای از بین بردن اثرات فردی و احتمالا اثرات متقابل بین نمونه‌ها، نمونه‌های نرمال در مقادیر مساوی از هر قوچ با هم مخلوط شدند. در این پژوهش از رقیق‌کننده بر پایه تریس به همراه سطوح مختلف لسیتین سویا (۱، ۱/۵ و ۲ درصد)، در پنج تکرار و میزان ۷ درصد حجمی گلیسرول استفاده شد. دو ساعت پس از سپری شدن مرحله سردسازی و تعادل، نمونه‌های منی در پایوت ۰/۲۵ میلی‌لیتری پر شدند.

پایوت‌ها بعد از انجماد تا زمان ارزیابی در ازت مایع (۱۹۶℃-) نگهداری شدند. بمنظور ارزیابی نمونه‌ها، پایوت‌های حاوی منی منجمد از تانک ازت خارج، سپس در داخل حمام آبگرم با دمای ۳۷℃ بمدت ۳۰ ثانیه یخ‌گشایی شدند. منی یخ‌گشایی شده در درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری شماره‌گذاری شده تخلیه و سپس به جهت تطابق‌پذیری به مدت پنج دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد.

ارزیابی تحرک اسپرم

بمنظور بررسی تحرک اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی از هر گروه تیماری دو پایوت یخ‌گشایی شده و به داخل لوله‌های میکروتیوب انتقال داده شدند. جهت بررسی بهتر و کاهش غلظت، نمونه‌ها را رقیق کرده و سپس ۷ میکرولیتر از نمونه منی رقیق‌شده روی لام قرار داده شد. فراسنجه‌های حرکتی اسپرم، با استفاده از سیستم کامپیوتری ارزیابی اسپرم (CASA, Video Test Sperm 3.1, Russia) ارزیابی شدند.

زنده مانی اسپرم

وضعیت زنده‌مانی اسپرم با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین (۱/۶۷ گرم رنگ ائوزینY، ۱۰ گرم رنگ نگروزین، ۲/۹ گرم سیترات‌سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) ارزیابی شد. پس از یخ‌گشایی اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۵ میکرولیتر از رنگ، روی یک لام گرم قرار داده و به آرامی مخلوط، سپس با یک لام دیگر گسترش تهیه گردید. گسترش تهیه شده در دمای ۳۷℃ قرار گرفته و پس از خشک شدن تعداد ۲۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ۴۰x مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌هایی که بطور جزئی یا کامل رنگ بنفش به خود گرفته بودند، بعنوان اسپرم زنده محسوب شدند (گراف و همکاران ۲۰۰۷).

یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم

برای ارزیابی پارامتر یکپارچگی غشای اسپرم از محلول هایپواسموتیک (فروکتوز ۹ گرم/لیتر، سیترات سدیم ۴/۹ گرم/لیتر و اسمولاریته ۱۰۰ میلی اسمول/کیلوگرم) استفاده شد. بعد فرآیند یخ‌گشایی، محتوای پایوت‌ها به داخل میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری تخلیه شد، سپس بمدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس قسمت بالای میکروتیوب که حاوی رقیق‌کننده است جدا شده و بعد از آن ۱۰ میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاس (HOS) اضافه گردید. سپس در داخل انکوباتور ۳۷℃ بمدت ۳۰ دقیقه قرار داده و پس از گذشت این زمان وضعیت اسپرم‌ها با تهیه حداقل سه قطره از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست بررسی گردید. در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شماش گردید. سپس درصد اسپرم‌های با دم‌گره‌خورده (دارای غشاء یکپارچه) نسبت به اسپرم‌های گره‌نخورده (دارای غشاء غیریکپارچه) محاسبه شد (ریول و مرود ۱۹۹۴).

اسپرم های غیر طبیعی

برای بررسی درصد اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه منی به میکروتیوب‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول هانکوک[1] اضافه کرده و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار داده و پس از پوشش با یک لامل حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فاز کنتراست ۴۰X اسپرم های غیرطبیعی (ضخیم بودن قطعه میانی، خمیدگی قطعه میانی، دم بریده دم پیچ‌خورده) شمارش گردید (هانکوک ۱۹۵۶).

اندازه گیری غلظت مالون دی آلدهید

غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) بعنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید در نمونه‌های منی است که با استفاده از واکنش تیوباربیتوریک‌اسید اندازه‌گیری می‌شود. برای این منظور یک میلی‌لیتر از هر نمونه منی با یک میلی‌لیتر EDTA و دو میلی‌لیتر TCA[2] را با هم مخلوط کرده و به داخل لوله‌های مخروطی ریخته شدند. لوله مخروطی در g ۱۲۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ

[1] Hankuk
[2] Trichloroacetic Acid

کرده سپس یک میلی‌لیتر از محلول بالای لوله مخروطی با یک میلی‌لیتر TBA[1] در میکروتیوب مخلوط گردید. لوله مخروطی برای مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۹۵℃ قرار داده شد. نمونه‌ها در مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شده و سپس میزان جذب نوری آنها را با استفاده از اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. در پایان، غلظت MDA (نانومول در میلی‌لیتر منی) محاسبه گردید (استربور و چسمن ۱۹۹۰).

ارزیابی یکپارچگی غشاء آکروزوم

برای انجام این آزمایش ابتدا پایوت‌ها یخ‌گشایی شده و محتویات هر کدام از پایوت‌ها در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری به مدت ۱۰ دقیقه با ۶۰۰g سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی حذف و پلت در ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد حل گردید. سپس جهت فیکس شدن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤℃ قرار داده شده و متعاقبا بوسیله پیپت مخلوط شد. در ادامه حدود ۱۰ میکرولیتر از نمونه را روی لام قرار داده و با استفاده از یک لامل گسترش تهیه گردیده و به اتانول اجازه داد شده که تبخیر گردد. در ادامه ۲۰ میکرولیتر از محلول PSA[2](۵۰ میکرولیتر در میلی لیتر) را بر روی نمونه قرار داده و از آن گسترش تهیه گردید. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤℃ انکوبه گردید سپس ۱۵ مرتبه در آب دوبار تقطیر غوطه‌ور گردیده و بعد از خشک شدن با استفاده از ۳۰ میکرولیتر گلیسرول بر روی نمونه گسترش تهیه گردید و و با لامل ۲٤×۲٤ میلی‌متری پوشانده شد. در ادامه با شمارش ۲۰۰ اسپرم برروی هر لام با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنت با بزگنمایی ٤۰۰x نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. اسپرم‌هایی که در ناحیه سر بطور کامل رنگ سبز فلئورسنت را به خود جذب کردند بعنوان اسپرم‌های با آکروزوم سالم و اسپرم‌هایی که رنگ فلئورسنت را به خود جذب نکردند و یا در نواحی محدودی رنگ جذب کردند بعنوان اسپرم‌های با آکروزوم آسیب‌دیده درنظر گرفته شدند. نکته قابل ذکر این است که تمامی مراحل فوق در محیط تاریک و بدور از نور انجام گرفت (اماموردی و همکاران ۲۰۱۳).

آنالیز آماری

نتایج حاصل از آزمایش در قالب طرح کامل‌تصادفی بوسیله نرم افزار SAS و با استفاده از Proc GLM آنالیز و سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از ارزیابی تحرک اسپرم در جدول ۱ نمایش داده شده است. همان‌طوریکه نتایج نشان می‌دهد پارامترهای تحرک کل (TM)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL)، سرعت در مسیر منحنی (VCL)، میانگین سرعت در مسیر (VAP) و تحرک عرضی سر (ALH) تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند، بطوریکه این اختلاف بین سطوح ۱، ۱/۵ و ۲ درصد لسیتین معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). این درحالیست که بین تیمارها در خصوص پارامترهایی مانند تحرک پیش‌رونده (PM)، راستی مسیر طی شده (STR)، درصد خطی بودن تحرک (LIN) و تناوب عرضی زنش (BCF) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

[1]Thiobarbituric acid
[2]Pisum sativum agglutinin

جدول ۱- تاثیر سطوح مختلف لسیتین‌سویا بر فراسنجه‌های تحرک اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

Table 1- The effect of different levels Soybean lecithin on sperm motility parameters after freezing-thawing process

Sperm motility parameters	Soybean lecithin			SEM
	% 1	% 1.5	% 2	
Total Motility (%)	56.8^{b}	62.6^{a}	53.6^{b}	1.373
Progressive Motility (%)	24.2	26.8	20.6	2.036
Average path velocity (µm s^{-1})	74.76^{ab}	78.72^{a}	71.07^{b}	1.533
Straight – line velocity (µm s^{-1})	59.16^{ab}	63.81^{a}	53.02^{b}	1.743
Curvilinear velocity (µm s^{-1})	123.53^{b}	134.47^{a}	113.25^{c}	0.950
Sperm track straightness (%)	79.33	81	74.87	2.814
Lateral head displacement (µm)	7.12^{ab}	8.05^{a}	6.34^{b}	0.386
Linearity (%)	47.90	47.44	46.81	1.342
Beat cross frequency (Hz)	23.90	24.73	23.72	1.403

Mean within same row with different superscripts differ (P< 0.05)

جدول ۲- تاثیر سطوح مختلف لسیتین‌سویا بر صفات ارزیابی اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

Table 2- The effect of different levels Soybean lecithin on sperm assessment parameters after freezing-thawing process

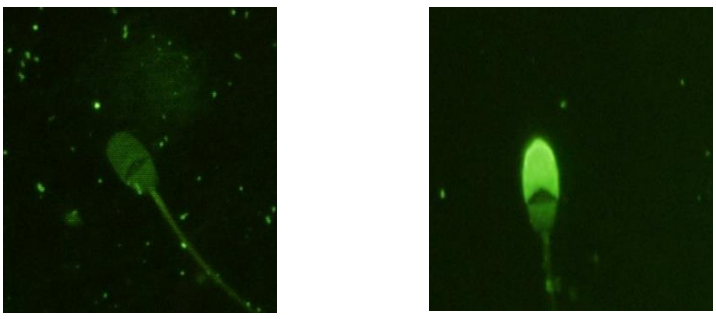
Sperm assessment parameters	Soybean lecithin			SEM
	% 1	% 1.5	% 2	
Viability (%)	62	66.4	61.8	3.022
Plasma membrane integrity (%)	52.4	53.2	49.2	3.283
Sperm abnormalities (%)	17.16	16.74	18.74	0.570
MDA (nmoL ML)	2.50	2.4	2.56	0.090

Mean within same row with different superscripts differ (P< 0.05)

نتایج نشان می‌دهد که هیچکدام از پارامترهای فوق تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند.

در رنگ‌آمیزی غشاء آکروزوم در صورت وجود یکپارچگی غشای آکروزومی بطور کامل سر اسپرم رنگ فلئورسنت را نتایج حاصل از بکارگیری سطوح مختلف لسیتین‌سویا بر روی فراسنجه‌های مختلف مانند زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، مورفولوژی و میزان پراکسیداسیون‌لیپید اسپرم در جدول ۲ نشان‌داده شده است.

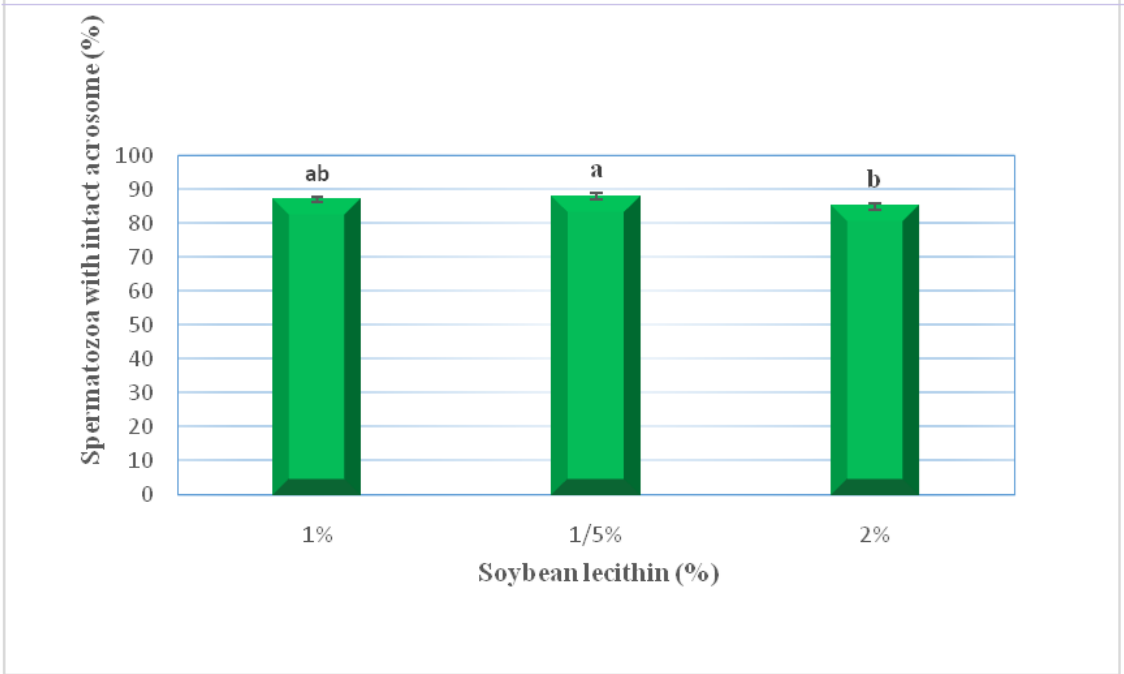
به خود گرفته و نورانی و در صورت عدم‌یکپارچگی تنها بخش کوچک و یا بطور کامل بی‌نور دیده می‌شود (تصویر ۱).



شکل ۱- سمت راست اسپرم با آکروزوم یکپارچه و سمت چپ اسپرم با آکروزوم غیریکپارچه

Figure 1- sperm acrosome integrated right and left non-integrated

ارزیابی‌ها نشان داد که یکپارچگی آکروزوم در بعد از فرآیند یخ‌گشایی تحت تاثیر سطوح مختلف لسیتین سویا قرار گرفت (شکل ۱)، و یکپارچگی غشاء آکروزوم در سطح ۱/۵ درصد لسیتین سویا بیشترین مقدار و در سطح ۲ درصد به کمترین مقدار رسید (P<۰/۰۵).



شکل ۱- تاثیر سطوح مختلف لستین سویا بر یکپارچگی آکروزوم اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

Figure 1- The effect of different levels of soybean lecithin on sperm intact acrosome after freezing-thawing process

بحث

در مطالعه حاضر، اثر رقیق کننده حاوی سطوح مختلف لسیتین سویا برای حفاظت اسپرم بعد از فرآیند انجماد یخ-گشایی مورد بررسی قرار گرفت. اخیرا ساخت رقیق‌کننده‌های دست‌ساز بر پایه لسیتین سویا در چندین مطالعه بررسی قرار گرفته است. نتایج تحقیق بر روی بز نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء آکروزومی بین سطوح ۱/۵ درصد لسیتین و ۱۵ درصد زرده تخم مرغ وجود نداشته و از نظر پارامترهای حرکتی اسپرم (VAP, VSL, VCL, ALH و LIN) سطح ۱ درصد و ۱/۵ درصد عملکرد بهتری نسبت به زرده تخم‌مرغ داشتند، همچنین غلظت MDA در هنگام استفاده از زرده تخم مرغ بالاتر بود (سلمانی و همکاران ۲۰۱٤). نتایج تحقیقات نشان داده که سطح ۱/۵ درصد لسیتین سویا بعنوان یک عامل محافظت‌کننده از سرما می‌تواند جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ باشد (شمس الهی و همکاران ۲۰۱۸ و سلمانی و همکاران ۲۰۱٤). در مطالعات گذشته نشان داده شده است که لسیتین احتمالا مانند یک لایه پوششی روی اسپرم قرار گرفته و موجب محافظت از آن در مقابل تنش‌های سرمایی می‌شود (آیرس و همکاران ۲۰۰۳). همچنین گزارش شده که رقیق‌کننده‌های بر پایه لسیتین سویا ویسکوزیته کمتری در مقایسه با رقیق‌کننده‌های بر پایه زرده تخم‌مرغ دارند (ژانگ و همکاران ۲۰۰۹). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تحرک‌کل و اغلب پارامترهای حرکتی اسپرم در گروه ۱/۵ درصد لسیتین‌سویا در مقایسه با سایر سطوح بیشتر می‌باشد. نتایج این تحقیق مشابه نتایج حاصل از تحقیقات قبلی توسط روف و همکاران (۲۰۱۲)، بر روی بز می‌باشد. نتایج حاصله نشان داد که

تحرک کل و سایر پارامترهای حرکتی در سطح ۱ درصد لسیتین سویا نسبت به سطح ۱/۵ درصد کمتر است. به نظر می رسد که کم بودن تحرک‌کل و سایر پارامترهای حرکتی اسپرم در سطح ۱ درصد لسیتین سویا احتمالا بخاطر ناکافی بودن غلظت لسیتین در محافظت از اسپرم باشد. همچنین نتایج نشان داد که در سطح ۲ درصد لسیتین سویا تحرک کل و برخی پارامترها کاهش پیدا کردند. کاهش در تحرک‌کل و برخی پارامترها در سطح ۲ درصد لسیتین سویا در مقایسه با سایر سطوح ممکن است بخاطر افزایش ویسکوزیته باشد. فروزانفر و همکاران (۲۰۱۰) پیشنهاد کردن که استفاده از ۲ درصد لسیتین سویا اثر سمی بر روی اسپرم دارد. موسی و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادن که یک کاهش معنی داری هنگام استفاده از غلظت های بالای LDL در فشار اسمزی صورت می گیرد و در نتیجه این امر سبب ایجاد رسوب در ترکیباتی مانند فروکتوز و نمک ها در رقیق کننده شده و این کاهش فشار اسمزی موجب اثرات مخرب بر روی اسپرم می شود. نتایج این تحقیق با نتایج حاصل از آزمایش وان و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت دارد. تحقیقات قبلی نشان داده که اسپرم درسطح ۱/۵ درصد لسیتین سویا نسبت به سایر سطوح دیگر بهترین تحرک را داشته است که دلیل آن میتواند غلظت بهینه لسیتین با ویسکوزیته و فشار اسمزی مناسب باشد (روف و همکاران ۲۰۱۲). همچنین ممکن است که اسپرم قادر به حرکت کردن آسان در این سطح بهینه از لسیتین سویا نسبت به سطوح دیگر باشد که می تواند منجر به بهبود خصوصیات جنبایی اسپرم شود. در این آزمایش تفاوت بین سطوح مختلف لسیتین‌سویا از نظر یکپارچگی غشاء پلاسمایی به لحاظ‌آماری معنی‌دار نبود اما مشاهده شده که بیشترین مقدار یکپارچگی غشاء مربوط به تیمار ۱/۵ درصد می باشد. از طرفی نشان داده شده است که یکپارچگی غشاء پلاسمایی با تحرک اسپرم مرتبط است (سلمانی و همکاران ۲۰۱۳). به نظر می‌رسد که اثر مثبت سطح ۱/۵ درصد بر تحرک‌کل و اغلب پارامترهای حرکتی به خاطر یکپارچگی بیشتر غشاء پلاسمایی اسپرم باشد. نتایج حاصله نشان داد که میزان زنده‌مانی، اسپرم‌های غیرطبیعی و میزان پراکسیداسیون لیپیدها در گروه ۱/۵ درصد لسیتین سویا وضعیت مطلوبت‌تری نسبت به سایر تیمارها داشت اما این تفاوت‌ها به لحاظ آماری معنی‌دار نبود. نشان داده شده که تولید ROS[1] در طی ذخیره‌سازی (آیتکن۱۹۹٤)، ویسکوزیته بالا (ویویانا و همکاران ۲۰۰۳) و سردسازی سبب بروز واکنش آکروزومی و در نتیجه خسارت‌های زیادی می‌شود. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که درصد اسپرم‌های با غشاء آکروزوم یکپارچه در گروه ۱/۵ درصد لسیتین‌سویا بیشتر از سایر گروه‌های آزمایش بود. این نتایج مشابه نتایج حاصل از آزمایش امام‌وردی و همکاران (۲۰۱۳) می‌باشد. بطورکلی یکپارچگی غشاءپلاسمایی یک امر ضروری برای نگهداری عملکرد اسپرم در دستگاه تولیدمثلی جنس ماده است. تخریب یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم باعث بهم‌خوردن انسجام لیپیدهای غشاء در طول فرآیند انجماد شده و متعاقبا منجر به مرگ سلول می‌شود (هولت ۱۹۹٤). نشان داده شده که فسفولیپیدهای LDL می‌توانند جایگزین برخی از فسفولیپیدهای غشاء پلاسمایی اسپرم شوند و باعث کاهش دمای فاز انتقالی (٦-) شوند (گراهام و فوت ۱۹۸۷). گراهام و فوت (۱۹۸۷) نشان دادن که فسفاتیدیل سرین به تنهایی و یا به همراه فسفاتیدیل کولین بهترین فسفولیپیدها برای محافظت از اسپرم می باشند. تحقیقات گذشته غلظت اپتیمم برای محافظت از اسپرم در حین انجماد را در دامنه های ۰/۸ درصد در سگ (کمنتا و همکاران ۲۰۱۱)، ۱ درصد در قوچ (فروزانفر و همکاران ۲۰۱۰)، انسان (رد و همکاران ۲۰۰۹) و گربه (ویک و همکاران ۲۰۱۰) و ۱/۵ درصد در بز (تاسدیمر

[1] - Reactive oxygen species

و همکاران ۲۰۱۳) ذکر کرده اند. این تفاوت‌ها ممکن است مربوط به تفاوت بین ترکیبات موجود در غشاء پلاسمایی گونه‌های مختلف باشد که در تعیین سطح مناسب غلظت لسیتین سویا جهت محافظت از اسپرم موثر باشند (بنچاریف و همکاران ۲۰۰۸). از طرفی در برخی از گونه‌ها مانند گاو نشان داده شده که ترکیبات پروتئینی موجود در پلاسمایی منی سبب خروج کلسترول از ترکیب غشاء پلاسمایی شده و این امر موجب تاثیر بر میزان لسیتین مورد نیاز جهت محافظت از اسپرم می شود (منجونات و همکاران ۲۰۰۲). شواهد نشان داده که LDL اثر مهمی در حفاظت از اسپرم در جریان انجماد دارد. پیشنهاد شده که اثر حفاظتی لسیتین سویا در نتیجه اثر متقابل بین پروتئین‌های پلاسمای منی و LDL می‌باشد (برگرون و منجونات ۲۰۰۶). هرچند که مکانیسم دقیق اثر لیستین‌سویا در حفاظت از غشاء هنوز بطورکامل شناسایی نشده است، اما پیشنهاد شده که اثر حفاظتی لسیتین‌سویا بخاطر جایگزینی آن با لیپیدهای از دست رفته غشاء در جریان انجماد و در نتیجه افزایش مقاومت اسپرم در برابر تنش‌های حرارتی می‌باشد (موسی و همکاران ۲۰۰۲). همچنین پیشنهاد شده که فسفولیپیدها می‌توانند به شکل یک پوشش اطراف غشاء سلول اسپرم را فراگرفته و از آن در برابر شوک سرمایی محافظت کنند (کوینن و چوو ۱۹۸۰).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد که لسیتین‌سویا در سطح ۱/۵ درصد شرایط بهتری را برای حفظ کیفیت اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد–یخ‌گشایی نسبت به سایر سطوح لسیتین‌سویا فراهم می‌کند.

منابع مورد استفاده

Aires VA, Hinsch KD, 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.

Aisen E, Medina V and Venturino A, 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. Theriogenology 57:1801-1808.

Aitken RJ, 1994. A free radical theory of male infertility. Reproduction Fertility and Development 6: 19-23.

Akhter S, Ansari M, Andrabi S, Rakha B, Ullah N and Khalid M, 2012. Soya-lecithin in Extender improves the Freezability and Fertility of Buffalo (Bubalus bubalis) Bull Spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals 47: 815–819.

Althouse GC, 2008. Sanitary procedures for the production of extended semen. Reproduction in Domestic Animals 43: 374–378.

Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL and Anton M, 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. Theriogenology 61: 895–907.

Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S and Delhomme G, 2008. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. Theriogenology 70: 1478-1488.

Bergeron A and Manjunath P, 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Molecular Reproduction and Development 73: 1338-1344.

De Paz P, Esteso MC, Alvarez M, Mata M, Chamorro CA and Anel L, 2010: Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. Theriogenology 74: 663–671.

Emamverdi M, Zhandi M, Zare Shahneh A, Sharafi M and 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.

Esterbauer H and Cheeseman KH. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in Enzymology 186: 407-421.

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

Graaf De, Evans SP, Gillan G L, Guerra MM, Maxwell WM and O'Brien JK, 2007. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. Theriogenology 67(2): 217-227.

Graham JK, and Foot RH, 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.

Hancock JL, 1956. The morphology of boar spermatozoa. Journal of the Royal Microscopical Society 76: 84-97.

Holt WV and North RD, 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.

Kmental S, Muller C, Schlosser F and Schafer-Somi S, 2011. Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. Theriogenology 75: 1095-1103.

Kopeika JE, Kopeika T, Zhang DM and Rawson WV, 2003. Detrimental effects of cryopreservation of loach (Misgurnus fossilis) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilized eggs in caffeine. Cryobiology 46: 43–52.

Manjunath P, Nauc V, Bergeron A and Menard M, 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. Biology of reproduction 67: 1250-1258.

Mazur P, Leibo SP and Seidel Jr, 2008. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions, Biology of Reproduction 78: 2–12.

Moussa M, Marinet 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.

Quinn PJ and Chow PYW, 1980. Evidence that phospholipids protect spermatozoa form cold shock at a plasma membrane site. Journal of Reproduction and Fertility 60: 403-407.

Reed ML, Ezeh PC, Hamic A, Thompson DJ and Caperton CL, 2009. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting post thaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. Fertility and Sterility 92: 1787-1790.

Revell SG and Mrode RA, 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science 36: 77-86.

Roof DJ, Bowley S, Price LL and Matsas DJ, 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. Theriogenology 77: 412-420.

Salamon S and Maxwell W, 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science 62: 77-112.

Salmani H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Towhidi A, Zare Shahneh A and Zhandi M, 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. Small Ruminant Research 112: 123–127.

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

Shamsollahi M, Daghigh Kia H, Moghaddam G and Taghizade A, 2018. Effects of centrifugation and different levels of soybean lecithin-based extender on post-thaw sperm quality of Ghezel ram semen. Iranian Journal of Applied Animal Science 8: 257-262.

Tasdemir U, Buyukleblebici S, Tuncer PB, Coskun E, Ozgurtas T and Aydın FN, 2013. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. Cryobiology 66: 38-42.

Van Wagtendonk-de Leeuw AM, HaringRM, Kalal LMTE and Dea Dass JHG, 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. Theriogenology 54: 57–67.

Vick M, Bateman H and Swanson W, 2010. Improved cryopreservation of domestic cat spermatozoa in a soy lecithin-based extender. Reproduction Fertility and Development 23: 153-154.

Viviana A, Hinsch KD, Muller-Schloesser F, Bogner K, Muller-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: 269-79.

Zhang SS, Hu JH, Li QW, Jiang ZL and Zhang XY, 2009. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. African Journal of Biotechnology 8: 6476-6480.

Effect of soybean Lecithin on quality, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activity and acrosome membrane integrity of ram sperm after freeze-thawing

M Shamsolahi[1], H Daghigh Kia[2*], Gh Moghaddam[2] and A Taghizadeh[2]

Received: June 10, 2017 Accepted: December 2, 2017
[1]PhD Graduated, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: daghighkia@tabrizu.ac.ir

Introduction: The use of cryopreserved semen in artificial insemination (AI) has numerous advantages for the animal husbandry, especially when used in breeding programs**.** Long-term storage of sperm in liquid nitrogen is a valuable technique for genetic resources preservation **(**Mazur et al., 2008**).** Animals are transported frequently and widely around the world, and it is necessary to create and maintain suitable conditions during animal transportation (Salamon and Maxwell, 2000). However, the costs, the risks of escape, and the potential for accidental death of animals are unavoidable. On the other hand, cryopreserved sperm can be transported in liquid nitrogen at a markedly lower cost and without the risk of escape or death of animals (Aires et al., 2003). Numerous investigations have been performed to improve the protocols for cryopreservation of sperm**.** The extenders used for semen cryopreservation protect the sperm against thermal shock, preserving both motility and fertility by promoting the stabilization of the plasma membrane, and providing energy substrates (Amirat et al., 2004). These attributes reduce the deleterious effects of changes in the pH and osmolarity, prevent the growth of bacteria, and protect the sperm cells from the damage caused by refrigeration, freezing, and thawing**.** For sperm cryopreservation, protocols using egg yolk have been successfully established and applied in various animal species (Aisen et al., 2002). However, the use of egg yolk in cryopreservation has been questioned, because of certain potential negative aspects. Egg yolk contains a wide variety of compounds that are both beneficial and also potentially harmful to sperm. Additionally, egg yolk introduces a risk of contamination by microbes that can subsequently produce endotoxins; and so, the egg yolk and sperm are subjected to quarantine inspection in the case of import or export**.** Therefore, a replacement for egg yolk with a well-defined chemical composition would be very advantageous. Lecithin, also known as phosphatidylcholine, is a component of egg yolk and is known to prevent cold shock during the freezing and thawing process in sperm cryopreservation. Soybean lecithin in particular has already been used as a replacement for egg yolk in sperm cryopreservation in various animals. Its non-animal origin and minimal sanitary risks make it preferable for this application. Soybean Lecithin can be used as an extender in the cryopreservation process (Akhter et al., 2012). The aim of this study was to evaluate the effects of Soybean Lecithin as extender on the ram semen quality after freeze-thawing.

Material and methods: Semen was collected from the indigenous Ghezel rams. Twenty five ejaculates were collected throughout the entire study, with semen being collected twice a week (every Sunday and Tuesday) from each ram, using the artificial vagina. Ejaculates were collected in graduated test tubes, placed in a thermo flask at 34°C, and transported to the laboratory for evaluation within 1h interval. The raw or fresh undiluted semen was then microscopically evaluated for volume, concentration, and sperm motility. The sperm concentration was determined with the aid of a neubauer lam. A Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) system was used to evaluate the different sperm motility characteristics. All data were analyzed using the statistical procedure of SAS (version 9.2). The analysis of variance (ANOVA) was used to test for significant differences between treatments. Characterization of the Ghezel ram sperm viability (percentage live/dead) of

the semen samples was determined using an eosin/nigrosin stain (50µl eosin/nigrosin and 5µl semen). The volume of the ram ejaculates ranged between 0.75 and 1.5mL. The sperm concentration recorded in this study ranged between 0.9 and 1.3 × 10^9 sperm/mL. The effect of different soybean lecithin levels on the Ghezel ram semen characteristics following cryopreservation was evaluated. After initial evaluation of the ejaculates, all ram ejaculates were pooled and semen sample was then divided into three portions; then, semen samples were diluted with soybean lecithin (1, 1.5 and 2 %) citrate extender and cooled over a period of 2h to 5°C. The semen samples were equilibrated for 2h and then loaded into 0.25mL semen straws. The straws were frozen in liquid nitrogen (LN2) vapor, then semen straws were plunged into the LN2 (-196°C). The semen straws were thawed 30 days later, in a water bath (37°C) for 30 seconds. The sperm characteristics included motility and motion parameters, viability, plasma membrane and acrosome integrity, sperm abnormality, and lipid peroxidation were evaluated. Motility and velocity were microscopically evaluated using the Sperm Class Analyzer® (CASA) system.

Results and discussion: This study demonstrated that soybean lecithin (1.5%) containing 7% glycerol can be used to cryopreserve Ghezel ram semen effectively, based on the sperm motility characteristics. The low sperm motility results recorded when semen was cryopreserved in soybean lecithin (2%). The results showed that total motility and some sperm motion parameters (VSL, VCL, VAP and ALH) were significantly higher in 1.5% lecithin soybean treatment group ($P < 0.05$). In terms of survival, the percentage of abnormal sperm, plasma membrane integrity, and lipid peroxidation were not significant between treatments. Acrosome membrane integrity of 1.5% soybean lecithin treatment group was higher than other treatments ($P < 0.05$).

Conclusions: Briefly, 1.5% soybean lecithin treatment had better performance than other levels on the quality of the sperm after freeze-thawing.

Keywords: Acrosome, Sperm, Freeze-thawing, Ram, Soybean lecithin