



Effect of different levels of soy lecithin nanoliposomes in extender on the quality of canine sperm after freeze-thawing

Touba Nadri ^{1✉} 

1. Corresponding Author, Department of Animal Science, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
E-mail: t.nadri@urmia.ac.ir

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	Cryopreservation imposes physical and chemical stress on sperm, resulting in decreased motility, viability, and overall quality. This study aimed to investigate the effect of different concentrations of soy lecithin nanoliposomes (1, 2, and 3%) on the quality of sperm from Sarabi dogs after freezing-thawing. Sperm collection was performed manually from three Sarabi dogs using hand stimulation and a suitable collection device in the presence of a female dog in heat to stimulate sexual desire. The evaluation parameters included sperm motility, abnormalities (Hancock), sperm membrane integrity (eosin-nigrosin), acrosome membrane integrity (PSA), and membrane activity (HAST) after the freezing-thawing process. The results of this study showed that the extender containing 2% lecithin nanoliposomes exhibited higher total motility (65.5 ± 1.8) compared to other nanoliposomal treatments, although this difference was not statistically significant compared to the control group (66.7 ± 1.8) ($P < 0.05$). The progressive motility results showed that the L2 group (55.5 ± 1.5) was significantly higher than the other groups, although it did not differ significantly from the control treatment (52.3 ± 1.5) ($P < 0.05$). Similarly, the highest percentage of integrity, membrane activity, and acrosome integrity was related to the 2% lecithin nanoliposomes treatment, which did not differ significantly from the control treatment ($P < 0.05$). Sperm abnormalities in this experiment were not significantly affected by the type of extender. Therefore, it seems that the use of the extender containing 2% lecithin Soy lecithin nanoliposomes can improve the properties of dog sperm after freeze-thaw.
Article history: Received: 22 December 2025 Received in revised form: 21 April 2026 Accepted: 27 April 2026 Published online: Autumn 2026	
Keywords: <i>Dog, Sperm, Egg yolk, Lecithin, Freezing, Nanoparticle, Liposome.</i>	

Cite this article: Nadri, T. (2026). Effect of different levels of soy lecithin nanoliposomes in extender on the quality of canine sperm after freeze-thawing. *Iranian Journal of Animal Science*, 57 (3), 497-507. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2026.408382.654114>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2026.408382.654114>

Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

Sperm cryopreservation has significantly improved assisted reproductive technologies (ART) and has enabled the conservation of endangered dog breeds (Dalmazzo et al., 2018; Nguyen et al., 2019). However, a major challenge in cryopreservation is the risk of contamination from animal-derived components such as egg yolk or milk, which are commonly used in extenders (Bousseau et al., 1998). Egg yolk is widely known as a cryoprotectant that lowers the freezing point of the medium and reduces the formation of ice crystals (Farstad, 2000). Based on this, we hypothesized that a soy lecithin nanoliposome-based diluent would demonstrate better efficacy for canine sperm cryopreservation compared to a traditional egg yolk-based diluent. The development of such an optimal extender could improve canine sperm cryopreservation protocols for artificial insemination. However, the underlying cellular mechanisms through which egg yolk or soy lecithin affects *in vivo* fertility potential in dogs have not yet been fully elucidated. Therefore, this study aimed to evaluate a comprehensive set of parameters, including motility, morphological abnormalities and plasma membrane integrity, acrosome membrane integrity, and membrane activity to evaluate the optimal cryopreservation extender. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of different concentrations of soy lecithin nanoliposome on the quality of frozen-thawed Sarabi dog sperm.

Materials and methods

Semen samples were collected from three healthy Sarabi dogs aged 3 to 4 years. Semen collection was performed manually by an experienced technician. To stimulate sexual desire, the samples were collected in the presence of a female dog in heat. Immediately after collection, each ejaculate was evaluated for color, volume, concentration, sperm motility, viability (plasma membrane integrity), morphology, and motility. Evaluation parameters included sperm motility, abnormalities (Hancock), sperm membrane integrity (eosin-nigrosin), acrosome membrane integrity (PSA), and membrane activity (HAST) after freeze-thaw.

Results and Discussion

The results of this study showed that the L2 and EY groups had the highest total mobility (65.5 ± 1.8 and 66.7 ± 1.8), which were significantly different from the L1 group (58.2 ± 1.8). Also, the results of progressive mobility showed that the L2 group (55.5 ± 1.5) was significantly higher than the other groups, although there was no significant difference with the control treatment (52.3 ± 1.5) ($P < 0.05$).

The results of eosin-nigrosin staining are given in Table 2. The results of this evaluation showed that the L2 treatments (69.5 ± 1.3) and the control group (62.1 ± 0.3) showed the highest cell membrane integrity, and no significant difference was observed between these two treatments ($P < 0.05$). The lowest percentage of cell membrane integrity was in the L3 group (53.1 ± 0.3), which showed a significant difference with the L2 and control groups ($P < 0.05$). The sperm acrosome integrity results are given in Table 2. This study showed that the treatment based on 2% soy lecithin nanoliposomes had the highest percentage of acrosome integrity (1.78 ± 2.2), which was significantly different from other nanoliposome-based treatments.

Conclusion

This study showed that an extender containing 2% lecithin nanoliposomes was highly effective for canine sperm cryopreservation. The positive results observed establish it as an effective plant-based alternative for canine sperm cryopreservation and cryopreservation protocols. Therefore, it appears that soy lecithin could be successfully used as a plant-based alternative to egg yolk-based extender in canine cryopreservation environments.

Author Contributions

Touba Nadri: Conceptualization, Validation, Methodology, Software, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft, Supervision, Formal analysis, Investigation.

Data Availability Statement

The data supporting the reported results are collected and used from published articles, to which we have referred in the manuscript.

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

اثر سطوح مختلف نانولیپوزوم لسیتین سویا در رقیق کننده بر کیفیت اسپرم سگ پس از انجماد-ذوب

طوبی ندری^۱ ✉^۱. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: t.nadri@urmia.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	انجماد اسپرم با ایجاد تنش‌های فیزیکی و شیمیایی موجب کاهش تحرک و زنده مانی و افت کیفیت اسپرم می‌شود. هدف از این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف نانولیپوزوم لسیتین سویا (۱، ۲ و ۳ درصد) بر کیفیت اسپرم سگ نژاد سرابی پس از انجماد-ذوب بررسی بود. اسپرم گیری از سه قلابه سگ نژاد سرابی به روش دستی با استفاده از تحریک دستی با استفاده از وسیله جمع آوری مناسب و در حضور یک سگ ماده فحل برای تحریک میل جنسی انجام شد. پارامترهای ارزیابی شامل تحرک اسپرم، ناهنجاری‌ها (هائوکوک)، یکپارچگی غشای اسپرم (اٹوزین- نیگروزین)، یکپارچگی غشای آکروزوم (PSA) و فعالیت غشاء (هاسست) پس از فرایند انجماد-ذوب بود. نتایج این مطالعه نشان داد که رقیق کننده حاوی ۲ درصد نانولیپوزوم لسیتین در مقایسه با سایر تیمارهای نانولیپوزومی جنبایی کل بالاتری ($65/5 \pm 1/8$) نشان داد اگرچه، در مقایسه با گروه کنترل ($66/7 \pm 1/8$) تفاوت معنی داری نشان نداد ($P < 0/05$). نتایج جنبایی پیشرونده نشان داد که گروه L2 ($55/5 \pm 1/5$) با اختلاف معنی داری بالاتر از سایر گروه‌ها بود اگرچه با تیمار کنترل تفاوت معنی داری نداشت ($52/3 \pm 1/5$) ($P < 0/05$). به طور مشابه، بالاترین درصد یکپارچگی، فعالیت غشاء و یکپارچگی آکروزوم مربوط به تیمار ۲ درصد نانولیپوزوم لسیتین بود که تفاوت معنی داری با تیمار کنترل نداشت ($P < 0/05$). ناهنجاری‌های اسپرم در این آزمایش به طور معنی داری تحت تأثیر نوع رقیق کننده قرار نگرفت. بنابراین، نانولیپوزوم لسیتین سویا با حفظ کیفیت اسپرم مشابه با زرده تخم مرغ، قابلیت استفاده به عنوان جایگزین بالقوه در رقیق کننده انجماد اسپرم سگ را نشان داد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۰۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۰۷ تاریخ انتشار: پاییز ۱۴۰۵	
کلیدواژه‌ها: سگ، اسپرم، زرده تخم مرغ، لسیتین، انجماد، نانوذرات، لیپوزوم.	

استناد: ندری، طوبی (۱۴۰۵). اثر سطوح مختلف نانولیپوزوم لسیتین سویا در رقیق کننده بر کیفیت اسپرم سگ پس از انجماد-ذوب. نشریه علوم دامی ایران، ۵۲ (۳)،DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2026.408382.654114> ۴۹۷-۵۰۷

© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2026.408382.654114>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

انجماد اسپرم به طور قابل توجهی فناوری‌های کمک باروری (ART) را بهبود بخشیده و امکان حفظ گونه‌های سگ که در معرض خطر انقراض هستند را فراهم کرده است (Dalmazzo et al., 2018; Nguyen et al., 2019). با این حال، یک چالش عمده در انجماد، خطر آلودگی ناشی از اجزای مشتق شده از حیوانات مانند زرده تخم مرغ یا شیر است که معمولاً در رقیق‌کننده‌ها استفاده می‌شوند (Bousseau et al., 1998). زرده تخم مرغ به طور گسترده به عنوان یک محافظ انجمادی شناخته می‌شود که نقطه انجماد محیط را کاهش داده و تشکیل کریستال‌های یخ را کاهش می‌دهد (Farstad, 2000). خواص مطلوب پلاسمای زرده تخم مرغ، از جمله فرآیند استخراج ساده آن و اثرات مشابه لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL)، آن را به جایگزینی مناسب برای زرده تخم مرغ کامل تبدیل می‌کند (Shah et al., 2017). در مقابل، لسیتین سویا، که عمدتاً از فسفاتیدیل کولین تشکیل شده است، از یکپارچگی غشای فسفولیپید در طول انجماد محافظت می‌کند (Agarwal et al., 2014) و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و آسیب رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهد تا زنده ماندن و تحرک پس از انجماد-ذوب را افزایش دهد (Nadri et al., 2022). اگرچه هم زرده تخم مرغ و هم لسیتین سویا منابع فسفولیپید هستند، اما ترکیبات بیوشیمیایی آنها به طور قابل توجهی متفاوت است. فسفولیپیدهای مشتق شده از سویا در مقایسه با اسیدهای چرب غیراشباع زرده تخم مرغ یا غشای اسپرم، حاوی غلظت بالاتری از اسیدهای چرب غیراشباع هستند که به طور بالقوه سیالیت غشاء و مقاومت در برابر شوک سرما را افزایش می‌دهند (Parks & Lynch, 1992).

پیشینه پژوهش

مطالعات قبلی یافته‌های متناقضی را در مورد اثربخشی این مواد محافظ انجماد در مایع منی سگ گزارش می‌دهند. در حالی که برخی تحقیقات نشان می‌دهد که لسیتین سویا نمی‌تواند جایگزین زرده تخم مرغ در رقیق‌کننده‌های تریس-سیترات-فروتوز برای سرد کردن اسپرم سگ شود (Nguyen et al., 2019)، مطالعات دیگر نشان می‌دهند که لسیتین سویا می‌تواند به طور مؤثر جایگزین زرده تخم مرغ در انجماد اسپرم سگ شود (Hermansson et al., 2021). نکته قابل توجه این است که ارزیابی‌های باروری در این تحقیقات کم بوده است. مطالعات مقایسه‌ای روی اسپرم خوک نشان داده است که ۲۰ درصد زرده تخم مرغ یا ترکیبی از ۱۰ درصد زرده تخم مرغ و ۳ درصد لسیتین برای انجماد اسپرم خوک توصیه می‌شود (Pearodwong et al., 2019). لسیتین سویا به عنوان یک جایگزین بالقوه مناسب و غیر حیوانی برای زرده تخم مرغ برای انجماد اسپرم سگ در نظر گرفته می‌شود. در حالی که مطالعات آزمایشگاهی قبلی از اثربخشی آن در حفظ کیفیت اسپرم پس از ذوب شدن پشتیبانی می‌کنند (Dalmazzo et al., 2018)، شواهد قطعی در مورد ظرفیت لقاح درون تنی آن همچنان ناکافی است و تحقیقات بیشتری را می‌طلبد (Dalmazzo et al., 2018). بر اساس این فرضیه ما این بود که یک رقیق‌کننده مبتنی بر نانولیپوزوم لسیتین سویا در مقایسه با یک رقیق‌کننده سنتی مبتنی بر زرده تخم مرغ، اثربخشی بهتری برای انجماد اسپرم سگ نشان می‌دهد. توسعه چنین رقیق‌کننده بهینه‌ای می‌تواند پروتکل‌های انجماد اسپرم سگ را برای تلقیح مصنوعی اصلاح کند. با این حال، مکانیسم‌های سلولی اساسی که از طریق آنها زرده تخم مرغ یا لسیتین سویا بر پتانسیل باروری درون تنی در سگ‌ها تأثیر می‌گذارند، هنوز به طور کامل روشن نشده‌اند. بنابراین، این مطالعه با هدف ارزیابی مجموعه‌ای جامع از پارامترها از جمله جنبایی، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و یکپارچگی غشای پلاسمایی، یکپارچگی غشای آکروزوم و فعالیت غشاء برای ارزیابی رقیق‌کننده انجمادی بهینه انجام شد. بنابراین هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف نانولیپوزوم لسیتین سویا بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده سگ نژاد سرابی بود.

روش شناسی پژوهش

لسیتین سویا از شرکت سیگما-آلدریج (St. Louis, MO, USA) خریداری شد و سایر مواد شیمیایی موجود در بافر از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شد.

نمونه اسپرم از سه قلاذه سگ نژاد سرابی سالم با سن ۳ تا ۴ سال جمع‌آوری شد. جمع‌آوری منی به صورت دستی توسط تکنسین باتجربه شد. برای تحریک میل جنسی، جمع‌آوری نمونه‌ها در حضور یک سگ ماده فحل انجام شد. بلافاصله پس از

جمع‌آوری، هر انزال از نظر رنگ، حجم، غلظت، تحرک اسپرم، زنده‌مانی (یکپارچگی غشای پلاسما)، مورفولوژی و تحرک ارزیابی شد. فقط نمونه‌های منی که معیارهای کیفی زیر را داشتند در مطالعه گنجانده شدند: تحرک $\leq 80\%$ ، غلظت $\leq 1.0 \times 10^6$ اسپرم در میلی‌لیتر و مورفولوژی غیرطبیعی $\geq 10\%$ درصد. این آزمایش دو بار در هفته و به مدت سه هفته تکرار شد.

رقیق‌کننده‌های بر پایه نانولیپوزوم لسیتین سویا با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ درصد (وزنی/حجمی) تهیه شدند که به ترتیب با L1، L2 و L3 مشخص شدند. گروه کنترل (رقیق‌کننده بر پایه تریس (g/۰.۲۵)، اسید سیتریک (g/۱.۶۷۵) و فروکتوز (g/۱.۲۵) و ۱۵٪ زرده تخم‌مرغ (EY) به صورت (حجمی/حجمی) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد. لیپوزوم‌ها با استفاده از روش فیلم نازک تهیه شدند. لسیتین سویا در ۵ میلی‌لیتر کلروفرم حل شد و محلول حاصل به مدت ۲ ساعت در دستگاه تبخیر چرخشی در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تحت خلاء قرار داده شد تا حلال تبخیر شود و یک لایه لیپیدی باقی بماند. نمونه‌ها به مدت یک شب در دستگاه دسیکاتور تحت خلاء قرار داده شدند تا کلروفرم باقیمانده حذف شود. لایه لیپیدی به تدریج با یک بافر مبتنی بر تریس هیدراته شد و امولسیون به آرامی به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تکان داده شد. سپس امولسیون به مدت ۲۰ دقیقه به دستگاه سونیکاتور (Topsonics، Mechanical Probe Sonicator، تهران، ایران) منتقل شد تا به اندازه ذرات مورد نظر به زیر ۱۰۰ نانومتر برسد و سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. میانگین قطر و ویژگی‌های فرمولاسیون نانولیپوزومی بر اساس پراکندگی نور پویا (DLS) توسط یک سیستم Zetasizer (Zeta Plus، Brookhaven Instruments Corp، Holtsville، نیویورک، ایالات متحده آمریکا) تعیین شد. ویژگی‌های نانولیپوزوم، شامل توزیع اندازه، شکل و تجمع ذرات، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM؛ Zeiss Em10C، Oberkochen، آلمان) و با استفاده از رنگ‌آمیزی منفی با ۱٪ اسید فسفوتنگستیک ارزیابی شدند.

منی به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق (حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به تعادل رسید (Dalmazzo et al., 2018). منی سرد شده در پایوت‌های فرانسوی ۰/۲۵ میلی‌لیتری (Biovet، L'Agile، France) با تراکم 5×10^7 اسپرم در میلی‌لیتر ریخته شد و سپس با پودر پلی‌وینیل الکل بسته شدند. پایوت‌ها به مدت ۱۲ دقیقه در معرض بخارات نیتروژن مایع، ۴ سانتی‌متر بالاتر از نیتروژن مایع، قرار گرفتند. متعاقباً، پایوت‌ها برای نگهداری در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. یخ‌گشایی نمونه‌ها به صورت جداگانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آب یخ‌زدایی و ارزیابی شدند.

پارامترهای حرکتی اسپرم با استفاده از آنالیزهای کامپیوتری (CASA; 12.3 CEROS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) ارزیابی شدند. تنظیمات دستگاه آنالیز کامپیوتری اسپرم در جدول ۱ آورده شده است. حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر نمونه تحت شرایط استاندارد و با حفظ دمای ثابت ۳۷ درجه سانتیگراد در طول آنالیز ارزیابی شدند. نسبت کل اسپرم‌های متحرک (TM٪) و اسپرم‌های متحرک پیش‌رونده (PM٪) اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، پارامترهای حرکتی زیر برای هر نمونه ارزیابی شدند: سرعت خط مستقیم (VSL، میلی‌متر بر ثانیه)، سرعت منحنی (VCL، میلی‌متر بر ثانیه)، سرعت متوسط مسیر (VAP، میلی‌متر بر ثانیه)، خطی بودن (LIN٪؛ محاسبه شده به صورت VSL/VCL)، فرکانس ضربدری (BCF، هرترز)، مستقیم بودن (STR، درصد؛ محاسبه شده به صورت VSL/VAP) و دامنه جابجایی جانبی سر (ALH، میلی‌متر).

یکپارچگی غشای اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین ارزیابی شد. فرآیند رنگ‌آمیزی شامل ترکیب ۱۰ میکرولیتر مایع منی با ۲۰ میکرولیتر رنگ روی یک اسلاید از قبل گرم شده و سپس حذف سریع رنگ با استفاده از اسلاید دوم بود. پس از خشک شدن، اسپرم‌های با غشای یکپارچه و مرده با میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی $400 \times$ بررسی شدند. اسپرم‌هایی که رنگ بنفش را نشان می‌دادند به عنوان غیر زنده طبقه‌بندی شدند، در حالی که اسپرم‌هایی که کاملاً فاقد رنگ بودند به عنوان زنده طبقه‌بندی شدند (Bucak et al., 2007).

جدول ۱. تنظیمات CASA
Table 1. The setting of CASA

Parameters	Set value
Frame Rate	50
Chamber Depth	20 μm
Magnification	200 X
Minimum contrast	60 Pixels
Minimum VCL mean	15 $\mu\text{m/s}$
Minimum STR mean	0.7 $\mu\text{m/s}$
Minimum ALH mean	0.3 $\mu\text{m/s}$

آزمایش تورم هیپواسموتیک (HOST)، بر اساس وجود دم‌های پیچ خورده اسپرم در معرض محلول هیپواسموتیک، برای ارزیابی عملکرد غشای پلاسمایی استفاده شد. این سنجش با انکوباسیون ۱۰ میکرولیتر مایع منی با ۱ میلی‌لیتر محلول ۱۰۰ میلی‌اسمول در لیتر (۵۷/۶ میلی‌مولار فروکتوز و ۱۹/۲ میلی‌مولار سیترات سدیم) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. مخلوط‌ها همگن شدند و متعاقباً با میکروسکوپ نوری معکوس با بزرگنمایی ۴۰۰ بررسی شدند، و حداقل ۲۰۰ اسپرم در حداقل پنج میدان میکروسکوپی مجزا ارزیابی شدند. درصد اسپرم‌های دارای دم پیچ خورده و خمیده ثبت شد.

یکپارچگی غشای آکروزوم با استفاده از آگلوتینین *Pisum sativum* (PSA) ارزیابی شد. ابتدا، ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم به ۱۰۰ میکرولیتر اتانول (با خلوص ۹۶٪) اضافه شد و ۱۵ دقیقه بعد، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم با ۳۰ میکرولیتر PSA روی یک لام شیشه‌ای مخلوط شد. ۲۰۰ اسپرم در هر لام با بزرگنمایی ۴۰۰ X با میکروسکوپ فلورسنت (BX51، Olympus) مجهز به نور فلورسانس و فیلتر FITC (تحریک در ۴۵۵-۵۰۰ نانومتر و انتشار در ۵۶۰-۵۷۰ نانومتر) مشاهده شدند. سر اسپرم‌هایی که رنگ سبز فلورسانس داشتند، به عنوان آکروزوم سالم در نظر گرفته شدند، در حالی که سر اسپرم‌هایی که رنگ فلورسانس نداشتند، به عنوان آکروزوم آسیب دیده ثبت شدند (Nadri et al., 2025).

ریخت شناسی در نمونه‌هایی شامل ۱۵ میکرولیتر نمونه اسپرم تثبیت شده در ۳۰۰ میکرولیتر محلول هانکوک تحت میکروسکوپ فاز کنتراست (CKX41؛ المپوس، ژاپن) با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر تجزیه و تحلیل شد. در مجموع ۲۰۰ اسپرم در هر نمونه برای تعیین درصد کل ناهنجاری‌های اسپرم، از جمله ناهنجاری‌های سر، سرهای جدا شده، نقص‌های قطعه میانی و ناهنجاری‌های دم، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 9.1, 2002, Cary, NC, USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از رویه UNIVARIATE بررسی گردید. به دلیل ماهیت سطوح تیمار، تحلیل داده‌ها بر اساس مقایسه تیمارها انجام گرفت. اثر تیمارها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) بررسی شد و در صورت معنی‌دار بودن، مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام گرفت. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین ارائه شدند.

مدل آماری برای تجزیه و تحلیل داده‌ها به صورت $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$ بود، که در آن Y_{ij} : مقدار هر مشاهده، μ : اثر میانگین، T_i : اثر تیمارهای آزمایشی، e_{ij} : اثرات باقیمانده.

یافته‌های پژوهش

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، نتایج این پژوهش بیانگر آن بود که تیمار L2 و گروه کنترل (EY) بیشترین میزان جنبایی کل را نشان دادند ($1/8 \pm 65/5$ و $1/8 \pm 66/7$) به‌طوری‌که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری با تیمار L1 داشتند ($1/8$).

$\pm 58/2$ داشتند. در خصوص جنبایی پیشرونده، تیمار L2 ($55/5 \pm 1/5$) مقدار بالاتری نسبت به سایر تیمارها نشان داد، با این حال تفاوت معنی داری بین این تیمار و گروه کنترل ($52/3 \pm 1/5$) ($P < 0/05$) مشاهده نشد. گروه با اختلاف معنی داری بالاتر از سایر گروهها بود اگرچه با تیمار کنترل تفاوت معنی داری نداشت سایر فراسنجه‌های حرکتی در این پژوهش تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفتند (جدول ۲).

جدول ۲. اثر سطوح مختلف نانولیپوزوم لسیترین سویا بر ویژگی‌های حرکتی و فراسنجه‌های سرعت اسپرم سگ پس از فرایند انجماد و ذوب، نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است ($P < 0/05$): L1: رقیق کننده حاوی ۱ درصد نانولیپوزوم لسیترین سویا، L2: رقیق کننده حاوی ۲ درصد نانولیپوزوم لسیترین سویا، L3: رقیق کننده حاوی ۳ درصد نانولیپوزوم لسیترین سویا، EY: رقیق کننده بر پایه ۱۵ درصد زرده تخم مرغ

Table 2. Effects of different levels of soy lecithin nanoliposomes on the kinematic parameters of post-thaw canine sperm. Results are mean $\pm$ SEM. Differing letters within a row indicate $P < 0.05$; L1: Extender containing of 1% soy lecithin nanoliposome, L2: Extender containing of 2% soy lecithin nanoliposome, L3: Extender containing of 3% soy lecithin nanoliposome, EY: 15% Egg yolk-based extender

Groups					
P-value	L3	L2	L1	EY	
>0.05	62.0 $\pm$ 1.8 ^{ab}	65.5 $\pm$ 1.8 ^a	58.2 $\pm$ 1.8 ^b	66.7 $\pm$ 1.8 ^a	Total motility (%)
>0.05	38.4 $\pm$ 1.5 ^c	55.5 $\pm$ 1.5 ^a	45.3 $\pm$ 1.5 ^b	52.3 $\pm$ 1.5 ^a	Progressive Motility (%)
NS	23.5 $\pm$ 1.9	25.2 $\pm$ 1.9	27.1 $\pm$ 1.9	27.4 $\pm$ 1.9	VSL (μm/s)
NS	62.0 $\pm$ 1.7	60.0 $\pm$ 1.7	62.5 $\pm$ 1.7	64.0 $\pm$ 1.7	VCL (μm/s)
NS	21.2 $\pm$ 1.4	24.1 $\pm$ 1.4	22.2 $\pm$ 1.4	25.7 $\pm$ 1.4	VAP (μm/s)
NS	54.4 $\pm$ 1.9	52.2 $\pm$ 1.9	50.0 $\pm$ 1.9	53.0 $\pm$ 1.9	STR (%)
NS	20.7 $\pm$ 1.5	21.4 $\pm$ 1.5	24.0 $\pm$ 1.5	25.7 $\pm$ 1.5	LIN (%)
NS	3.2 $\pm$ 0.4	3.4 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.4	3.3 $\pm$ 0.4	ALH (μm)

حروف غیر مشابه در ردیف‌ها نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در تیمارهای مختلف در سطح معنی داری ۵ درصد است. VSL: سرعت اسپرم در خط مستقیم، VCL: سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده، VAP: میانگین سرعت در مسیر مستقیم LIN: معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد، STR: معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد ALH: بیشترین دامنه حرکت‌های جانبی بر حسب میکرومتر،

همانطور که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است نتایج حاصل از رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین نشان داد که تیمار L2 بالاترین درصد درصد زنده مانی سلول ($65/5 \pm 1/7$) را به خود اختصاص داد به طوری که این مقدار تفاوت معنی داری با تیمارهای L1 و L3 تفاوت معنی داری (به ترتیب $59/3 \pm 1/7$ و $53/5 \pm 1/7$) داشت ($P < 0/05$). با این حال، تفاوت معنی داری بین تیمار L2 و گروه کنترل (EY) ($64/3 \pm 1/7$) مشاهده نشد.

نتایج حاصل از آزمون هاست در جدول شماره ۳ آورده شده است. بر اساس این نتایج، تیمار L2 ($69/5 \pm 1/3$) و گروه کنترل (EY) ($62/0 \pm 1/3$) بالاترین درصد فعالیت غشای پلاسمایی را نشان دادند، به طوری که تفاوت معنی داری بین این دو تیمار مشاهده نشد ($P < 0/05$). کمترین درصد فعالیت غشای پلاسمایی مربوط به تیمار L3 ($53/0 \pm 1/3$) بود که تفاوت معنی داری با تیمار L2 و گروه کنترل نشان داد ($P < 0/05$).

نتایج مربوط به یکپارچگی آکروزوم اسپرم نیز در جدول ۳ آورده شده است. یافته‌های این مطالعه نشان داد که تیمار حاوی ۲ درصد نانولیپوزوم لسیترین سویا (L2) بالاترین درصد یکپارچگی آکروزوم را ($78/1 \pm 2/2$) نشان داد، با این حال تفاوت معنی داری بین این تیمار و گروه کنترل (EY) ($75/7 \pm 2/2$) مشاهده نشد ($P < 0/05$).

نتایج حاصل از ارزیابی ریخت شناختی در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده از این ارزیابی نشان داد که از نظر ریخت شناختی، تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری با هم نداشتند ($P < 0/05$).

جدول ۳. اثر سطوح مختلف آلفا لیپوئیک اسید بر زنده مانی، یکپارچگی غشاء، یکپارچگی آکروزوم و ریخت شناختی اسپرم منجمد- ذوب شده سگ. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است ($P < 0.05$): L1: رقیق کننده حاوی ۱ درصد نانولیپوزوم لسیتین سویا، L2: رقیق کننده حاوی ۲ درصد نانولیپوزوم لسیتین سویا، L3: رقیق کننده حاوی ۳ درصد نانولیپوزوم لسیتین سویا، EY: رقیق کننده بر پایه ۱۵ درصد زرده تخم مرغ

Table 3. Effect of different levels of soy lecithin nanoliposomes on post-thaw canine sperm viability, membrane integrity, Acrosome integrity, and morphology. Results are mean $\pm$ SEM. ($P < 0.05$). L1: Extender containing of 1% soy lecithin nanoliposome, L2: Extender containing of 2% soy lecithin nanoliposome, L3: Extender containing of 3% soy lecithin nanoliposome, EY: 15% Egg yolk-based extender

Groups					
P-value	L3	L2	L1	EY	
>0.05	53.5 $\pm$ 1.7 ^c	65.5 $\pm$ 1.7 ^a	59.3 $\pm$ 1.7 ^b	64.3 $\pm$ 1.7 ^a	Vability (%)
>0.05	53.0 $\pm$ 1.3 ^c	69.5 $\pm$ 1.3 ^a	60.5 $\pm$ 1.3 ^b	62.0 $\pm$ 1.3 ^b	Cell membrane functionality (%)
>0.05	70.4 $\pm$ 2.2 ^b	78.1 $\pm$ 2.2 ^a	66.5 $\pm$ 2.2 ^b	75.7 $\pm$ 2.2 ^a	Morphology (%)
NS	80.7 $\pm$ 3.3	82.8 $\pm$ 3.3	82.4 $\pm$ 3.3	84.5 $\pm$ 3.3	Acrosome integrity (%)

حروف غیر مشابه در ردیف‌ها نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در تیمارهای مختلف در سطح معنی داری ۵ درصد است.

بحث

مطالعه حاضر درک ما را از نقش نانوذرات لسیتین سویا در حفظ خواص عملکردی اسپرم منجمد سگ افزایش می‌دهد. نتایج نشان داد که رقیق کننده حاوی ۲ درصد نانوذرات لسیتین سویا توانست جنبایی کل و پیشرونده اسپرم را پس از فرآیند انجماد-ذوب در سطحی مشابه گروه کنترل حفظ کند؛ به گونه‌ای که اگرچه مقادیر مشاهده شده در این تیمار نسبت به سایر گروه‌ها بالاتر بود، اما تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد. این یافته‌ها بیانگر اثر حفاظتی نانوذرات لسیتین سویا بر کیفیت اسپرم و عدم ایجاد اثر منفی بر پارامترهای حرکتی پس از انجماد-ذوب است. این نتایج با تحقیقات قبلی در گونه‌های همچون بز همسو است، که اثرات مشابهی بر حفظ اسپرم بین رقیق کننده‌های ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ و ۲ درصد نانوذرات لسیتین سویا گزارش شده است (Sun et al., 2020). این نتایج نشان می‌دهد که رقیق کننده‌های مبتنی بر لسیتین سویا ممکن است به عنوان جایگزین‌های مناسبی برای زرده تخم‌مرغ برای انجماد اسپرم در گونه‌های مختلف عمل کنند. مطالعات بیشتر، کاربرد امیدوارکننده رقیق کننده‌های مبتنی بر لسیتین سویا را در پروتکل‌های انجماد اسپرم بیشتر تأیید کرده‌اند (Beccaglia et al., 2009; Kmenta et al., 2011; Reed et al., 2009). مبنای فیزیولوژیکی این یافته‌ها ممکن است به خواص بیوشیمیایی غشای اسپرم و مکانیسم‌های محافظتی مواد محافظ انجماد نسبت داده شود.

در مطالعه حاضر، نتایج ارزیابی‌های یکپارچگی و فعالیت غشاء نشان داد که رقیق کننده بر پایه ۲ درصد نانولیپوزوم تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل وجود نداشت اما بالاترین درصد را نسبت به سایر تیمارهای حاوی نانولیپوزوم نشان داد. مطالعات نشان داده است که ترکیبات رقیق کننده می‌توانند بر ترکیب غشای اسپرم تأثیر بگذارند. این نشان می‌دهد که فسفولیپیدهای غشای اسپرم می‌توانند توسط ترکیب فسفولیپیدها موجود در رقیق کننده تغییر کنند. به نظر می‌رسد رقیق کننده برپایه نانولیپوزوم لسیتین، ترکیب متنوعی از فسفولیپیدها را برای غشای اسپرم فراهم می‌کند و بنابراین محافظت خوبی از غشای اسپرم را بعمل می‌آورد. غشای اسپرم حاوی غلظت‌های قابل توجهی از اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFA) است که انعطاف‌پذیری غشایی لازم برای لقاح موفقیت‌آمیز را فراهم می‌کند. با این حال، هنگامی که استرس اکسیداتیو آغاز می‌شود، این سیستم از طریق تشکیل هیدروپراکسیدها و سایر ترکیبات اکسیدکننده که واکنش‌های اکسیداتیو را منتشر می‌کنند، خودتقویت می‌شود (Dix & Aikens, 1993; Parks & Hammerstedt, 1985). تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که لسیتین سویا به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر عمل می‌کند و اثربخشی محافظتی آن به ویژه هنگامی که با سطوح بالای فسفاتیدیل کولین غنی می‌شود، افزایش می‌یابد (Judde et al., 2009).

(Nasir et al., 2007; al., 2003). با این حال، رقیق کننده های مبتنی بر لسیتین گاهی اوقات به خوبی رقیق کننده های مبتنی بر زرده عمل نمی کنند، احتمالاً به دلیل ترکیب فسفولیپید زرده تخم مرغ باشد. در مطالعه حاضر نیز رقیق کننده بر پایه ۲ درصد نانولیپوزوم تفاوت معنی داری با زرده تخم مرغ نداشت و در پارامترهای مورد بررسی در این مطالعه این دو رقیق کننده به خوبی سبب حفظ کیفیت اسپرم سگ پس از انجماد و یخ گشایی شدند.

در پژوهش حاضر، تیمار حاوی ۲ درصد نانولیپوزوم لسیتین سویا بالاترین درصد یکپارچگی آکروزوم را نشان داد و تفاوت معنی داری بین این تیمار و گروه کنترل مشاهده نشد که می تواند به دلیل خواص فسفولیپیدی لسیتین سویا باشد. لسیتین سویا حاوی فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل اتانول آمین، فسفاتیدیل اینوزیتول، اسید فسفاتیدیک، فسفاتیدیل سرین و لیزوفسفاتیدیل است. فسفولیپیدها به عنوان عناصر ساختاری اصلی غشای اسپرم عمل می کنند و به طور قابل توجهی در عملکرد اسپرم و فرآیندهای لقاح نقش دارند (Helmerich & Koehler, 2003). رویدادهای مرتبط با غشاء مانند واکنش آکروزومی و ادغام تخمک ها و اسپرم به این لیپیدها بستگی دارند که برای بقا، بلوغ و کارایی عملیاتی اسپرم بسیار مهم هستند (Tavilani et al., 2007). به دلیل آرایش قطبی-غیرقطبی (آمفی پاتیک)، این ترکیبات تمایل دارند خود را به صورت دولایه های لیپیدی ضروری، شبیه به غشاهای سلولی، آرایش دهند. نکته قابل توجه این است که هم زرده تخم مرغ و هم لسیتین به عنوان منابع فسفاتیدیل کولین عمل می کنند (Zhao et al., 2023). گزارش شده است که زرده تخم مرغ و سطوح کم لسیتین تأثیرات قابل توجهی بر عملکرد و تحرک میتوکندری دارند. در نتیجه، رقیق کننده بر پایه نانولیپوزوم لسیتین سویا می تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای زرده تخم مرغ در انجماد اسپرم سگ عمل کند (Dalmazzo et al., 2018; Zhao et al., 2023). در مطالعه ای نشان داده شده است که غلظت های بهینه لسیتین و زرده تخم مرغ در رقیق کننده به ترتیب ۱ و ۲۰ درصد است، که نشان می دهد لسیتین می تواند به عنوان جایگزینی برای زرده تخم مرغ عمل کند (Forouzanfar et al., 2010). علاوه بر این، رقیق کننده ی حاوی ۲۰ درصد پلاسمای زرده تخم مرغ و ۱ درصد لسیتین می تواند به عنوان جایگزینی مؤثر برای رقیق کننده های سنتی حاوی زرده تخم مرغ کامل عمل کند. همچنین نشان داده شده است که این ترکیب باعث افزایش باروری و نرخ جوجه درآوری می شود (Parks & Lynch, 1992; Pearodwong et al., 2019). با وجود تغییرات مشاهده شده در یکپارچگی غشای اسپرم، استفاده از نانولیپوزوم لسیتین در طول انجماد به دلیل خواص محافظتی آن توصیه می شود (Parks & Lynch, 1992). این مطالعه همچنین نشان داد که بین تیمارهای زرده و ۲ نانولیپوزوم لسیتین سویا از نظر درصد جنبایی و یکپارچگی و فعالیت غشاء تفاوت معنی داری وجود ندارد. این موضوع احتمالاً به دلیل شباهت های عمده در ترکیب فسفولیپید لسیتین و زرده تخم مرغ است. فسفاتیدیل کولین (PC) به عنوان فسفولیپید غالب در غشاهای داخلی و خارجی میتوکندری پستانداران عمل می کند. در مطالعه حاضر، افزایش غلظت نانولیپوزوم لسیتین سویا در رقیق کننده منجر به کاهش پارامترهای کیفیت اسپرم شد. پیشنهاد می کنیم که افزایش سطح خارج سلولی فسفاتیدیل کولین می تواند باعث ایجاد اختلاف بین محیط های درون سلولی و خارج سلولی شود. این عدم تعادل ممکن است عملکرد میتوکندری را مختل کند، در نتیجه کاهش عملکرد میتوکندری مشاهده شده با نسبت های بالاتر نانوذرات لسیتین های غنی از فسفاتیدیل کولین را توضیح می دهد.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که استفاده از رقیق کننده حاوی ۲ درصد نانولیپوزوم لسیتین سویا توانایی حفظ کیفیت اسپرم سگ پس از فرآیند انجماد-ذوب را در سطحی مشابه رقیق کننده حاوی زرده تخم مرغ دارد. عدم مشاهده تفاوت معنی دار بین تیمارهای حاوی نانولیپوزوم و گروه کنترل نشان دهنده اثر حفاظتی نانولیپوزوم ها و عدم ایجاد اثر منفی بر پارامترهای کیفی اسپرم، از جمله تحرک، مورفولوژی، زنده ماندن و یکپارچگی غشایی است. بر این اساس، نانولیپوزوم لسیتین سویا می تواند به عنوان یک جایگزین بالقوه بر پایه منابع گیاهی برای رقیق کننده های حاوی زرده تخم مرغ در پروتکل های سردسازی و انجماد اسپرم سگ مطرح شود و گزینه ای قابل قبول برای کاربرد در فناوری های کمک باروری در سگ باشد.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & Du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health*, 32(1), 1-17. DOI: [10.5534/wjmh.2014.32.1.1](https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1)
- Beccaglia, M., Anastasi, P., & Luvoni, G. (2009). Freezing of canine semen in an animal-free protein extender. *Veterinary Research Communications*, 33, 77-80 . DOI: [10.1007/s11259-009-9249-9](https://doi.org/10.1007/s11259-009-9249-9)
- Bousseau, S., Brillard, J., Marquant-Le Guenne, B., Guerin, B., Camus, A., & Lechat, M. (1998). Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 50(5), 699-706 .DOI: [10.1016/s0093-691x\(98\)00175-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00175-7)
- Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varışlı, Ö., Yüce, A., Tekin, N., & Akçay, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, 67(5), 1060-1067 . DOI: [10.1016/j.theriogenology.2006.12.004](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.004)
- Dalmazzo, A., Losano, J. D. A., Rocha, C. C., Tsunoda, R. H., Angrimani, D. d. S. R., Mendes, C. M., Assumpção, M. E. O. D. Á., Nichi, M., & Barnabe, V. H. (2018). Effects of soy lecithin extender on dog sperm cryopreservation. *Animal biotechnology*, 29(3), 174-182 . DOI: [10.1080/10495398.2017.1334662](https://doi.org/10.1080/10495398.2017.1334662)
- Dix, T. A., & Aikens, J. (1993). Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chemical research in toxicology*, 6(1), 2-18 . <https://doi.org/10.1021/tx00031a001>
- Farstad, W. (2000). Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53(1), 175-186 .Doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00250-2
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H., & Nasr-Esfahani, M. (2010). In vitro comparison of egg yolk–based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 73(4), 480-487 . DOI: [10.1016/j.theriogenology.2009.10.005](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.005)
- Helmerich, G., & Koehler, P. (2003). Comparison of methods for the quantitative determination of phospholipids in lecithins and flour improvers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(23), 6645-6651 . <https://doi.org/10.1021/jf0345088>
- Hermansson, U., Johannisson, A., & Axné, E. (2021). Cryopreservation of dog semen in a Tris extender with two different 1% soybean preparations compared with a Tris egg yolk extender. *Veterinary Medicine and Science*, 7(3), 812-819 . DOI: [10.1002/vms3.445](https://doi.org/10.1002/vms3.445)
- Judde, A., Villeneuve, P., Rossignol-Castera, A., & Le Guillou, A. (2003). Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(12), 1209-1215 . <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0844-4>
- Kmenta, I., Strohmayer, C., Müller-Schlösser, F., & Schäfer-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(6), 1095-1103 . DOI: [10.1016/j.theriogenology.2010.11.018](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.018)
- Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Riazi, G., Sharafi, M., Zhandi, M., Kastelic, J., & Gholami, D. (2022). Supplementation of freezing medium with encapsulated or free glutathione during cryopreservation of bull sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(5), 515-523 . DOI: [10.1111/rda.14088](https://doi.org/10.1111/rda.14088)
- Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Riazi, G., Sharafi, M., Gholami, D., Riazi, GH., & Martínez-Pastor, F. (2025). Impact of particle size of nanoliposomes on the biological response of frozen-thawed sperm in Holstein bulls. *Cryobiology*, Volume 118, 105208. DOI.org/10.1016/j.cryobiol.2025.105208.
- Nasir, M. I., Bernards, M. A., & Charpentier, P. A. (2007). Acetylation of soybean lecithin and identification of components for solubility in supercritical carbon dioxide. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(5), 1961-1969 . DOI: [10.1021/jf061883z](https://doi.org/10.1021/jf061883z)

- Nguyen, V. V., Ponchunchoovong, S., Kupittayanant, S., & Kupittayanant, P. (2019). Effects of egg yolk and soybean lecithin on sperm quality determined by computer-assisted sperm analysis and confocal laser scanning microscope in chilled canine sperm. *Veterinary Medicine and Science*, 5(3), 345-360 . DOI: [10.1002/vms3.158](https://doi.org/10.1002/vms3.158)
- Parks, J. E., & Hammerstedt, R. H. (1985). Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod*, 32(3), 653-668 . DOI: [10.1095/biolreprod32.3.653](https://doi.org/10.1095/biolreprod32.3.653)
- Parks, J. E., & Lynch, D. V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29(2), 255-266 . DOI: [10.1016/0011-2240\(92\)90024-v](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90024-v)
- Pearodwong, P., Suwimonteerabutr, J., Rungruangsak, J., & Tummaruk, P. (2019). Comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of boar semen . DOI: orcid.org/0000-0001-7000-4371
- Reed, M. L., Ezech, P. C., Hamic, A., Thompson, D. J., & Caperton, C. L. (2009). Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. *Fertility and sterility*, 92(5), 1787-1790 . DOI: [10.1016/j.fertnstert.2009.05.026](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.026)
- Shah, S. A. H., Andrabi, S. M. H., Ahmed, H., & Qureshi, I. Z. (2017). Chicken egg yolk plasma in tris-citric acid extender improves the quality and fertility of cryopreserved water buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Theriogenology*, 89, 32-40 . DOI: [10.1016/j.theriogenology.2016.10.009](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.009)
- Sun, L., Fan, W., Wu, C., Zhang, S., Dai, J., & Zhang, D. (2020). Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology*, 92, 146-150 . DOI: [10.1016/j.cryobiol.2019.12.004](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.12.004)
- Tavilani, H., Doosti, M., Nourmohammadi, I., Mahjub, H., Vaisiraygani, A., Salimi, S., & Hosseinipana, S. M. (2007). Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic males. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 77(1), 45-50 . DOI: [10.1016/j.plefa.2007.07.001](https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.07.001)
- Zhao, F., Li, R., Liu, Y., & Chen, H. (2022). Perspectives on lecithin from egg yolk: Extraction, physicochemical properties, modification, and applications. *Frontiers in nutrition*, 9, 1082671 . <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1082671>