تولیدات دامی
دوره ۱۸ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۵
صفحه‌های ۳۷۵-۳۶۷

بررسی تأثیر مصرف لسیتین سویا در رقیق‌کننده تریس بر کیفیت و ماندگاری اسپرم قوچ

معصومه منطقی[1*]، مرتضی مموئی[2]، صالح طباطبائی وکیلی[3]، جمال فیاضی[3]، خلیل میرزاده[4]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز – ایران

۲. استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز – ایران

۳. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز – ایران

۴. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز – ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۴/۰۳/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۹/۲۴

چکیده

تأثیر استفاده از مقادیر مختلف لسیتین سویا به جای زرده تخم مرغ برای محافظت از اسپرماتوزوئید قوچ در زمان یک ساعت پس از اسپرم‌گیری و نیز ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ذخیره کردن منی در پنج درجه سانتی‌گراد بررسی شد. از ۱۰ رأس قوچ با سن دو تا سه سال و میانگین وزن (۴±)۶۴ کیلوگرم، هفته‌ای یک بار به مدت هشت هفته اسپرم‌گیری شد. نمونه‌ها مخلوط و به چهار قسمت مساوی تقسیم شد. هر قسمت با یکی از رقیق‌کننده‌های پایه تریس و چهار تیمار حاوی ۰/۵، یک و ۱/۵ درصد لسیتین سویا و ۱۴ درصد زرده تخم‌مرغ رقیق شده و درصد تحرک، زنده‌مانی، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و سلامت غشای اسپرم و نیز pH منی در آن‌ها تعیین شد. نتایج نشان داد که میزان تحرک و زنده‌مانی اسپرم در زمان اول در تیمار ۱/۵ درصد لسیتین سویا بهتر بود (P<۰/۰۵). در زمان ۴۸ ساعت پس از ذخیره کردن در تیمارهای یک و ۱/۵ درصد لسیتین سویا زنده‌مانی اسپرم در مقایسه با زرده تخم‌مرغ بهتر بود (P<۰/۰۵). به‌طورکلی، لسیتین سویا یک جایگزین مناسب برای زرده تخم‌مرغ بوده و موجب بهبود کیفیت مایع منی در زمان‌های مورد مطالعه می‌شود. باتوجه به محدودیت‌های موجود در استفاده از زرده تخم‌مرغ به عنوان یک منبع حیوانی در رقیق‌کننده قوچ، استفاده از لسیتین سویا به عنوان یک منبع گیاهی پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: رقیق‌کننده منی، زنده‌مانی اسپرماتوزوئید، کیفیت اسپرم، لسیتین، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی

* نویسنده مسئول Email: manteghi.ma@yahoo.com

مقدمه

ذخیره کردن منی مهم‌ترین مرحله در تلقیح مصنوعی است و هدف طولانی کردن طول عمر اسپرماتوزوئیدها در درجه حرارت کم می‌باشد، زیرا اسپرماتوزوئید قوچ در دمای اتاق سریعاً از بین رفته و درنتیجه امکان انتقال آن به مناطق دوردست ممکن نیست. باتوجه به فاصله زمانی بین اسپرم‌گیری و تلقیح مصنوعی، داشتن یک محیط مناسب برای ذخیره کردن مایع منی به عنوان رقیق‌کننده نیاز است، زیرا رقیق‌کننده شرایطی را فراهم می‌کند که اسپرماتوزوئید شرایط غیرطبیعی مرتبط با نگهداری و تلقیح مصنوعی را تحمل کند [۱۰].

رقیق‌کننده‌ها علاوه بر اینکه اسپرم را هنگام خنک کردن محافظت می‌کنند، مواد مغذی مورد نیاز برای متابولیسم اسپرم را تأمین نموده و از تغییرات pH جلوگیری می‌کنند. زرده تخم‌مرغ یک جزء اصلی رقیق‌کننده مورد استفاده برای ذخیره کردن و انجماد مایع منی حیوانات اهلی نظیر گاو، قوچ، بز و خوک است و با تأثیر بر غشای سلولی، اسپرماتوزوئید را در برابر شوک سرما محافظت می‌کند [۱۱]. به علت مشکلات حاصل از رقیق‌کننده‌های با منشأ حیوانی (نظیر زرده تخم‌مرغ) از قبیل وجود آلودگی میکروبی و انتقال بیماری، متغیر بودن ترکیبات آن ها، دشواری مشاهدات میکروسکوپی و ظرفیت‌دار شدن زودهنگام اسپرماتوزوئید، تمایل به عدم استفاده از زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده‌ها وجود دارد. بخش مؤثر زرده تخم‌مرغ، لیپوپروتئین‌های با چگالی کم (LDL) می‌باشد که به طور عمده حاوی لسیتین (فسفاتیدیل کولین) است [۸]. جایگزین کردن کامل یا قسمتی از زرده تخم‌مرغ با لسیتین حاصل از منبع گیاهی (نظیر دانه سویا) برای حفاظت از مایع منی حیوان مورد توجه می‌باشد. هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر استفاده از مقادیر مختلف لسیتین سویا در رقیق‌کننده منی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ در شرایط مایع می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰ رأس قوچ نژاد عربی با سن دو تا سه سال و متوسط وزن (۴±)۶۴ کیلوگرم تحت شرایط یکنواخت تغذیه‌ای نگهداری شدند. از قوچ‌ها از طریق تحریک الکتریکی با دستگاه الکترواجاکولاتور به مدت هشت هفته و هفته‌ای یک نوبت اسپرم‌گیری شد. منی قوچ‌های مختلف با یکدیگر مخلوط و برای آزمایش استفاده شد. در هر هفته، مخلوط مایع منی به چهار قسمت مساوی تقسیم شدند و به نسبت یک به ۱۰ با مواد ذیل به صورت چهار تیمار رقیق شدند: تیمار یک (T_1) محیط پایه تریس (شامل ۳/۶ گرم تریس، ۰/۵ گرم فروکتوز، ۱/۹۹ گرم اسیدسیتریک، ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) به اضافه ۱۴ درصد زرده تخم مرغ، تیمار دو (T_2) محیط پایه تریس به اضافه ۰/۵ درصد لسیتین سویا، تیمار سه (T_3) محیط پایه تریس به اضافه یک درصد لسیتین سویا، تیمار چهار (T_4) محیط پایه تریس به اضافه ۱/۵ درصد لسیتین سویا. لوله‌های حاوی نمونه‌های مایع منی رقیق شده در حمام آب گرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در یخچال با دمای پنج درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۴۸ ساعت نگهداری شدند. نمونه‌های رقیق‌شده مربوط به تیمارهای آزمایشی در زمان‌های صفر (یک ساعت پس از اسپرم‌گیری و نگهداری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و نیز ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از نگهداری در دمای پنج درجه سانتی‌گراد از نظر فراسنجه‌های کیفی اسپرماتوزوئید (شامل درصد تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی، سلامت غشای پلاسمایی و pH) ارزیابی شد.

ارزیابی تحرک پیشرونده اسپرم‌ها به روش Subjective (با مقیاس صفر تا ۱۰۰) و با قرار دادن پنج میکرولیتر از منی رقیق شده روی لام با دمای ۳۷ سانتی‌گراد و گذاشتن یک لامل بر روی آن انجام شد. درصد تحرک اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰X در سه

میدان دید تخمین زده و در انتها میانگین حاصل از این سه تخمین به‌عنوان درصد تحرک پیش‌رونده ثبت شد. برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین-نیگروزین استفاده گردید. مواد تشکیل‌دهنده این محیط شامل رنگ ائوزین (۱/۶۷ گرم در لیتر)، رنگ نیگروزین (۱۰۰ گرم در لیتر) و سیترات سدیم (۲۹ گرم در لیتر) می‌باشد. اساس رنگ‌آمیزی بدین صورت است که رنگ ائوزین به داخل اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند، درحالی‌که اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای انجام این رنگ‌آمیزی، ۲۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم بر روی لام قرار گرم گرفت و ۲۰ میکرولیتر از رنگ آماده شده ائوزین-نیگروزین به آن افزوده شد. سپس با سمپلر به آرامی نمونه را به هم زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ۳۰ ثانیه، ۲۰ میکرولیتر از نمونه را برداشته و بر گوشه لام دیگری گذاشته و با یک لام دیگر روی لام به آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن، لام را زیر میکروسکوپ نوری دو چشمی (Olympus Cx21, Japan) قرار داده و تحت بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰X و با استفاده از روغن ایمرسیون حداقل تعداد ۲۰۰ اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کم رنگ به خود گرفته یا تنها بخشی از گردن آن ها رنگ گرفته بود، به عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شد. برای ارزیابی درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم از لام‌های رنگ‌آمیزی شده با ائوزین - نیگروزین استفاده شد. تحت بزرگ‌نمایی ×۱۰۰۰ میکروسکوپ حداقل تعداد ۲۰۰ اسپرم زنده در میدان‌های میکروسکوپی مختلف در هر نمونه مورد ارزیابی قرارگرفته و سپس میزان اسپرم‌های ناهنجار مشاهده شده برحسب درصد بیان گردید. برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم نقایصی چون سر جدا شده، قطره سیتوپلاسمی دور، دم پیچ‌خورده، سر باریک و سر بزرگ مدنظر قرار گرفت. برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم (HOST) از محلول هیپواسموتیک استفاده شد. واکنش اسپرم‌ها به محیط هیپواسمول به صورت تورم دم می‌باشد. در این حالت، اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالمی دارند به محلول واکنش نشان می‌دهند، ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. برای ارزیابی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم، پنج میکرولیتر از نمونه اسپرم با ۵۰ میکرولیتر از محلول هایپواسمتیک (۰/۷۳۵ گرم سیترات سدیم دی‌هیدرات و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH =۷) مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه آون با دمای ۳۷ قرار گرفت. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰X، حداقل در پنج میدان دید ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی شد. اسپرم‌های دارای دم متورم و پیچ‌خورده به عنوان پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌های با دم بدون تورم به عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی ناسالم) درنظر گرفته شدند. برای ارزیابی pH از دستگاه pH متر قلمی دیجیتال (مدل ۸۶۸۵، ساخت چین) استفاده شد. برای ارزیابی pHابتدا مقداری از هر نمونه برداشته و با وارد کردن الکترود در هر کدام از نمونه‌ها و ثابت شدن عدد روی صفحه دیجیتال میزان pH هر کدام از نمونه‌ها بررسی شد (بعد از اندازه‌گیری هر نمونه الکترود با آب مقطر شستشو داده شد).

داده‌های حاصل با استفاده از رویه جی ال ام نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۳) (۲۰۰۵) برای مدل ۱ تجزیه و میانگین‌ها به کمک آزمون دانکن مقایسه شدند:

$$y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$ رابطه (۱)

در این رابطه، y_{ij} مشاهدات مربوط به صفات، μمیانگین کل مشاهدات، e_{ij}اثر تصادفی باقیمانده و t_iاثر تیمار می‌باشد.

نتایج و بحث

جایگزینی ۱/۵ درصد لسیتین سویا با زرده تخم مرغ باعث بهبود میزان تحرک اسپرم در زمان اول (یک ساعت پس از

اسپرم گیری) شد (P<۰/۰۵) (جدول ۱). در این زمان، بین سطوح مختلف لسیتین سویا تفاوت معنی‌داری ازنظر تحرک اسپرم وجود نداشت. همچنین، تفاوت معنی‌داری بین سطوح لسیتین ۰/۵ و یک با زرده تخم‌مرغ مشاهده نشد. تحرک در همه تیمارها با افزایش زمان به‌طور معنی-داری کاهش پیدا کرد (P<۰/۰۵)، اما این کاهش در لسیتین ۱/۵ و زرده در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شروع نگهداری تفاوت معنی‌داری نداشت.

جدول ۱. میانگین درصد تحرک پیشرونده اسپرم قوچ طی زمان‌های مختلف نگهداری منی به حالت مایع

تیمار	زمان اول	زمان دوم	زمان سوم
زرده تخم‌مرغ	$۸۱/۷ \pm ۲/۸^{bA}$	$۶۸/۳ \pm ۴/۰^{aB}$	$۶۱/۷ \pm ۴/۲^{aB}$
لسیتین ۰/۵	$۸۵/۰ \pm ۲/۲^{abA}$	$۷۱/۰ \pm ۱/۶^{aB}$	$۶۲/۵ \pm ۳/۸^{aC}$
لسیتین ۱	$۸۸/۳ \pm ۲/۱^{abA}$	$۷۴/۳ \pm ۱/۱^{aB}$	$۶۶/۷ \pm ۳/۶^{aC}$
لسیتین ۱/۵	$۹۰/۵ \pm ۱/۹^{aA}$	$۷۷/۲ \pm ۲/۸^{aB}$	$۷۰/۰ \pm ۳/۶^{aB}$
SEM	۱/۱	۱/۹	۲/۲

a-b: تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف متفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).
A-B: تفاوت میانگین‌ها در هر ردیف با حروف متفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).
SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها
زمان‌های اول، دوم و سوم به ترتیب یک، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار است.

در تحقیق حاضر، درصد تحرک اسپرم در رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ درصد لسیتین سویا در مقایسه با دیگر تیمارها بالاتر بود که این نتایج مشابه با گزارشات ارائه شده در بحث انجماد مایع منی گوسفند بوده است [۷]. تحرک پیش‌رونده اسپرم در سطوح پایین‌تر لسیتین سویا (۱/۵ درصد) در مقایسه با سطح ۱/۵ درصد لسیتین کاهش معنی‌داری نداشت. این امر در حالی است که در مطالعاتی که بر روی انجماد مایع منی گوسفند و بز انجام گرفته بود، گزارش کردند که سطح ۱/۵ درصد لسیتین سویا نسبت به سایر رقیق‌کننده‌ها بالاترین تحرک را داشت که دلیل آن می‌تواند غلظت بهینه لسیتین با ویسکوزیته و فشار اسمزی مناسب و همچنین ذرات ریز باقیمانده کمتر باشد [۷، ۱۲].

علاوه بر این، اسپرم ممکن است قادر به شنا کردن آسان در این رقیق‌کننده منی حاوی سطح بهینه لسیتین سویا نسبت به سایر رقیق کننده‌ها باشد که می‌تواند منجر به خصوصیات جنبایی بهتر اسپرم شود [۵]. استفاده از سطوح پایین‌تر لسیتین (۰/۵ و ۱ درصد) در مقایسه با سطح ۱/۵ درصد آن باعث کاهش تحرک اسپرم شد که این نتایج را به قدرت حفاظتی پایین سطوح کمتر آن مرتبط ساختند [۱۴] و مشخص شد تحرک در همه رقیق‌کننده‌ها با افزایش زمان به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. آسیب‌های ساختاری و غیرساختاری غشاء به علت نگهداری در سرما و کاهش فسفریلاسیون پروتئین آکسونم طی نگهداری در سرما می-توانند از دلایل کاهش جنبایی اسپرم باشند [۴].

در زمان اول (یک ساعت پس از اختلاط اسپرم با رقیق‌کننده)، اختلاف معنی‌داری بین رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح مختلف لسیتین سویا مشاهده نشد (جدول ۲)، ولی بالاترین زنده‌مانی در این زمان مربوط به لسیتین ۱/۵ درصد بود که میانگین درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها در این سطح (۹۲/۱۷) بود. بین تیمارهای مختلف لسیتین سویا به‌جز تیمار ۱/۵ درصد با زرده تخم‌مرغ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. تیمار ۱/۵ درصد لسیتین سویا توانسته است به‌طور معنی‌داری باعث حفظ و افزایش زنده‌مانی اسپرم در زمان اول نسبت به زرده تخم‌مرغ شود (P<۰/۰۵). در زمان دوم (۲۴ ساعت پس از نگهداری در دمای پنج درجه سانتی‌گراد) کمترین درصد زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده لسیتین سویا ۰/۵ درصد (۶۳/۳۳ درصد) مشاهده شد که با سایر تیمارها دارای تفاوت معنی‌داری بود (P<۰/۰۵). در این زمان، درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ عربی در سایر تیمارهای لسیتین و زرده از نظر آماری متفاوت نبود. با گذشت ۴۸ ساعت پس از نگهداری بین تیمارهای لسیتین ۰/۵ (۷۱/۸۳ درصد) و لسیتین یک (۷۶/۳۳ درصد) اختلاف معنی‌داری از نظر درصد زنده‌مانی اسپرم با تیمار لسیتین ۱/۵ (۷۶/۸۳ درصد) وجود نداشت. تفاوت معنی‌داری بین لسیتین نیم با زرده تخم مرغ در این زمان مشاهده نشد. میزان زنده‌مانی اسپرم در سطوح ۱ و ۱/۵ درصد لسیتین سویا در مقایسه با زرده تخم‌مرغ دارای تفاوت معنی‌داری بود (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که سطوح مذکور لسیتین باعث افزایش معنی‌دار زنده‌مانی اسپرم در مقایسه با زرده تخم‌مرغ شد (P<۰/۰۵). زنده‌مانی در هر چهار رقیق‌کننده با افزایش زمان به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد، اما بین زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از شروع نگهداری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۲. میانگین درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ طی زمان‌های مختلف نگهداری منی به حالت مایع

تیمار	زمان اول	زمان دوم	زمان سوم
زرده تخم‌مرغ	۸۴/۰ ± ۲/۶ ^{bA}	۷۳/۳ ± ۳/۱ ^{aB}	۶۵/۸ ± ۳/۵ ^{bB}
لسیتین ۰/۵	۸۷/۵ ± ۲/۸ ^{abA}	۷۴/۳ ± ۰/۹ ^{aB}	۷۱/۸ ± ۱/۶ ^{abB}
لسیتین ۱	۸۹/۲ ± ۲/۴ ^{abA}	۷۹/۳ ± ۱/۴ ^{aB}	۷۶/۳ ± ۲/۲ ^{aB}
لسیتین ۱/۵	۹۲/۲ ± ۱/۶ ^{aA}	۸۰/۸ ± ۳/۵ ^{aB}	۷۶/۸ ± ۳/۱ ^{aB}
SEM	۱/۲	۱/۸	۱/۸

a-b: تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف متفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

A-B: تفاوت میانگین‌ها در هر ردیف با حروف متفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

زمان‌های اول، دوم و سوم به ترتیب یک، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار است.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمارهـای لسـیتین در زمان‌های اول و سوم به طور معنی‌داری باعث افزایش میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها در مقایسه با تیمار زرده شـد و همچنـین زنده‌مانی اسپرم با افزایش زمان کـاهش یافـت. یـک دلیـل برای کاهش زنده‌مانی اسپرم با گذشت زمان می‌تواند تـأثیر رادیکال‌های آزاد بـر سـاختار غشـاء بـوده [۳] و همچنـین ممکن است به علت تنش‌های سرمایی باشد. لسیتین سـویا قادر به محافظت اسپرم در برابـر سـرمای ناشـی از انجمـاد است و باعث افزایش نسبت اسپرم‌های زنده مـی‌شـود [۷]. ۱/۵ درصد لسیتین سـویا در مقایسـه بـا سـطوح دیگـر آن (۰/۵، ۱ و ۲ درصد) و زرده تخم‌مـرغ توانـایی بیشـتری در محافظت کیفیت اسپرم قوچ زندی در شـرایط انجمـاد دارد [۷]. درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در هیچ یک از زمان‌های ارزیابی (صفر، ۲۴ و ۴۸ سـاعت) تحـت تـأثیر رقیق‌کننده تریس شامل تیمارهای (سطوح مختلف لسـیتین و زرده) قرار نگرفت. درصد ناهنجاری‌های مورفولـوژیکی اسپرم باگذشـت زمـان (صـفر، ۲۴ و ۴۸ سـاعت) رونـدی صعودی را نشان داد و به‌طـور متوسـط از ۵/۴۷ درصـد در زمان اول (یک ساعت پس از اختلاط اسپرم با رقیق‌کننده)، به ۸/۸ درصد در زمان سوم (۴۸ ساعت پس از نگهـداری) رسید. درصد ناهنجـاری‌هـای مورفولـوژیکی اسـپرم قـوچ عربی در رقیق‌کننده تریس در زمـان‌هـای اول و سـوم بـین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری دیده نشد (جدول ۳)

میانگین درصد سلامت غشای پلاسـمایی اسـپرم قـوچ عربی طی زمان‌های مختلف نگهداری منی بـه‌حالـت مـایع بیان می‌کند، تفاوت معنی‌داری در سطوح مختلـف لسـیتین سویا و زرده وجود ندارد (جدول ۴). همچنین، بـا افـزایش زمان کاهش در تیمارهای مختلف مشاهده شـد، ولـی ایـن کاهش معنی‌دار نبود.

یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم بـه حفـظ عملکـرد اسپرم در طول ذخیره‌سازی در دستگاه تناسلی مـاده کمـک می‌کند. اختلال در یکپارچگی غشـای پلاسـمایی ناشـی از آسیب وارده و اختلال در سازمان دهی چربی طـی ذخیـره-سازی در دمای پایین می‌باشد که در نهایت منجر بـه مـرگ اسپرم می‌شود [۹]. یکپـارچگی غشـای عملکـردی اسـپرم دارای روابط مستقیم با تحرک اسپرم است [۸].

جدول ۳. میانگین درصد ناهنجاری مورفولوژیکی قوچ طی زمان‌های مختلف نگهداری منی به حالت مایع

تیمار	زمان اول	زمان دوم	زمان سوم
زرده تخم‌مرغ	۶/۰ ±۰/۴^{B}	۷/۰ ± ۰/۵ ^{AB}	۸/۳ ± ۰/۸^{A}
لسیتین ۰/۵	۵/۲ ±۰/۳^{B}	۷/۷ ± ۰/۶^{A}	۹/۲ ± ۱/۱^{A}
لسیتین ۱	۵/۵ ±۰ /۴^{B}	۷/۲ ± ۰/۷^{AB}	۸/۲ ± ۱/۰^{A}
لسیتین ۱/۵	۵/۰ ± ۰/۵^{B}	۶/۷ ±۰/۶ ^{AB}	۷/۸ ± ۰/۸^{A}
SEM	۰/۲	۰/۳	۰/۵

A-B: میانگین‌ها در هر سطر با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

زمان‌های اول، دوم و سوم به ترتیب یک، ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از اعمال تیمار است.

جدول ۴. میانگین درصد سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ طی زمان‌های مختلف نگهداری منی به حالت مایع

تیمار	زمان اول	زمان دوم	زمان سوم
زرده تخم‌مرغ	۷۸/۸ ± ۲/۴	۷۳/۸ ± ۲/۸	۷۰/۵ ± ۲/۳
لسیتین ۰/۵	۷۷/۰ ± ۲/۴	۷۲/۰ ± ۴/۳	۶۹/۰ ± ۳/۸
لسیتین ۱	۸۱/۳ ± ۴/۳	۷۷/۸ ± ۳/۲	۷۳/۳ ± ۲/۸
لسیتین ۱/۵	۸۲/۰ ± ۳/۰	۷۷/۵ ± ۲/۵	۷۵/۵ ± ۱/۹
SEM	۱/۳	۱/۵	۱/۴

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

زمان‌های اول، دوم و سوم به ترتیب یک، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار است.

یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم به حفظ عملکرد اسپرم در طول ذخیره‌سازی در دستگاه تناسلی ماده کمک می‌کند. اختلال در یکپارچگی غشای پلاسمایی ناشی از آسیب وارده و اختلال در سازمان دهی چربی طی ذخیره‌سازی در دمای پایین می‌باشد که در نهایت منجر به مرگ اسپرم می‌شود [۹]. یکپارچگی غشای عملکردی اسپرم دارای روابط مستقیم با تحرک اسپرم است [۸]. با این وجود در مطالعه حاضر، بین تیمارهای مختلف به لحاظ سلامت غشای اسپرم تفاوت معنی‌داری دیده نشد. همچنین سالم بودن غشا در رقیق‌کننده‌ها با گذشت زمان کاهش یافت، ولی این کاهش معنی‌دار نبود. شوک‌های سرمایی، پیر شدن اسپرماتوزوا در طی ذخیره‌سازی و افزایش تولید اکسیژن‌های واکنش‌پذیر می‌تواند از دلایل خسارت غشایی اسپرم باشد [۲]. در مطالعه‌ای که روی مقایسه سه رقیق کننده لسیتین، شیر و زرده تخم مرغ بر منی قوچ نژاد زندی در شرایط نگهداری مایع انجام گرفت، مشخص شد که سالم بودن غشاء در هر سه رقیق‌کننده با گذشت زمان کاهش یافت، اما این کاهش جز در لسیتین سویا در زمان‌های سه و شش نسبت به شروع نگهداری، در سایر رقیق‌کننده‌ها در زمان‌های مختلف (صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت) این کاهش معنی‌دار نبود [۱]. نتایج pH مایع منی نشان می‌دهد تفاوت معنی‌داری بین رقیق‌کننده‌های مختلف لسیتین سویا و زرده تخم مرغ وجود ندارد و با گذشت زمان در pH برخی رقیق‌کننده‌ها افزایش ناچیزی مشاهده شد که معنی‌دار نبود (جدول ۵).

بررسی اثر سطوح مختلف لسیتین سویا بر نگهداری منی اسپرم بز مهابادی نشان داد که لسیتین ۱/۵ درصد می‌تواند جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ باشد [۱۳]. همچنین پیشنهاد کردند که لسیتین سویا به اندازه زرده تخم‌مرغ در حفظ تحرک و زنده ماندن اسپرم قوچ طی روند سردسازی در دمای پنج و ۱۵ درجه سانتی‌گراد مؤثر است [۶]. بهبود پارامترهای اسپرم در رقیق‌کننده سویا به دلیل ویسکوزیته پایین آن است [۱۵]. علاوه بر این، با حضور سویا در رقیق کننده، فسفولیپیدهای با منشاء سویا می‌توانند جایگزین برخی از فسفولیپیدها در غشای اسپرم شوند که باعث حفظ ساختار و عملکرد غشای اسپرم می‌شود [۱۴]. براساس فرضیه دیگر فسفولیپیدهای سویا ممکن است با غشای اسپرم ادغام و به‌صورت یک لایه محافظ در برابر عوامل کشنده عمل کنند [۱۵].

جدول ۵. میانگین pH مایع منی قوچ طی زمان‌های مختلف نگهداری منی به‌حالت مایع

تیمار	زمان اول	زمان دوم	زمان سوم
زرده تخم‌مرغ	۶/۹ ± ۰/۰۶	۷/۰ ± ۰/۰۷	۷/۰ ± ۰/۰۷
لسیتین ۰/۵	۷/۰ ± ۰/۰۵	۷/۱ ± ۰/۰۷	۷/۲ ± ۰/۰۵
لسیتین ۱	۷/۰ ± ۰/۰۷	۷/۱ ± ۰/۰۷	۷/۱ ± ۰/۰۶
لسیتین ۱/۵	۷/۰ ± ۰/۰۵	۷/۱ ± ۰/۰۷	۷/۲ ± ۰/۰۵
SEM	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۳

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

زمان‌های اول، دوم و سوم به ترتیب یک، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار است.

به طورکلی، می‌توان نتیجه گرفت که لسیتین سویا جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ بوده و نه تنها کاهش کیفیت اسپرم را به دنبال نداشت، بلکه سطح ۱/۵ درصد آن باعث بهبود تحرک و زنده مانی اسپرم‌ها طی یک ساعت پس از اسپرم گیری و سطوح یک و ۱/۵ درصد آن موجب افزایش میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها پس از ذخیره ۴۸ ساعته منی به حالت مایع در مقایسه با تیمار حاوی زرده شد.

منابع

۱. فولادوند ف، کریمی ک، ژندی م و توفیقی ک (۱۳۹۳) مقایسه اثر سه رقیق‌کننده لسیتین، شیر و زرده تخم‌مرغ بر نگهداری منی قوچ نژاد زندی در شرایط سرد. محیط زیست جانوری. ۶(۲): ۸۳-۸۸ .

2. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L and Storey BT (1987) Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. Andrology. 23: 338-348.

3. Ball BA, Medina V, Gravance CG and Bumber J (2001) Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degree C. Theriogenology. 56: 577-589.

4. Baumber J, Bal BA, Gravance CG, Medina V and Davies MCG (2000) The effect of reactive oxygen Species on equinesperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. Andrology. 21: 895-902.

5. Blom E (1983) Pathological conditions in the genital organs and in the semen as ground for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark. Nordisk Veterinary Medicine. 45: 105-130.

6. 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.

7. 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 Domestic Animal. 48: 899-904.

8. GIL J, Lundhein N, Soderquist L and Martines-Rodriguez H (2003) Influence of extender, temperature, and addition glycerol on post thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology. 59: 1241-1255.

9. Holt WV and North RD (1994) Effect 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.

10. Ohl DA and Menge AC (1996) Assessment of sperm functions and clinical aspects of impaired sperm function. Frentiersin Bioscience. 1: 96-108.

11. Purdy PH (2006) A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research. 63(3): 215-225.

12. 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.

13. 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.

14. Trimeche A, Anton M, Renard P, Gandemer G and Tainturier D (1997) Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou Jackass sperm. Cryobiology. 34: 385-39.

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