نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۹، تابستان ۱۳۹۷
ص‌ص: ۳۱~۴۴

تأثیر غلظت‌های مختلف گلیسرول و لسیتین بر ویژگی‌های اسپرم گاو نر هلشتاین ایرانی در شرایط انجماد و یخ‌گشایی پیاپی

- **مریم شیبانی**
دانشجوی کارشناسی ارشد،گروه فیزیولوژی جانوری دانشگاه پیام نور تهران
- **مهرداد معمار** (نویسنده مسئول)
استادیار گروه فیزیولوژی علوم دامی دانشگاه یاسوج
- **سیما نصری**
دانشیار گروه فیزیولوژی جانوری دانشگاه پیام نور تهران

تاریخ دریافت : اسفند ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش : آبان ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۷۴۳۱۰۰۶۲۲۱
Email: meamar@yu.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22092/ asj.2017.109893.1419

چکیده

به‌منظور کاهش صدمات ناشی از انجماد اسپرم، ترکیباتی نظیر لسیتین سویا در انجماد اسپرم گونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. انجماد پیاپی اسپرم در دام‌ها کمتر مورد توجه بوده است که در صورت نیاز برای اسپرم نژادهای کمیاب، این فرایند می‌تواند ارزشمند باشد. به منظور بررسی تاثیر لسیتین و گلیسرول بر کیفت اسپرم در انجماد و یخ‌گشایی پیاپی، نمونه‌های منجمد اسپرم گاو پس از یخ‌گشایی و حذف رقیق‌کننده‌ی قبلی، با رقیق کننده جدید بر پایه بافر تریس و با غلظت‌های مختلف گلیسرول (۳، ۵ و ۷ درصد) و لسیتین سویا (۱ و ۲ درصد) دوباره منجمد شدند. پس از دو هفته نمونه‌های اسپرم یخ‌گشایی شده و ویژگی‌های اسپرم بلافاصله پس از یخ‌گشایی و تا دو ساعت پس از نگهداری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد.

نتایج نشان داد که تیمارهای حاوی ۵ درصد گلیسرول و یک درصد لسیتین (G5L1) و ۳ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین (G3L2) به ترتیب دارای بیشترین و کمترین درصد جنبایی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشا اسپرم بلافاصله بعد از یخ‌گشایی و یک ساعت بعد از نگهداری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد بودند. درصد اسپرم‌های جنبا و زنده در تیمار G5L1 پس از ۲ ساعت نگهداری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به طور معنی‌داری ($P<0.05$) بیشتر از شاهد بود اما از لحاظ یکپارچگی غشا اسپرم با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0.05$).

به‌طورکلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از ۵ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین می‌تواند باعث بهبود ویژگی‌های اسپرم در انجماد و یخ‌گشایی پیاپی شود .

واژه‌های کلیدی: اسپرم گاو، انجماد و یخ گشایی پیاپی، گلیسرول، لسیتین.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 119 pp: 31-44

The effect of different concentrations of glycerol and lecithin on the characteristics of Iranian Holstein bull sperm in repeated freezing and thawing conditions

By: Maryam Sheybani[1], Mehrdad Meamar[2*], Sima Nasri[3]
1: MSc. student of animal physiology of Tehran Payamenoor university
2,*:Assistant professor of farm animal physiology of Yasouj university (Corresponding author)
3: Associated professor of animal physiology of Tehran Payamenoor university
*Corresponding author e-mail: meamar@yu.ac.ir

Received: March 2017 **Accepted: October 2017**

In order to reduce the injuries of sperm freezing, different compounds such as soy lecithin have been used in the sperm freezing of different species. Repeated frezzing was less considered in farm animals and doing this proccess could be valuable for the rare breeds.
In this study, for investigating the effect of lecithin and glycerol on sperm quality in repeated freezing and thawing, frozen sperm straws were provided and after thawing and eleminating the previous diluent, sperms were diluted in Tris buffer freezing extender containing different concentrations of glycerol (3, 5 and 7%) and soya lecithin (1% and 2%) and were frozen again.
After two weeks, the sperms were thawed and sperm characteristics were evaluated immediately after thawing and up to two hours incubation at 40 °C.
Results indicated that treatments containing 5% glycerol with one percentage lecithin (G5L1) and 3% glycerol with 2% lecithin (G3L2) showed the highest and the lowest percentage of mobility, viability and membrane integrity of sperm immediately after thawing and one hour incubation at 40 ° C respectively. The percentage of motile and viable sperms in G5L1 treatment was significantly higher ($P < 0.05$) than that in the control group after 2 hours of incubation at 40 ° C but sperm membrane integrity did not have significant difference with the control group ($P > 0.05$).
In general, results showed that using 5% glycerol with1% lecithin can improve the sperm characteristics in repeated freezing and thawing.

Key words: Bull sperm, Repeated freezing and thawing, Glycerol, Lecithin.

مقدمه

تاکنون کوشش‌های زیادی برای پیشرفت تکنولوژی انجماد اسپرم انجام شده است با این وجود، موفقیت این فناوری با مشکلاتی از جمله کاهش زنده‌مانی و جنبایی بعد از فرایند انجماد و یخ‌گشایی مواجه است (Ansari و همکاران، ۲۰۱۶). زنده‌مانی و جنبایی اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی متأثر از عوامل متعددی از قبیل کیفیت منی و نوع و غلظت ترکیبات موجود در رقیق کننده می‌باشد (Najafi و همکاران، ۲۰۱۳؛ Yoon و همکاران، ۲۰۱۵). بنابراین، استفاده از رقیق‌کننده مناسبی که اسپرم‌ها را در برابر آسیب‌های انجماد و یخ‌گشایی محافظت کرده و زنده‌مانی و جنبایی آن‌ها را بعد از یخ‌گشایی حفظ کند، بسیار حائز اهمیت است (Barbas and Mascarenhas، ۲۰۰۹؛ Purdy، ۲۰۰۶).

زرده تخم‌مرغ یکی از رایج‌ترین ترکیبات مورد استفاده در رقیق-کننده‌های منی است که به دلیل دارا بودن لیپوپروتئین-های با چگالی کم، اسپرم-ها را در برابر تنش‌های سرمایی حاصل از انجماد و یخ‌گشایی محافظت می‌کند (Leboeuf و همکاران، ۲۰۰۰). اگرچه زرده‌ی تخم‌مرغ به‌طور عمومی در انجماد اسپرم استفاده می‌شود، اما برخی از ترکیبات موجود در آن سبب مهار تنفس اسپرم‌ها و کاهش جنبایی آن‌ها می‌شود (Moussa و همکاران، ۲۰۰۲) همچنین وجود ترکیبات پروژسترونی در زرده‌ی تخم مرغ سبب ظرفیت‌دار[1] شدن زود هنگام اسپرم در زمان انجماد می‌شود (Bowden و همکاران، ۲۰۰۱) که در نتیجه می‌تواند باعث کاهش باروری شود و در صورت آلودگی میکروبی نیز، سبب مرگ اسپرم‌ها در مدت نگهداری می‌شود (Amirat و

1-Capacitation

همکاران، ۲۰۰۴). از ترکیبات موجود در زرده‌ی تخم‌مرغ لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین[۲] (LDL) نظیر فسفاتیدیل کولین است و به همین دلیل برخی از پژوهشگران درپی جایگزینی ترکیبات لیپوپروتئینی با چگالی پایین با زرده تخم مرغ به منظور رفع معایب استفاده از آن بودند (Bergeron و همکاران، ۲۰۰۴). لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین قادر هستند که با اتصال به غشای اسپرم آسیب به فسفولیپیدهای غشاء را در موقع شوک سرمایی به تأخیر بیندازند و درنتیجه باعث افزایش مقاومت آن‌ها در برابر شوک سرمایی شوند(Thun و همکاران، ۲۰۰۲). همچنین جذب آب توسط آپوپروتئین‌های LDL و ژلاتینه شدن آنها در اطراف غشای اسپرم باعث تشکیل یک غشای محافظتی در مقابل کریستال‌های یخ در اطراف غشای اسپرم می‌شود(Moussa و همکاران، ۲۰۰۲). مشخص شده است که ۱۰ درصد از لیپیدهای دانه سویا لسیتین است که مشابه LDL موجود در زرده‌ی تخم‌مرغ است (Jiang و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعات انجام شده، درصدهای مختلف لسیتین برای گونه‌های متفاوت توانسته است جایگزین خوبی برای زرده‌ی تخم‌مرغ باشد. دامنه‌ی غلظت لسیتین در رقیق کننده از ۰/۰۴ درصد در سگ (Beccaglia و همکاران، ۲۰۰۴) تا ۶ درصد در خوک (Zhang و همکاران، ۲۰۰۹) برای فرآیند انجماد بوده است. در انسان (Reed و همکاران، ۲۰۰۹)، اسب (Papa و همکاران، ۲۰۱۰) و قوچ (Najafi و همکاران، ۲۰۱۳) نیز درصدهایی بین این غلظت‌ها استفاده شده است.

گلیسرول، دی متیل سولفوکساید و اتیلن گلیکول عوامل محافظ انجمادی نفوذ کننده به درون سلول هستند که وزن مولکولی آن‌ها نسبتاً کم است. این مواد از تجمع مولکول‌های آب با یکدیگر برای تشکیل کریستال‌های یخ درون اسپرم جلوگیری می‌کنند و برای آبگیری آب داخل سلولی ضروری هستند. همچنین، نقطه انجماد پایین آن‌ها، زمان بیشتری برای آبگیری ایجاد می‌کند(Bucak و همکاران، ۲۰۰۸). پژوهشگران با بررسی‌های مختلف روی سطوح بهینه و مورد نیاز گلیسرول در رقیق‌کننده‌ها نشان دادند که سطح شش تا هشت درصدی گلیسرول برای اکثر رقیق‌کننده‌های منی مناسب است (Holt، ۲۰۰۰). افزودن گلیسرول به مایع منی قبل از انجماد، شامل مرحله موازنه است که در پایان این مرحله آب درون سلولی اسپرم به واسطه شیب اسمزی خارج شده و گلیسرول جایگزین آن می‌شود و بدین ترتیب مانع تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی شده و سلول‌ها را در برابر آسیب حاصل از تشکیل کریستال‌های یخ محافظت می‌کند (Papa و همکاران، ۲۰۱۵) .

گلیسرول علاوه بر کاهش نقطه انجماد و آبگیری اسپرم با اتصال به یون‌های فلزی درون رقیق کننده‌ها سبب تقویت سامانه‌ی بافری آنها در مدت انجماد نیز می‌شود (Rasul و همکاران، ۲۰۰۷).

انجماد دوباره[۳] اسپرم یخ‌گشایی شده به ندرت مورد نیاز است. اما ممکن است در مواقعی که به صورت تصادفی یا اشتباه، نمونه اسپرم گونه‌های کمیاب ذوب شوند یا در بانک اسپرم که نیاز است مقدار زیادی از اسپرم‌ها یخ‌گشایی شود انجماد و رقیق سازی مجدد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Abdussamad و همکاران، ۲۰۱۵؛ Barbas and Mascarenhas، ۲۰۰۹). با توجه به اینکه فرایند انجماد به صورت طبیعی باعث کاهش کیفیت اسپرم می‌شود و در انجماد پیایی نیز دفعات ایجاد تنش‌های سرمایی افزایش پیدا می‌کند بنابراین در پژوهش حاضر تأثیر لسیتین سویا بر کیفیت اسپرم گاو پس از انجماد و یخ‌گشای پیاپی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

اسپرم منجمد گاو نر هلشتاین اصلاح نژاد شده ایرانی، که همگی در فاصله یک تا دو هفته به روش انجماد برنامه‌ریزی شده با دستگاه توربوفریزر[۴] ساخت کشور آلمان و با رقیق کننده‌ی آندرومد[۵] با هفت درصد گلسیرول تهیه شده بودند از شرکت نهاده‌های دامی جاهد- کرج خریداری شده و در مدت آزمایش در تانک ذخیره نیتروژن نگهداری شدند. در شروع آزمایش استراها (لوله‌های پلاستیکی ۰/۵ میلی‌لیتری مخصوص نگهداری اسپرم منجمد) در بشر حاوی آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه یخ‌گشایی شدند و در ارزیابی اولیه، نمونه های

1- Refreezing

[2] Low density lipoprotein(LDL

[4] Turbo freezer

[5] Andromed

اسپرم با درصد جنبایی بین ۶۰ تا ۶۵ درصد انتخاب و هر ۳ نمونه به عنوان یک تکرار با هم مخلوط شدند آنگاه ویژگی‌های مخلوط حاصل از لحاظ غلظت اسپرم به وسیله‌ی لام هیموسیتومتر(صفحه‌ی شیشه‌ای مدرج مخصوص شمارش گلبول‌های قرمز)، درصد اسپرم های جنبا به وسیله میکروسکوپ با بزرگ نمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های زنده و بهنجار به روش رنگ آمیزی با ائوزین نیگروزین(Al-Badry، ۲۰۱۲) و درصد یکپارچگی غشایی اسپرم به وسیله محلول هیپواسمتیک ۱۰۰ میلی‌اسمول (Zubair و همکاران، ۲۰۱۳) مورد بررسی قرار گرفتند. سپس تعداد کل اسپرم موجود در هر تکرار به کمک غلظت اسپرم در آنها محاسبه شده و برای همه ی نمونه‌ها تعداد کل $۱۲/۵\times۱۰^{۷}$ اسپرم در نظر گرفته شد سپس نمونه ها سانتریفوژ شده (۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) و اسپرم‌ها از مایع رقیق‌کننده جدا شدند و رقیق‌کننده‌ی جدید بر پایه بافر تریس(Asadpour و همکاران، ۲۰۱۱) شامل: تریس ۳/۰۲۸ گرم، اسید سیتریک ۱/۶۷۵ گرم، فروکتوز ۱/۲۵ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر و ۵۰۰ میکروگرم جنتامایسین در هرمیلی لیتر همراه با غلظت‌های جدید گلیسرول (۷٪ و ۵٪، ۳٪) و لسیتین سویا (۱٪ و ۲٪) (Soy Lecithin, LAMBO, Belgium) تهیه و قطره قطره به نمونه‌های اسپرم سانتریفیوژ شده اضافه شدند و نمونه‌ها با توجه به غلظت لیستین و گلسیرول موجود در آنها به اختصار نامگذاری شدند (G7L0= رقیق‌کننده تریس با ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ و ۷٪ گلیسرول بدون لسیتین (شاهد) G7L1= رقیق‌کننده تریس با ۷٪ گلیسرول و ۱٪ لسیتین G7L2 = رقیق‌کننده تریس با ۷٪ گلیسرول و ۲٪ لسیتین G5L1 = رقیق‌کننده تریس با ۵٪ گلیسرول و ۱٪ لسیتین G7L2= رقیق‌کننده تریس با ۵٪ گلیسرول و ۲٪ لسیتین G3L1= رقیق‌کننده تریس با ۳٪ گلیسرول و ۱٪ لسیتین G3L2 = رقیق‌کننده تریس با ۳٪ گلیسرول و ۲٪ لسیتین).آنگاه نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت در یخچال (دمای ۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند و ویژگی‌های اسپرم نظیر جنبایی، درصد اسپرم‌های زنده، درصد اسپرم‌های بهنجار و درصد یکپارچگی غشاء اسپرم مورد بررسی مجدد قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به استراهای خالی منتقل شده و با پودر وینیل الکل بسته شدند سپس بلافاصله در بخار نیتروژن قرار داده شدند. بدین منظور به اندازه‌ی دو سانتی‌متر نیتروژن مایع در یک جعبه کائوچویی ریخته و استراها روی یک پایه فلزی با فاصله ۷ سانتی‌متر از سطح نیتروژن مایع قرار داده-شدند. پس از ۷ دقیقه نگهداری در بخار نیتروژن، نمونه‌ها به تانک حاوی نیتروژن مایع منتقل شده و به طور کامل منجمد شدند. بعد از ۲ هفته استراها در بشر حاوی آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه یخ‌گشایی شده و ویژگی‌های اسپرم نظیر جنبایی، درصد اسپرم‌های زنده، درصد اسپرم‌های بهنجار و درصد یکپارچگی غشاء اسپرم بلافاصله پس از یخ‌گشایی اندازه‌گیری شدند. در ادامه نمونه‌ها به مدت ۱ و ۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و ویژگی‌های اسپرم دوباره در پایان هر ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

مدل آماری پژوهش

این پژوهش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۷ تیمار و ۳ تکرار انجام شد و داده های مربوط به درصد اسپرم‌های جنبا، زنده، بهنجار و همچنین یکپارچگی غشاء بر اساس مدل آماری شماره ۱ تجزیه و تحلیل شدند و داده‌های مربوط به این ویژگی‌ها در یخ-گشایی اول به عنوان متغیر کمکی در تجزیه کوواریانس در نظر گرفته شد. داده‌های مربوط به غلظت اسپرم نیز بر اساس مدل آماری شماره ۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار SAS و با رویه‌ی GLM انجام شد. میانگین حداقل مربعات نیز بر اساس آزمون توکی ($P<0.05$) مقایسه شدند.

۱) $Y_{ijk}=\mu+ t_i + r_j(t_i) + e_{ijk}$

۲) $Y_{ij}=\mu+ t_i+ e_{ij}$

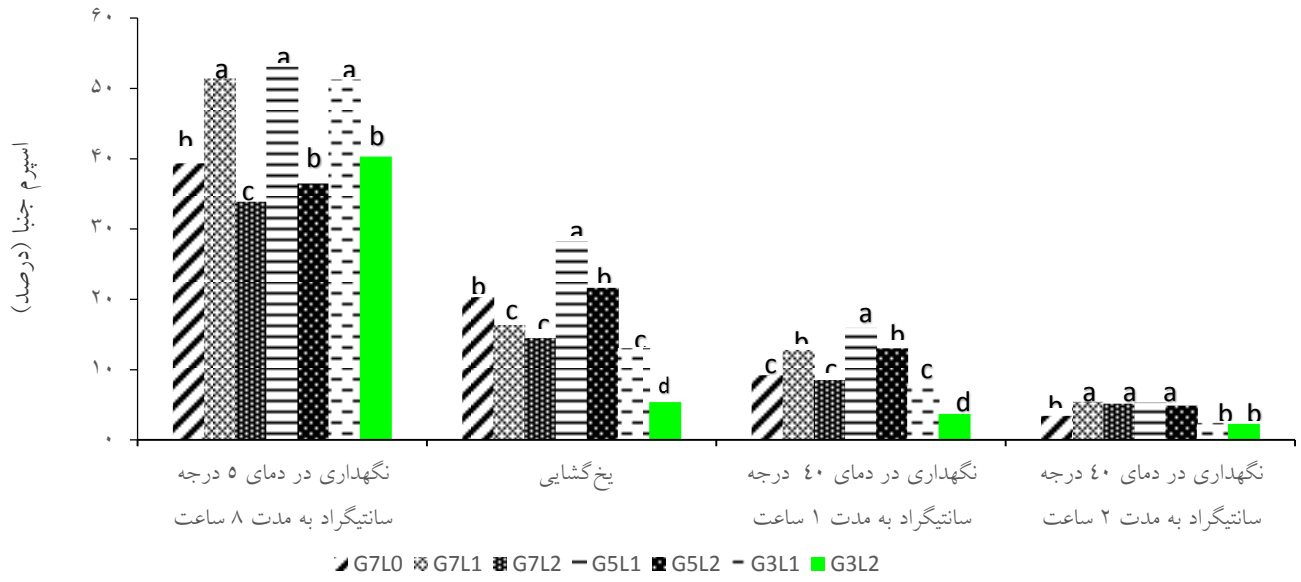
Y_{ijk} و Y_{ij} = میانگین ویژگی‌های مورد بررسی در تیماربه ترتیب در مدل آماری ۱ و ۲ t_i = اثر تیمار $r_j(t_i)$= کواریت ویژگی اولیه اسپرم در مدل آماری۱

e_{ijk} و e_{ij} = اثر خطاهای تصادفی به ترتیب در مدل آماری ۱ و ۲

نتایج

تأثیر غلظت‌های مختلف گلیسرول و لسیتین بر درصد اسپرم جنبا

همان‌گونه که درنمودار۱ مشاهده می‌شود، تیمارهای G7L1، G5L1 و G3L1 به ترتیب با میزان ۵۱/۴۰، ۵۳/۰۷ و ۵۱/۲۵ درصد دارای درصد اسپرم جنبای بیشتری نسبت به بقیه‌ی تیمارها بعد از ۸ ساعت نگهداری در یخچال بودند در حالی که بعد از یخ گشایی تنها تیمار G5L1 دارای بیشترین درصد اسپرم جنبا بود و کمترین درصد اسپرم جنبا نیز در تیمارG3L2 مشاهده شد. در همین زمان درصد اسپرم‌های جنبا در تیمارهای G7L1، G7L2 و G3L1 به طور معنی داری کمتر از شاهد (G7L0) و تیمار G5L2 از این لحاظ با شاهد تفاوت معنی داری نداشت ($P<0.05$). بعد از یک ساعت نگهداری در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد تیمارهای G5L1 و G3L2 به ترتیب دارای بیشترین و کمترین درصد اسپرم‌های جنبا بودند. ولی بعد از نگهداری دو ساعته درصد اسپرم های جنبا در تیمار G5L1 تفاوتی با تیمارهای G5L2، G7L1 و G7L2 نداشت.

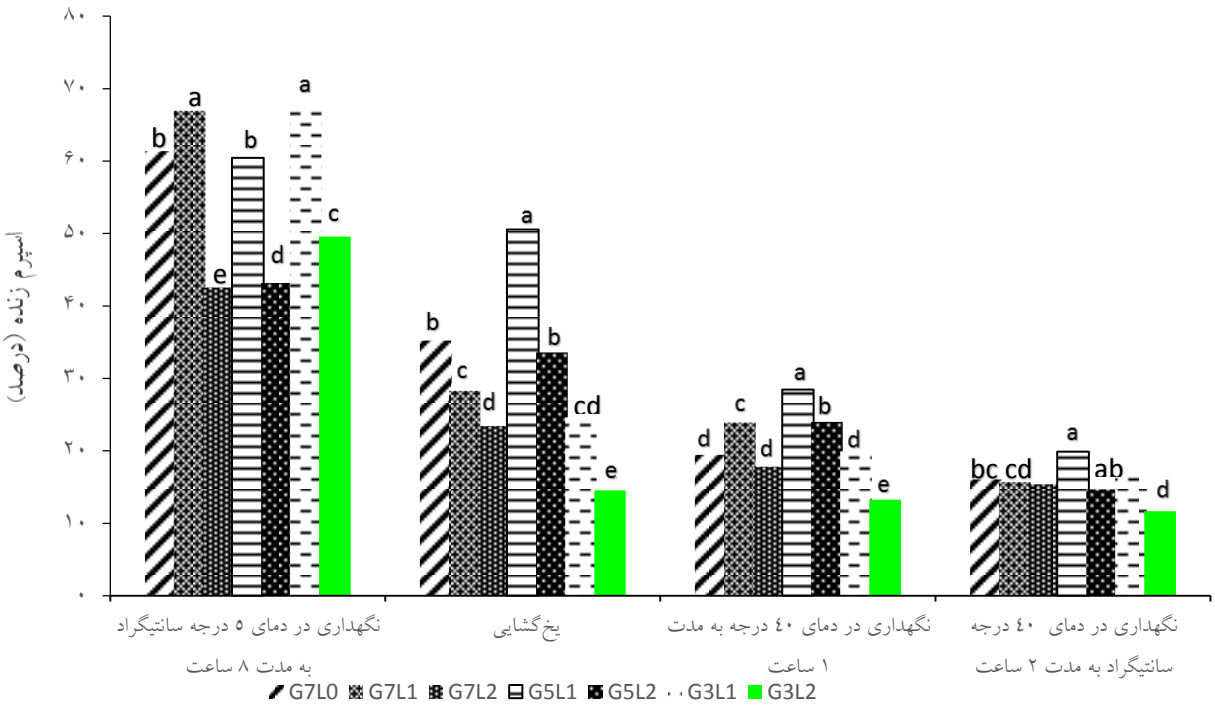


G7L0= رقیق‌کننده تریس با ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ و ۷ درصدگلیسرول بدون لسیتین (شاهد) G7L1= رقیق‌کننده تریس با ۷ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین G7L2 = رقیق-کننده تریس با ۷ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین G5L1 = رقیق‌کننده تریس با ۵ درصدگلیسرول و ۱ درصد لسیتین G7L2= رقیق‌کننده تریس با ۵ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین G3L1 = رقیق‌کننده تریس با ۳ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین G3L2 = رقیق‌کننده تریس با ۳ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین –در هر ستون میانگین‌های با حروف انگلیسی مشابه، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند ($P>0.05$).

نمودار ۱- مقایسه میانگین درصد اسپرم جنبا در زمان‌های مختلف انجماد و یخ‌گشایی.

تأثیر غلظت‌های مختلف گلیسرول و لسیتین بر درصد اسپرم زنده

همانگونه که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، در مدت نگهداری ۸ ساعته اسپرم‌ها در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد تیمارهای G7L1 و G3L1 درصد اسپرم‌های زنده‌ی بیشتری (به ترتیب با ۵۹/۸۱ و ۶۱/۶۲ درصد) نسبت به بقیه‌ی تیمارها داشتند. بعد از یخ‌گشایی، تیمار G5L1 دارای بیشترین درصد اسپرم زنده به میزان ۴۵/۵۵٪ بود و در همین زمان میزان این فراسنجه در تیمارهای G7L1، G7L2، G3L1 و G3L2 به طور معنی داری کمتر از شاهد (G7L0) بود و تنها تیمار G5L2 از این لحاظ با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P<0.05$). بعد از یک ساعت نگهداری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تیمارهای G5L1 و G3L2 به ترتیب دارای بیشترین و کمترین درصد اسپرم‌های زنده بودند و تیمارهای G7L2 و G3L1 با شاهد تفاوت معنی داری نداشتند. پس از ۲ ساعت، تنها تیمار G5L1 درصد اسپرم‌های زنده بیشتری نسبت به شاهد داشت.

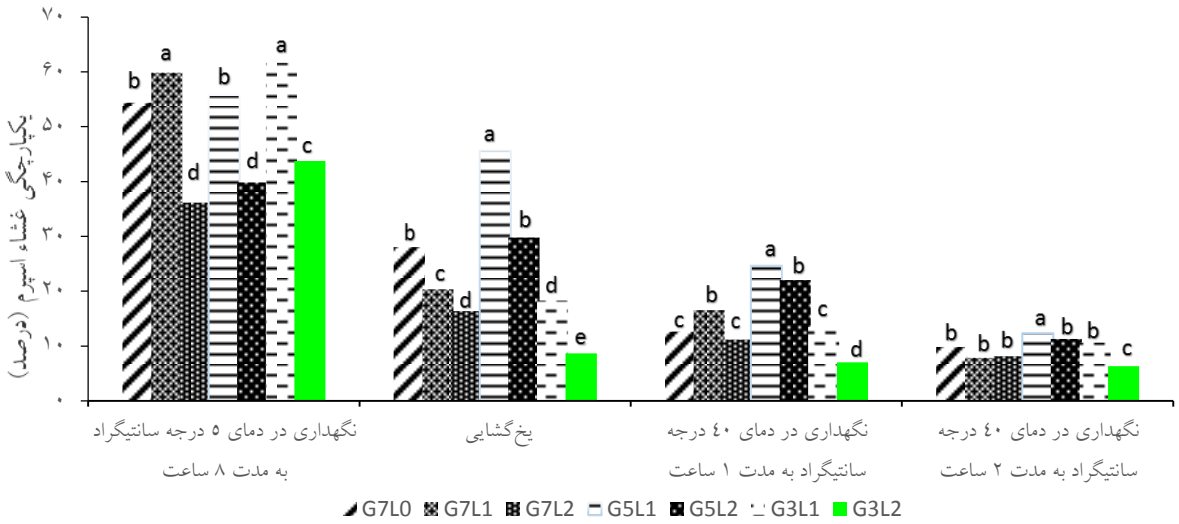


G7L0= رقیق‌کننده تریس با ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ و ۷ درصدگلیسرول بدون لسیتین (شاهد) G7L1= رقیق‌کننده تریس با ۷ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین G7L2 = رقیق-کننده تریس با ۷ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین G5L1 = رقیق‌کننده تریس با ۵ درصدگلیسرول و ۱ درصد لسیتین G7L2= رقیق‌کننده تریس با ۵ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین G3L1 = رقیق‌کننده تریس با ۳ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین G3L2 = رقیق‌کننده تریس با ۳ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین –در هر ستون میانگین‌های با حروف انگلیسی مشابه، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند ($P>0.05$).

نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد اسپرم زنده در زمان‌های مختلف انجماد و یخ‌گشایی.

تأثیر غلظت‌های مختلف گلیسرول و لسیتین بردرصد یکپارچگی غشاء اسپرم

همانگونه که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، در مدت نگهداری ۸ ساعته اسپرم‌ها در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد تیمارهای G7L1 و G3L1 درصد یکپارچگی غشاء اسپرم بیشتری (به ترتیب با ۶۶/۹۶ و ۶۷/۵۹ درصد) نسبت به بقیه‌ی تیمارها داشتند و در همین مدت درصد یکپارچگی غشاء اسپرم در تیمارG5L1 تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. بعد از یخ‌گشایی، تیمار G5L1 دارای بیشترین درصد یکپارچگی غشاء اسپرم با میزان ۵۰/۵۳٪ بود و بقیه‌ی تیمارها به جز تیمار G5L2 درصد یکپارچگی غشاء کمتری نسبت به شاهد داشتند. بعد از یک ساعت نگهداری در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد تیمار های G5L1 و G3L2 به ترتیب دارای بیشترین و کمترین درصد یکپارچگی غشاء اسپرم بودند و تیمارهای G7L2 و G3L1 از این لحاظ با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند. بعد از نگهداری دو ساعته، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای G7L1، G5L2 و G3L1 از لحاظ درصد یکپارچگی غشاء اسپرم مشاهده نشد. و در این مدت نیز تنها تیمار G5L1 بیشترین درصد یکپارچگی غشاء اسپرم را نسبت به شاهد داشت.

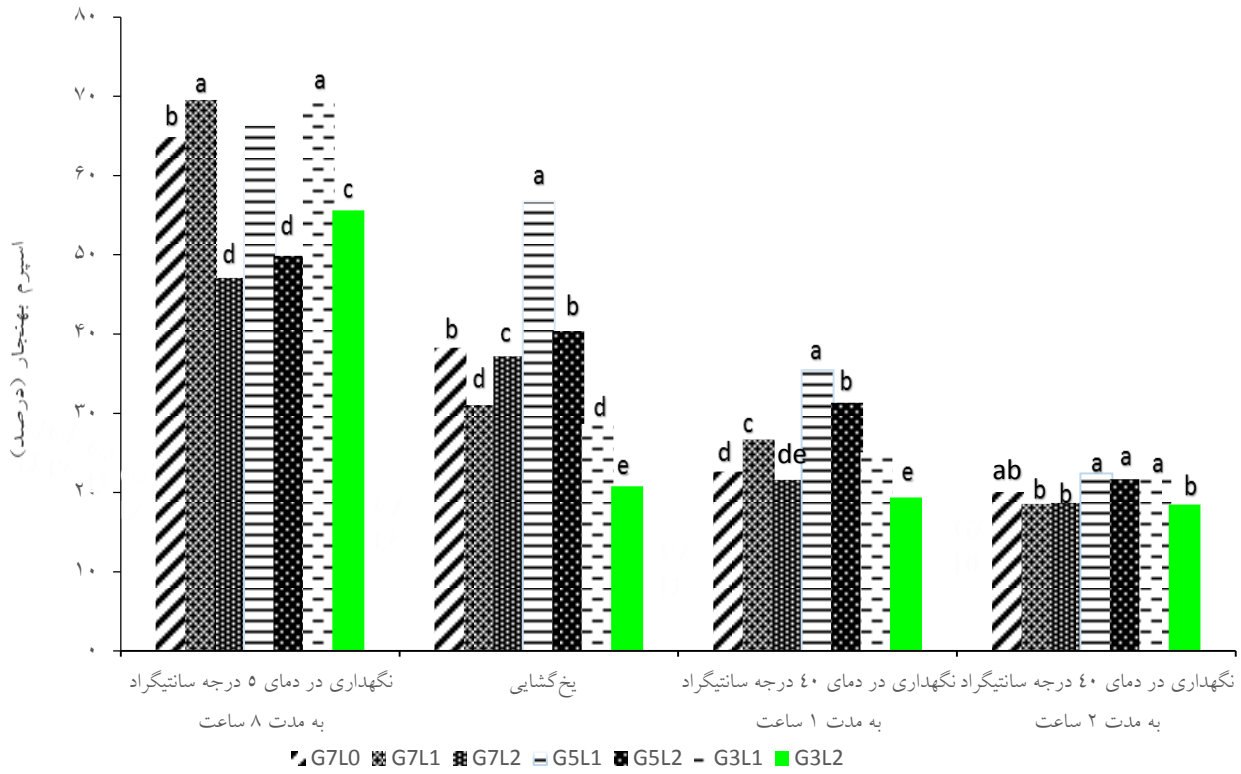


G7L0= رقیق‌کننده تریس با ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ و ۷ درصدگلیسرول بدون لسیتین (شاهد) G7L1= رقیق‌کننده تریس با ۷ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین G7L2 = رقیق-کننده تریس با ۷ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین G5L1 = رقیق‌کننده تریس با ۵ درصدگلیسرول و ۱ درصد لسیتین G7L2= رقیق‌کننده تریس با ۵ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین G3L1 = رقیق‌کننده تریس با ۳ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین G3L2 = رقیق‌کننده تریس با ۳ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین –در هر ستون میانگین‌های با حروف انگلیسی مشابه، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند (P>0.05).

نمودار ۳- مقایسه میانگین درصد یکپارچگی غشاء اسپرم در زمان‌های مختلف انجماد و یخ‌گشایی.

تأثیر غلظت‌های مختلف گلیسرول و لسیتین بر درصد اسپرم بهنجار

همانگونه که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود، درصد اسپرم‌های بهنجار در تیمارهای G7L1، G5L1 و G3L1 بعد از ۸ ساعت نگهداری در یخچال تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و در این مدت درصد اسپرم‌های بهنجار در تیمارهای G7L1 و G3L1 به طور معنی داری بیشتر از شاهد (G7L0) بود. بعد از یخ‌گشایی، بیشترین درصد اسپرم‌های بهنجار در تیمار G5L1 و کمترین آن در تیمار G3L2 مشاهده شد. دراین زمان تیمار G5L2 با شاهد تفاوت معنی داری نداشت. بعد از یک ساعت نگهداری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تیمار G5L1 دارای بیشترین درصد اسپرم‌های بهنجار بود و تیمارهای G7L2، G5L2 و G3L1 نیز با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند. این در حالی است که بعد از دو ساعت نگهداری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد هیچکدام از تیمارهای آزمایشی از لحاظ درصد اسپرم‌های بهنجار تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند.

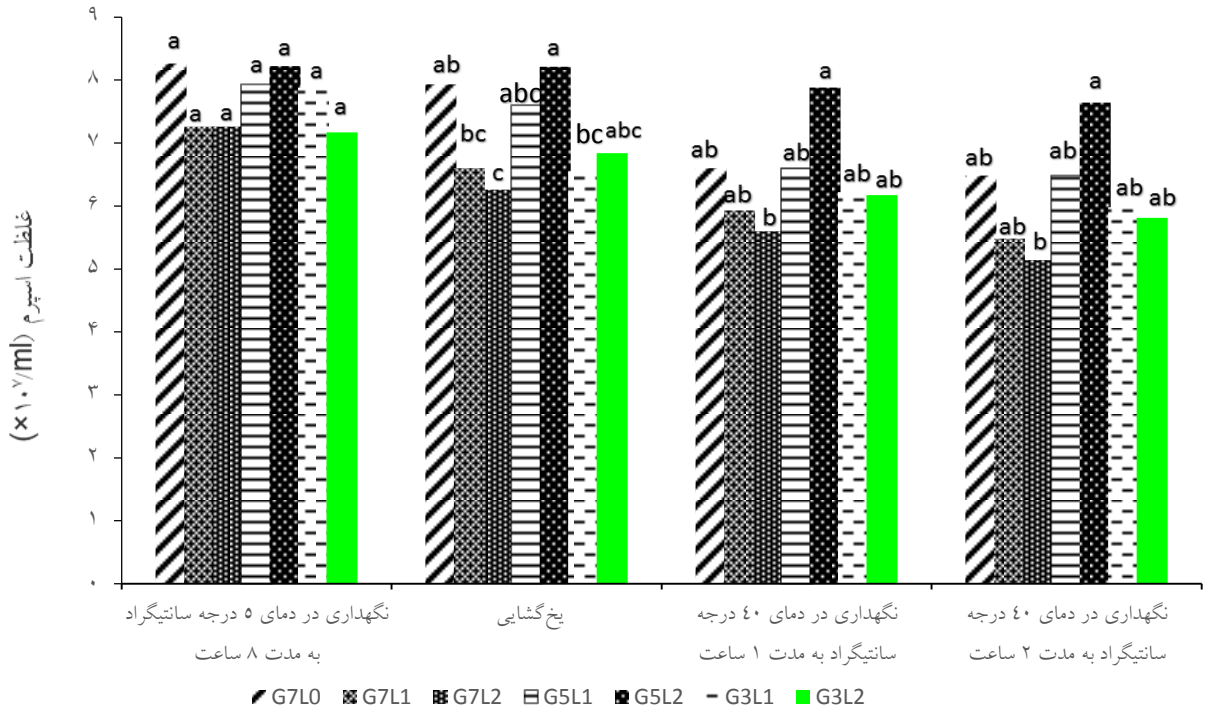


G7L0= رقیق‌کننده تریس با ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ و ۷ درصدگلیسرول بدون لسیتین (شاهد) G7L1= رقیق‌کننده تریس با ۷ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین G7L2 = رقیق-کننده تریس با ۷ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین G5L1 = رقیق‌کننده تریس با ۵ درصدگلیسرول و ۱ درصد لسیتین G7L2= رقیق‌کننده تریس با ۵ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین G3L1 = رقیق‌کننده تریس با ۳ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین G3L2 = رقیق‌کننده تریس با ۳ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین -در هر ستون میانگین‌های با حروف انگلیسی مشابه، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند (P>0.05).

نمودار٤- مقایسه میانگین درصد اسپرم بهنجار در زمان‌های مختلف انجماد و یخ‌گشایی.

تأثیر غلظت‌های مختلف گلیسرول و لسیتین بر غلظت اسپرم

همانطور که نمودار۵ نشان می‌دهد، تفاوتی از لحاظ غلظت اسپرم بین تیمارهای آزمایشی و شاهد در مدت نگهداری ۸ ساعته در ۵ درجه سانتی‌گراد وجود نداشت ولی بعد از یخ گشایی تنها تیمار G7L2 به طور معنی داری غلظت اسپرم کمتری نسبت به شاهد (G7L0) داشت و بقیه‌ی تیمارها از این لحاظ تفاوت معنی داری با شاهد نداشتند. در مدت نگهداری ۱ و ۲ ساعته در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نیز تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و شاهد مشاهده نشد.



G7L0= رقیق‌کننده تریس با ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ و ۷ درصدگلیسرول بدون لسیتین (شاهد) G7L1= رقیق‌کننده تریس با ۷ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین G7L2 = رقیق-کننده تریس با ۷ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین G5L1 = رقیق‌کننده تریس با ۵ درصدگلیسرول و ۱ درصد لسیتین G7L2= رقیق‌کننده تریس با ۵ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین G3L1 = رقیق‌کننده تریس با ۳ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین G3L2 = رقیق‌کننده تریس با ۳ درصد گلیسرول و ۲ درصد لسیتین -در هر ستون میانگین‌های با حروف انگلیسی مشابه، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند ($P>0.05$).

نمودار۵- مقایسه میانگین غلظت اسپرم در زمان‌های مختلف انجماد و یخ‌گشایی.

بحث

همانطوری که نمودارهای ۱و ۲ نشان می‌دهند تیمارهای حاوی ۱ و ۲ درصد لسیتین همراه با ۵ درصد گلیسرول دارای ویژگی‌های جنبایی و زنده‌مانی بهتری نسبت به شاهد و همچنین بقیه‌ی تیمارها هستند و از مقایسه دو تیمار G5L1 و G5L2 نیز می‌توان چنین نتیجه گرفت که غلظت ۱ درصد لسیتین سویا میزان بهینه مورد نیاز برای حفاظت از اسپرم گاو همراه با ۵ درصدگلیسرول برای انجماد پیاپی گاو می‌باشد به طوری که افزایش غلظت لسیتین سویا از ۱ درصد به ۲ درصد باعث کاهش معنی‌دار در میزان تحرک و زنده‌مانی بعد از یخ‌گشایی شد. کاهش این ویژگی‌ها با افزایش غلظت لسیتین سویا در محیط‌های انجماد می‌تواند با چند فرضیه قابل توجیه باشد. اول اینکه ویسکوزیته بیشتر محیط حاوی ۲ درصد لسیتین سویا در مقایسه با ۱ درصد آن در محیط‌های انجماد باعث کاهش جنبایی و زنده‌مانی پس از یخ گشایی می‌شوند. در این مورد نیز Van Wagtendonk-de Leeuw و همکاران

(۲۰۰۰) نشان دادند که ویسکوزیته بالا و حضور ذرات ریز در رقیق‌کننده باعث کاهش کیفیت اسپرم یخ گشایی شده و نهایتاً باروری گاوهای ماده شد. دوم اینکه افزایش غلظت منابع لیپوپروتئینی و فسفولیپیدی باعث تجمع آن‌ها در کنار هم شده و ویژگی‌های ژلاتینه به آنها می‌دهد که این امر سبب می‌شود تا تشکیل غشای محافظتی در اطراف غشای اسپرم به تأخیر بیافتد و کاهش تحرک و باروری اسپرم را سبب شود (Moussa و همکاران، ۲۰۰۲).

پژوهش Sharafi و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که استفاده از ۱ درصد لسیتین و ۷ درصد گلیسرول در مقایسه با رقیق‌کننده‌ی تجاری بیوکسل حاوی زرده تخم مرغ تغییری در میزان جنبایی و زنده‌مانی اسپرم‌های قوچ پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی نداشت. درحالی‌که در پژوهش حاضر تیمار G7L1 (۱ درصد لسیتین و ۷ درصد گلیسرول) از لحاظ جنبایی و زنده‌مانی اسپرم پس از یخ‌گشایی به طور معنی‌داری کمتر از تیمار حاوی زرده تخم‌مرغ (G7L0) بود که از این لحاظ با پژوهش مذکور متفاوت است. به نظر می‌رسد تفاوت‌های گونه‌ای اسپرم، روش انجماد و تفاوت رقیق‌کننده‌های مورد استفاده در این پژوهش از دلایل تفاوت در نتایج مشاهده شده باشد. در پژوهش حاضر همچنین رقیق کننده‌ی حاوی ۱ درصد لسیتین و ۷ درصد گلیسرول (G7L1) نسبت به رقیق کننده‌ی شاهد (۲۰ درصد تخم مرغ و ۷ درصد گلیسرول) جنبایی اسپرم کمتری بعد از یخ‌گشایی داشت. در پژوهش Ustuner و همکاران (۲۰۱۴) نیز افزودن ۱ درصد لسیتین به رقیق کننده‌ی تریس حاوی ۶ درصد گلیسرول نسبت به تیمار شاهد (۶ درصد گلیسرول و ۲۰ درصد زرده تخم مرغ) باعث کاهش معنی‌دار جنبایی اسپرم قوچ بعد از یخ‌گشایی شد. نتایج این دو پژوهش نشان می دهد که جایگزینی یک درصدی لسیتین به جای زرده تخم‌مرغ وقتی که غلظت گلیسرول بین ۶ تا ۷ درصد باشد باعث کاهش جنبایی اسپرم پس از یخ‌گشایی می‌شود. این در حالی است که در پژوهش حاضر با کاهش مقدار گلیسرول به ۵ درصد در رقیق کننده‌ی G5L1 افزایش معنی‌داری در جنبایی اسپرم نسبت به رقیق کننده‌ی شاهد (۲۰ درصد زرده تخم مرغ و ۷ درصد گلیسرول) ایجاد نمود که نشان می‌دهد لسیتین در رقیق کننده‌ی حاوی تریس تنها وقتی باعث افزایش معنی دار جنبایی پس از یخ‌گشایی خواهد شد که به طور همزمان مقدار گلیسرول نیز در رقیق کننده از ۶ درصد کمتر باشد.

البته نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کاهش درصد گلیسرول در رقیق کننده به کمتر از ۵ درصد در تیمارهای حاوی ۳ درصد گلیسرول همانند رقیق کننده‌ی حاوی ۷ درصد گلیسرول باعث کاهش جنبایی اسپرم بعد از یخ گشایی شد و این مطلب نشان داد که غلظت بهینه‌ی گلیسرول در انجماد پیاپی اسپرم گاو به هنگام استفاده از لسیتین حدود ۵ درصد می‌باشد، اما از آنجایی که درصد جنبایی اسپرم پس از یخ گشایی در تیمار G5L2 با تیمار شاهد (G7L0) تفاوت معنی داری نداشت بنابراین به طور قطع می‌توان اظهار داشت که استفاده همزمان ۱ درصد لسیتین و ۵ درصد گلیسرول غلظت‌های بهینه برای انجماد پیاپی اسپرم گاو می‌باشد.

در پژوهش حاضر یکپارچگی غشاء اسپرم بعد از یخ‌گشایی در رقیق کننده‌ی حاوی ۱ درصد لسیتین و ۵ درصد گلیسرول نسبت به رقیق کننده‌ی شاهد (G7L0) و دیگر رقیق کننده‌ها به طور معنی داری بیشتر بود که می‌تواند به دلیل تأثیر فسفولیپیدهای موجود در لسیتین سویا باشد که با ایجاد یک لایه‌ی محافظتی در سطح غشاء باعث جلوگیری از آسیب‌های مکانیکی به غشاء در مدت انجمادشده است (Sharafi و همکاران، ۲۰۰۹). در پژوهش حاضر بین تیمارهای G7L1، G5L1 و G3L1 که همگی دارای ۱ درصد لسیتین و غلظت‌های متفاوت گلیسرول بودند، از لحاظ جنبایی اسپرم تفاوتی در مدت نگهداری ۸ ساعته در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده نشد. همسو با این نتایج، پژوهش Vera-Munoz و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان داد که رساندن غلظت گلیسرول از صفر به ۶/۴ درصد در تیمارهای حاوی لیپوپروتیین های کم چگالی تأثیری بر جنبایی و یکپارچگی غشاء اسپرم گاو در مدت نگهداری ۲۴ ساعته در دمای ۵ درجه سانتی-گراد نداشت که نشان می‌دهد حضور لیپوپروتیین های کم چگالی در مقایسه با زرده تخم مرغ می‌تواند باعث تحمل افزایش غلظت گلیسرول تا حدود ۷ درصد توسط اسپرم‌ها در مدت نگهداری در ۵ درجه سانتی‌گراد شود. در پژوهش حاضر افزایش غلظت لسیتین به سطح ۲ درصد باعث کاهش جنبایی اسپرم‌ها پس از یخ‌گشایی در هر سطح از گلیسرول شد. به نظر می‌رسد لسیتین باعث تخریب میتوکندری و کاهش انرژی در دسترس اسپرم برای جنبایی از

طریق کاهش میزان کاردیولیپین و نهایتاً تخریب غشاء میتوکندری شده باشد (Del Valle و همکاران، ۲۰۱۲). Salmani و همکاران (۲۰۱۴) اثر افزودن غلظت‌های (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵) لسیتین سویا را روی اسپرم بز مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایش آنها نشان داد که استفاده از ۲ و ۲/۵ درصد لسیتین باعث کاهش معنی‌دار جنبایی، یکپارچگی غشا و زنده‌مانی اسپرم بز شد که از این لحاظ با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد زیرا در هر سطح از گلیسرول (۳ و ۵ درصد) رقیق کننده حاوی ۲ درصد لسیتین ویژگی‌های اسپرم را در مقایسه با ۱ درصد لسیتین کاهش داد. پژوهش Salmani و همکاران (۲۰۱۴) همچنین نشان داد که استفاده از لسیتین باعث کاهش میزان پراکسیداسیون در غشاء اسپرم شد که این می‌تواند یکی از دلایل حفظ جنبایی و زنده‌مانی اسپرم در فرآیند انجماد و یخ‌گشایی پژوهش حاضر در رقیق کننده‌ی G5L1 در مقایسه با شاهد باشد.

به طور کلی توانایی حرکت اسپرم در رقیق‌کننده‌های حاوی لسیتین در مقایسه با رقیق کننده‌ی حاوی زرده تخم مرغ که ویسکوزیتی بیشتری دارد بهتر است تاکنون سازوکارهای مولکولی علت تأثیر بهتر لسیتین بر جنبایی اسپرم پس از یخ‌گشایی مشخص نشده است اما گمان می‌رود که تغییر ساختار لیپیدی غشاء اسپرم و تأثیرگذاری آن بر روانی غشاء از دلایل آن باشد (Johnson و همکاران، ۲۰۰۰). فرضیه اول در مورد سازوکار محافظتی لسیتین بر اسپرم در فرآیند انجماد مربوط به ورود آن به غشاء اسپرم و تغییر نسبت گلیسرول به فسفولیپید و نهایتاً بهبود ویژگی الاستیک و روانی آن در برابر شوک سرمایی است. در فرضیه‌ی دوم عقیده بر این است که لسیتین به غشاء سلول وارد نمی‌شود بلکه با تشکیل یک صفحه‌ی محافظتی در اطراف غشاء اسپرم باعث جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخی در سطح غشاء و درون سیتوپلاسم می‌شود و این صفحه به طور مکانیکی نقش محافظتی خود را در مدت انجماد انجام می‌دهد بنابراین به نظر می‌رسد با توجه به ساختار میکروسکوپی و اندازه‌ی مولکولی لسیتین امکان ورود آن به غشاء کمتر بوده و فرضیه‌ی دوم بیشتر مورد پذیرش قرار می‌گیرد. از طرف دیگر محققین بر این نظر هستند که فسفولیپیدهای موجود در لیپوپروتئین‌های با چگالی کم می‌توانند جایگزین مقداری از فسفولیپیدهای غشای اسپرم شوند که در حین آسیب سرمایی از بین می‌روند (Salamon and Maxwell، ۲۰۰۰). البته علاوه بر ویژگی‌های ذکر شده ویژگی امولسیون کننده‌ی لسیتین نیز می‌تواند رقیق‌کننده‌ی یکنواختی ایجاد کند که باعث می‌شود تأثیر محافظتی یکنواختی بهتری در سطح مولکولی برای غشاء اسپرم ایجاد شود (Zhang و همکاران، ۲۰۰۹).

علاوه بر گوناگونی بیولوژیکی و تفاوت بین اسپرم‌ها در گونه‌های مختلف، عوامل دیگری نظیر ویژگی‌های اولیه‌ی اسپرم، تفاوت در روش انجماد، مدت نگهداری در فاز تعادل، غلظت گلیسرول ویژگی‌های بافری رقیق‌کننده‌ها، روش‌های یخ‌گشایی و عوامل ناشناخته می‌توانند از موارد ایجادکننده‌ی تفاوت در نتایج بدست آمده در پژوهش‌های مختلف باشند. از لحاظ ساختار اسپرم نیز تغییرات حاصل از ترکیبات لیپیدی غشاء اسپرم و پراکسیداسیون اسیدهای چرب آن در مدت انجماد باعث تغییر یکپارچگی غشاء اسپرم و نهایتاً کاهش تحرک آن می‌شود. حضور اسپرم‌های مرده و متلاشی شدن آنها نیز ضمن کاهش غلظت آنها و همچنین کاهش تعداد کل اسپرم‌های زنده و بهنجار باعث افزایش غلظت فسفولیپیدهای مستعد پراکسیداسیون در رقیق کننده و در نتیجه تولید بیشتر ترکیبات واکنش‌گر به اکسیژن می‌شود که می‌تواند اسپرم‌های سالم را بیشتر در معرض پراکسیداسیون قرار دهد. از سوی دیگر کاهش میزان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی درون اسپرم و مایع منی (Sundararaman و همکاران، ۲۰۱۲) و همچنین آنزیمهای آزاد شده از آکروزم اسپرم‌های متلاشی شده باعث تغییر شکل فیزیکی اسپرم‌ها و در نهایت مرگ آنها (Alvarez و همکاران، ۲۰۱۲) به‌ویژه در فرآیندانجماد و یخ گشایی پیاپی شود.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که لسیتین سویا می‌تواند جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ در انجماد پیاپی اسپرم گاو باشد و استفاده‌ی همزمان از غلظت ۱ درصدی لسیتین سویا و ۵ درصدی گلیسرول در رقیق کننده بر پایه‌ی تریس می‌تواند بیشترین کارایی را در حفظ ویژگی‌های اسپرم گاو در انجماد و یخ‌گشایی پیاپی داشته باشد.

منابع

Abdussamad, A., Gauly, M. and Holtz, W. (2015). Temporary storage of bovine semen cryopreserved in liquid nitrogen on dry ice and refreezing of frozenthawed semen. *Cryo Letters.* 36(4):278-284.

Al-Badry, K.I. (2012). Effect of various thawing times and temperatures on frozen semen quality of Friesian bulls in Iraq. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*. 4(60:384-388.

Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gerard, O., Courtens, J. L. 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(5):895-907.

Ansari, M.S., Rakha, B.A., Akhter, S. and Ashiq, M. (2016). OPTIXcell improves the post thaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology.* 85(3):528-532

Asadpour, R., Jafari, R. and Tayefi Nasrabadi, H. (2011). Influence of added vitamin C and vitamin E on frozen-thawed bovine sperm cryopreserved in citrate and Tris-based extenders. *Veterinary Research Forum.* 2(1):37-44.

Alvarez, M., Tamayo-canul, J., Anel, E., Boixo, J. C., Mata-Campozano, M., Martinez-Pastor, F., Anel, L. and De Paz, L. (2012). Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. *Theriogenology*. 77:1111-1118.

Barbas, J. and Mascarenhas, R. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*. 10(1):49-62.

Beccaglia, M., Anastasi, P., Chigioni, S. and Luvoni, G. C. (2009). Tris-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 44(2):345-349.

Bergeron, A., Crete, M. H., Brindle, Y. and Manjunath, P. (2004). Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*. 70(3):708-717.

Bowden, R.M., Ewert, M.A., Lipar, J.L. and Nelson, C. E. (2001). Concentrations of steroid hormones in layers and biopsies of chelonian egg yolks. *General and Comparative Endocrinology*. 121(1):95-103.

Bucak, M.N., Atessahin, A. and Yuce, A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Ruminant Research*. 75:128-134.

Del Valle, I., Gomez-Duran, A., Holt, W.V., Muino-Blanco, T. and Cebrian-Perez, J. A. (2012). Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of Andrology*. 33(4):717-725.

Holt, W. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science.* 62(1):3-22.

Jiang, Z.L., Li, Q. W., Hu, J. H., Li, W.Y., Zhao, H.W. and Zhang, S.S. (2007). Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology*. 54(3):301-304.

Johnson, L., Weitze K., Fiser, P. and Maxwell, W. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*. 62(1):143-172.

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

Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D. and Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology.* 57(6):1695-1706.

Najafi, A., Zhandi, M., Towhidi, A., Sharafi, M., Sharif, A. A., Motlagh, M. K. and Martinez-Pastor, F. (2013). Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*. 66(3):275-282.

Papa, F., Felicio, G., Melo, C., Alvarenga, M., De Vita, B., Avanzi, B. and Dell'Aqua, J. (2010). Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used for the cryopreservation of stallion semen. *Animal Repro*duction Science. 121(1):171-172.

Papa, P.M., Maziero, R.D., Guasti, P.N., Junqueira, C.R., Freitas-Dell'Aqua, C.P., Papa, F.O., Vianna, F.P., Alvarenga, M.A., Crespilho, A.M. and Dell'Aqua, J.A. (2015). Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*. 83:107-113.

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

Rasul, Z., Ahmed, N. and Anzar, M. (2007). Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Theriogenology*. 68:813-819.

Reed, M.L., Ezeh, P.C., Hamic, A., Thompson, D. J. and 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.

Salamon, S. and Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *AnimalReproduction Science*. 62(1):77-112.

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(2):276-280.

Sharafi, M., Forouzanfar, M., Hosseini, S.M., Hajian, M., Ostadhosseini, S., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H.R.and Javaheri, A. R. (2009). In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for ram semencryopreservation. *nternationalJournal of Fertility and Sterility*. 3(3):149-1562.

Sundararaman, M., Kalatharan, J. and Jawahar, K.T.P. (2012). Computer assisted semen analysis for quantification of motion characteristics of bull sperm during cryopreservation cycle. *Veterinary World*. 12(5):723-726.

Thun, R., Hurtado, M. and Janett, F. (2002). Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 57:1087-1094.

Ustuner, B., Alcay, S., Nur, Z., Sagirkaya, H.and Soylu, M. K. (2014). Effect of egg yolk and soybean lecithin on tris-based extender in post-thaw ram semen quality and in vitro fertility. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 20(3): 393-398.

Van Wagtendonk-de Leeuw, A., Haring, R., Kaal-Lansbergen, L. and Den Daas, J. (2000). Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*. 54(1):57-67.

Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Anton, M., Desherces, S., Shmitt, E., Thorin, C. and Tainturier, D. (2011). Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4° C. *Asian Journal of Andrology*. 13(2): 281-286.

Yoon, S. J., Kwon, W.-S., Rahman, M.S., Lee, J.S. and Pang, M.G. (2015). A Novel Approach to Identifying Physical Markers of Cryo-Damage in Bull Spermatozoa. *Plos one*. doi: 10.1371/journal.pone.0126232. e-Collection.

zubair, M., Ludhi, L. A., Ahmad, E. and Muhammad, G.(2013). Hypo osmotic swelling test as screening for evaluation of semen of bull. *Journal of Entomology and Zoology Studies.* 6(1): 124-128.

Zhang, S., Hu, J., Li, Q., Jiang, Z. and Zhang, X. (2009). The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology*. 22(8):6476-6480.