مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۱۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸

اثر سطوح مختلف لسیتین سویا بر کیفیت منی و نسبت جنسیت اسپرم گاو هلشتاین با تکنیک Real-time qPCR

سپیده رستمی .M.Sc*، محمدتقی بیگی‌نصیری .Ph.D، محمود نظری .Ph.D، صالح طباطبایی وکیلی .Ph.D

-دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، گروه علوم دامی، اهواز، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول : s.rostami1585@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲

چکیده

هدف: پژوهش حاضر به‌منظور بررسی استفاده از سطوح مختلف لسیتین سویا در رقیق‌کننده تریس بر کیفیت منی و نسبت جنسیت با استفاده از تکنیک real-time qPCR اجرا شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌گیری از چهار گاو نر نژاد هلشتاین، یک بار در هفته انجام شد و سپس نمونه‌های مناسب با هم مخلوط شدند. نمونه‌های اسپرم (در چهار تکرار) با سه مقدار صفر، یک و دو درصد لسیتین سویا تیمار شدند و در نهایت فراسنجه‌های کیفی و نیز نسبت جنسیت منی در آن‌ها تعیین گردید. در این تحقیق به‌منظور شستشوی منی و حذف سلول‌های مرده، از تکنیک شنا به سمت بالا (Swim up) استفاده شد. ژن‌های PLP و SRY به‌ترتیب برای جداسازی قطعات خاصی از توالی‌های کروموزوم X- وY- تکثیر شدند. در این روش RAP به‌عنوان ژن مرجع جهت نرمال‌سازی داده‌های حاصل از بیان ژن در واکنش RCPq emit-laer استفاده شد.

نتایج: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تکنیک Swim up و سطوح مختلف لسیتین سویا موجب بهبود کیفیت منی شدند. علاوه براین، استفاده از تکنیک Swim up باعث کاهش معنی‌دار بیان ژنPLP (۰/۱۱±۰/۷۵) و افزایش معنی‌دار بیان ژن SRY (۰/۱۳±۱/۳۷) گردید. اما استفاده از سطوح مختلف لسیتین سویا تغییری در نسبت جنسیت اسپرم ایجاد نکرد.

نتیجه گیری: به‌طورکلی، لسیتین سویا یک جایگزین مناسب برای منابع حیوانی بوده و موجب بهبود کیفیت مایع منی می‌شود. با توجه به محدودیت‌های موجود در استفاده از منابع حیوانی در رقیق کننده گاو، استفاده از لسیتین سویا به‌عنوان یک منبع گیاهی پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: تکنیک real- time qPCR، لسیتین سویا، نسبت جنسیت

مقدمه

حفظ باروری اسپرم برای مدت طولانی، نیازمند استفاده از رقیق‌کننده‌هایی است که محیط مناسبی را از نظر فیزیولوژیکی و متابولیکی برای بقای اسپرم فراهم کنند. رقیق‌کننده‌های متشکل از مواد مختلف (قند، الکترولیت‌ها، بافر، زرده تخم‌مرغ و لسیتین سویا) برای نگه‌داری اسپرم در حیوان‌های گوناگون پیشنهاد شده‌اند (۱). بیشتر رقیق-کننده‌هایی که طی دهه‌های گذشته برای رقیق‌کردن منی گاو استفاده شده، بر پایه زرده تخم مرغ و یا شیر بوده است، به‌علت مشکلات حاصل از رقیق کننده‌های با منشا حیوانی از قبیل وجود آلودگی میکروبی و انتقال بیماری، متغیر بودن ترکیبات آن‌ها، دشواری مشاهدات میکروسکوپی و ظرفیت‌دار شدن زود هنگام اسپرماتوزوئید، تمایل به‌عدم استفاده از منابع حیوانی در رقیق‌کننده وجود دارد (۲).

نتایج مطالعه محققان بر منی بز نشان داد که نوع رقیق‌کننده مورد استفاده در این مطالعه با آسیب DNA اسپرم در ارتباط است (۳). تغییر در نسبت اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X و Y تنها می‌تواند با تغییرات نسبت یا عملکرد اسپرم حامل کروموزوم X یا Y زنده در منی به‌دست آید. تفاوت بین اسپرم حامل کروموزوم X و Y در سرعت حمل از طریق دستگاه تولیدمثل جنس ماده و همچنین انتخاب ترجیحی اسپرم که ممکن است اثرات متفاوتی بر بقا یا عملکرد اسپرم حامل کروموزوم X یا Y داشته باشد، که می‌تواند منجر به تغییر در نسبت جنسیت شود (۴).

استفاده از اسپرم تعیین جنسیت شده نقش مهمی در صنایع تولیدی حیوانات دارد. دلیل عمده تعیین جنسیت این است که اغلب یک جنس ارزش بیشتری نسبت به جنس دیگر دارد (۵). برای دستیابی به این هدف، تکنیک جداسازی اسپرم حامل کروموزوم X (ماده) و Y (نر) به‌طور مناسب توسعه یافته است و این کار در چند کشور تجاری برای گاو استفاده می‌شود. این تکنیک به جریان فلوسایتومتری بر اساس دوام اسپرم حامل کروموزوم X و Y و تفاوت در DNA متکی است و دقت آن بیش از ۹۰ درصد است (۶). این روش تاکنون برای بهبود در زمینه ارزیابی سلول‌های اسپرم قابل قبول بوده است اما گران بوده و به‌دست دامداران کوچک قابل انجام نیست. علاوه براین، بعضی از محققان باور دارند که در طول جداسازی اسپرم تابش اشعه در میان سلول‌های اسپرم موجب خسارت به DNA شده و می‌تواند موجب بروز جهش در ژنوم شود (۷). با توجه به ضعف‌های بیولوژیکی و اقتصادی فلوسایتومتری، تلاش برای ایجاد روش‌های متداول برای تشخیص اسپرم بر اساس تراکم و تحرک اسپرم‌های حامل کروموزوم X و Yصورت گرفته است (۸). امروزه استفاده از روش real- time qPCR، برای ارزیابی نسبت جنسیت اسپرم‌های منی پیشنهاد شده است، با استفاده از این تکنیک می‌توان نسبت جنسیت را به‌طور آسان‌تر و با دقت ۹۹ درصد ارزیابی کرد (۹). کروموزوم Y حاوی ژن‌هایی است که در تعیین جنسیت جنین در حیوانات اهلی موثرند. SRY یکی از ژن‌های موثر در تعیین جنسیت است (۱۰). بیان ژن SRY که متصل به کروموزوم Y است سبب تمایز سلول‌های سرتولی از سلول‌های پیش‌ساز و در نهایت تشکیل بیضه می‌شود (۱۱). جهت شناسایی کروموزوم X از ژن PLP استفاده می‌شود این ژن مسئول تولید پروتئولیپید پروتئین بر روی کروموزوم X می‌باشد در تمام بافت‌های عصبی و غیر عصبی بیان می‌شود (۱۲).

پژوهش حاضر به‌منظور بررسی استفاده از سطوح مختلف لسیتین سویا در رقیق‌کننده تریس بر کیفیت منی و نسبت جنسیت با استفاده از تکنیک real- time qPCR اجرا شد.

مواد و روش‌ها

تمامی مواد مورد استفاده در استخراج DNA از اسپرم‌ها از شرکت Merck آلمان تهیه شدند، به‌منظور انجام واکنش real-time qPCR از کیت تجاری Amplicon (Cat. NO: 5000830-1250) استفاده شد.

جهت انجام پژوهش حاضر، نمونه‌گیری در مرکز تولید مواد ژنتیکی دام و طیور خوزستان، واقع در شهر ملاثانی در ۳۷

کیلومتری شمال شرقی اهواز انجام گرفت. مراحل مربوط به استخراج DNA و سایر مراحل آزمایشگاهی، در آزمایشگاه دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد.

نمونه‌گیری: نمونه‌گیری از چهار گاو بالغ نر نژاد هلشتاین در سن چهار سالگی به‌مدت چهار هفته، و یک‌بار در هر هفته با استفاده از مهبل مصنوعی انجام شد. بی‌درنگ پس از جمع‌آوری منی و انتقال آن به آزمایشگاه بررسی‌های ابتدایی روی منی اجرا شد. تحرک اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه-گیری و نمونه‌های دارای بیشتر از ۷۰ درصد تحرک به-عنوان منی بهینه در نظر گرفته شد. پس از اطمینان از سالم بودن نمونه‌ها، منی جمع‌آوری شده از چهار گاو نر با هدف از میان برداشتن تاثیرات فردی با یک‌دیگر آمیخته شدند (۱۳).

رقیق‌سازی: نمونه‌های منی به ۳ بخش مساوی تقسیم شدند، به‌هرکدام از بخش‌های جداشده به‌ترتیب رقیق‌کننده تریس حاوی: تریس (۰۳/۵۲ گرم در لیتر)، اسید سیتریک (۷۱ گرم در لیتر) و فروکتوز (۲۱/۵ گرم در لیتر) و پنی‌سیلین ۰۰۰۰۰۰۱ واحد بین‌المللی، استرپتو مایسین ۰۰۱ میلی‌گرم، آب مقطر تا حجم ۰۰۱ میل لیتر) و به اضافه لسیتین ۱ درصد و لسیتین ۲ درصد به‌صورت جداگانه افزوده شد (۴۱).

ارزیابی نمونه‌ها: pH نمونه‌های منی و فراسنجه‌های کیفی اسپرم نظیر تحرک، ناهنجاری، زنده‌مانی و سلامت غشا در طی دو مرحله قبل و بعد از رقیق‌سازی بررسی شدند. درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم با لام‌های رنگ‌آمیزی‌شده با ائوزین و نیگروزین بررسی شد. تحت بزرگنمایی ۱۰۰۰× میکروسکوپ حداقل ۲۰۰ اسپرم زنده در میدان‌های میکروسکوپی مختلف در هر نمونه مورد ارزیابی قرار گرفته و سپس میزان اسپرم‌های ناهنجار مشاهده شده بر حسب درصد بیان گردید. برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم نقایصی چون سر جدا شده، قطره سیتوپلاسمی دور، دم پیچ‌خورده، سر باریک و سر بزرگ مد نظر قرار گرفت. سپس تخمین درصد اسپرم‌های زنده و مرده بعد از رنگ‌آمیزی با ائوزین و نیگروزین انجام شد. در این روش، اسپرم‌های مرده، رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند، ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای ارزیابی نمونه ده میکرولیتر اسپرم بر روی یک لام گرم تمیز قرار داده شد. لام‌ها پس از رنگ‌آمیزی، زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰۰× ارزیابی شدند. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های رنگ‌شده (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد (۱۵).

فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم، به‌وسیله آزمایش تورم هایپواسموتیک بررسی شد. مقدار ۳۰ میکرولیتر نمونه منی با ۳۰۰ میکرولیتر محیط هایپواسموتیک، مخلوط و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از مخلوط را روی لام ریخته و پس از تهیه گسترش روی لام و خشک شدن آن، در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰× بررسی شدند. از هر لام، تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. اسپرم‌های با دم گره‌خورده و متورم به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم در نظر گرفته‌شده و اسپرم‌های با دم صاف به‌عنوان اسپرم با غشای آسیب‌دیده تعیین شدند.

جداسازی اسپرم‌ها: در این تحقیق به منظور شستشوی منی و حذف سلول‌های مرده و سایر مواد اضافی منی در مرحله قبل و بعد رقیق‌سازی، از تکنیک شنا به‌سمت بالا (Swim up) استفاده شد (۱۶).

استخراج و تعیین کیفیت DNA: جهت استخراج DNA از اسپرماتوزوئیدهای زنده جداسازی شده با تکنیک Swim up، از پروتکل استخراج نمکی استفاده شد (۱۷) و نیز جهت تعیین غلظت و خلوص DNA از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific) و ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید.

طراحی آغازگرها: پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد نظر روی کروموزوم Y و X مشخص شدند. ژن SRY به‌عنوان ژن نرزایی روی کروموزوم Y با طول قطعه ۸۹

جفت باز و با شماره بانک ژنی AJ009913-1 انتخاب شد. همچنین ژن PLP به‌عنوان ژن ماده‌زایی با طول قطعه ۹۰ جفت بازو با شماره بانک ژنی EU581861-1 انتخاب شد. از ژن گیرنده پروتئیناز فعال(PAR) به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. این ژن با طول قطعه ۷۹ جفت باز و شماره بانک ژنی AC234910-2 مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور تایید تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده ابتدا واکنش PCR انجام شد. در صورت تکثیر ژن‌های مورد نظر با استفاده از پرایمرهای مشخص شده، به‌منظور بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌ها از تکنیک real-time qPCR استفاده شد. لیست پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه از روش خلقی و همکاران (۱۸) گرفته شد؛ توالی، طول قطعه و نیز دمای اتصال هر پرایمر درجدول۱ آمده است.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real-Time qPCR

ژن	آغازگرها	طول محصول(جفت باز)	دمای اتصال(درجه سانتی‌گراد)
SRY	F:5´CTCAGACATCAGCAAGCAGC3´ R:5´-GTAGTCTCTGTGCCTCCTCA-3´	۸۹	۶۰
PLP	F:5´GAGGGAGGGTGGATCATAGA3´ R:5´:CCTCTGGGACCTTCAACAAT3´	۹۰	۶۰
PAR	F:5´-GCCATCACATCTGAGACCAC-3´ R:5´-GACTCAGCATCTCGAAGCAA-3´	۷۹	۶۰

واکنش real- time qPCR طی این مرحله، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پیشرفته برای نمونه‌های DNA حاصل از اسپرماتوزوئید با ۲ تکرار آزمایشی برای ژن‌های PLP، SRY و PAR با استفاده از دستگاه (Step one Plusreal time PCR System، کشور آمریکا) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتردر پلت‌های مجزا انجام شد. جدول ۲ مراحل انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز را نشان می‌دهد.

جدول ۲: چرخه دمایی مورد استفاده در واکنش real-time qPCR

مراحل	تعداد چرخه‌ها		دما	زمان
مرحله اول	۱	واسرشت سازی اولیه	۹۵	۱۵دقیقه
مرحله دوم	۴۰	واسرشت سازی	۹۵	۱۵-۳۰ثانیه
		اتصال پرایمر	۶۰	۳۰ثانیه
		بسط	۷۲	۳۰ثانیه
مرحله سوم		(رسم منحنی دمای ذوب)	۷۰-۹۵	۱۰ ثانیه

آنالیز آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از real- time PCR ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Step-one ABI، یک گزارش از کلیه اطلاعات موجود به‌صورت فایل Word (نسخه 2013) استخراج شده و سپس به نرم‌افزار Excel (نسخه 2013) انتقال داده شد. برای بررسی و تحلیل مراحل فوق مقادیر مربوط به چرخه آستانه (CT) حاصل از تکرارهای بیولوژیکی و تکنیکی هر نمونه وارد نرم‌افزار Excel شد. به‌منظور محاسبه درصد نسبی ژن PLP و SRY در اسپرماتوزوئیدهای جمع‌آوری شده، میانگین CT برای تکرارهای تکنیکی محاسبه شد و پس از تعیین میزان $\Delta\Delta CT$ برای تمامی نمونه‌ها، تفاوت نسبی نمونه مورد

آزمایش در مقابل نمونه کنترل با فرمول: $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام گردید (۱۹). بررسی آماری داده‌ها توسط نرم افزار SAS (نسخه ۹/۴) و آزمون t-test انجام شد.

نتایج

نتایج اثر تکنیک Swim up و افزودن سطوح مختلف لسیتین سویا (۱ درصد و ۲ درصد) در منی بر فراسنجه های کیفی اسپرم به حالت مایع مانند تحرک، زنده مانی، سلامت غشا و ناهنجاری و pH در جدول ۳ ارائه شده است.

نتایج به‌دست آمده نشان داد که تحرک اسپرم، زنده‌مانی و سلامت غشا تحت تاثیر تکنیک Swim up و سطوح مختلف لسیتین سویا قرار گرفته و در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵) و تکنیک Swim up منجر به کاهش معنی‌دار ناهنجاری در نمونه-های مورد آزمایش نسبت به گروه شاهد گردیده است (P<۰/۰۵). با توجه به نتایج ارائه شده، pH منی در همه رقیق‌کننده‌های استفاده شده نسبت به گروه شاهد اثر معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.

جدول ۳: اثر سطوح مختلف لسیتین سویا بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم در حالت مایع

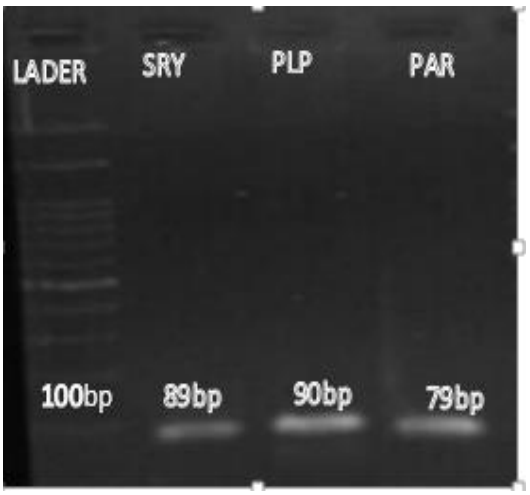
	تحرک (درصد)	زنده‌مانی (درصد)	سلامت غشاء(درصد)	ناهنجاری (درصد)	pH
منی تازه[1]	۷۲/۲۵±۱/۱^{c}	۸۴±۲/۱۶^{c}	۷۴/۲۵±۱/۱^{c}	۴/۷۵±۰/۴۷^{abc}	۶/۹۶±۰/۰۱
Swim up	۷۹/۲۵±۱/۷^{b}	۹۲±۱/۴۷^{ab}	۸۶/۷۵±۱/۳۷^{a}	۲/۵±۰/۴۷^{d}	۶/۹۷±۰/۰۰۰۶
لسیتین ۱	۸۱/۵±۱/۳۲^{ab}	۹۰/۷۵±۱/۴۴^{ab}	۷۹/۲۵±۰/۷۵^{b}	۵/۲۵±۰/۴۷^{ab}	۶/۹۵±۰/۰۰۰۷
لسیتین ۲	۸۴/۷۵±۱/۳۱^{a}	۹۲/۷۵±۱/۴۳^{a}	۹۱/۲۵±۱/۴۹^{a}	۴±۰/۴^{bcd}	۶/۹۵±۰/۰۰۰۶

a-c در هر ستون، میانگین‌های با حروف نامشابه اختلاف آماری معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

۱. منی رقیق‌شده با محیط پایه تریس بدون زرده تخم‌مرغ بعنوان شاهد در نظر گرفته شده است.

تکثیر ژن‌های SRY، PLP و PAR در شکل ۱ نشان داده شده‌است که تکثیر مناسب هر سه ژن را تایید نمود.

جدول ۴ نتایج اثر تکنیک Swim up و افزودن سطوح مختلف لسیتین سویا (۱ و ۲ درصد) به رقیق‌کننده تریس بر بیان ژن SRY و PLP نشان می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد که تکنیک Swim up منجر به افزایش معنی‌دار ژن SRY و کاهش معنی‌دار ژن PLP نسبت به شاهد شده است (P<۰/۰۵) و استفاده از سطوح مختلف لسیتین سویا در رقیق‌کننده تریس اثر معنی‌داری بر نسبت جنسیت اسپرم نسبت به تیمار شاهد نداشت.



شکل ۱: نتیجه الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگارز دو درصد

جدول ۴: اثر سطوح مختلف لسیتین سویا بر بیان ژنSRY و PLP (خطای استاندارد ± میانگین)

	SRY	PLP
شاهد	۱*^{b}	۱*^{a}
Swim up	۱/۳۷±۰/۱۳^{a}	۰/۷۵±۰/۱۱^{b}
تریس-لسیتین ۱درصد	۰/۹۴±۰/۱۲^{b}	۰/۹۶±۰/۰۷^{a}
تریس- لسیتین ۲درصد	۰/۹۲±۰/۰۷^{b}	۰/۹۷±۰/۰۷^{a}

*Arbitrray unit (AU) به‌طور اختیاری بیان ژن شاهد عدد ۱در نظر گرفته می‌شود (۲۰)

بحث

نتیجه گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که لسیتین سویا می‌تواند جایگزین مناسبی برای پروتئین زرده تخم مرغ باشد که بررسی‌های مختلف با نتایج متفاوتی بر روی آن انجام شده است. اما مطالعات در مورد اسپرم انسان و اثرات پروتئین زرده تخم‌مرغ و لسیتین سویا بر کیفیت اسپرم، سلامت DNA و توانایی اسپرم در اتصال به اسید هیالورونیک نشان دادند که اختلافی بین زرده تخم‌مرغ و لسیتین سویا در حفاظت اسپرم وجود ندارد (۲۱). سویا حاوی مقدار بالایی از فسفولیپیدهای شبیه زرده تخم‌مرغ است. لسیتین در حدود ۱۰ درصد از فسفولیپیدهای زرده را تشکیل می‌دهد و با توجه به‌حضور فسفولیپیدهای مشابه زرده در سویا می‌توان از آن به‌عنوان یک جایگزین گیاهی مناسب استفاده نمود (۲۲). البته علاوه بر ویژگی‌های ذکر شده ویژگی امولسیون‌کننده لسیتین نیز می‌تواند رقیق-کننده یکنواختی ایجاد کند که باعث می‌شود تاثیر محافظتی بهتری در سطح مولکولی برای غشا اسپرم ایجاد شود (۳۲).

محققان با بررسی تاثیر رقیق‌کننده سویا بر فراسنجه‌های اسپرم گاو هلشتاین در شرایط مایع گزارش کردند که زنده-مانی، تحرک و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در رقیق-کننده سویا همانند زرده تخم‌مرغ بوده و می‌تواند جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ برای مایع منی گاو در ذخیره-سازی در شرایط مایع باشد (۲۴). از دلایل افزایش تحرک در استفاده از لسیتین سویا می‌توان به غلظت بهینه لسیتین با ویسکوزیته و فشار اسمزی مناسب و همچنین ذرات ریز باقی‌مانده کمتر باشد (۲۵). یک‌پارچگی غشا اسپرم به‌دلیل تاثیر فسفولیپیدهای موجود در لسیتین سویا باشد که با ایجاد یک لایه محافظتی در سطح غشا باعث جلوگیری از آسیب‌های مکانیکی به غشا باشد (۲۶). پژوهشگران در طی آزمایشی روی رقیق‌کننده‌های مایع منی گاو گزارش کردند که استفاده از سطوح پایین‌تر لسیتین در مقایسه با سطح بالاتر آن باعث کاهش تحرک اسپرم شد که آن‌را به‌قدرت حفاظتی پایین سطوح کمتر لسیتین مرتبط ساختند (۲۷).

به‌طورکلی توانایی حرکت اسپرم در رقیق‌کننده حاوی لسیتین، نسبت به رقیق‌کننده‌های حاوی منابع حیوانی که ویسکوزیته بیشتری دارند بهتر است، تاکنون سازوکارهای مولکولی علت تاثیر بهتر لسیتین بر جنبایی اسپرم مشخص نشده‌است اما گمان می‌رود که تغییر ساختار لیپیدی غشا اسپرم و تاثیرگذاری آن بر روانی غشا از دلایل آن باشد (۲۸). البته علاوه بر ویژگی‌های ذکر شده ویژگی‌های امولسیون‌کننده‌ی لسیتین می‌تواند رقیق‌کننده‌ی یکنواختی ایجاد کند که باعث می‌شود تاثیر محافظتی یکنواخت بهتری در سطح مولکولی برای غشا اسپرم ایجاد شود (۲۳).

در تئوری شتلز چنین ذکر شده است که اسپرم Y نسبت به اسپرم X سریع‌تر است و علت آن‌را سر کوچک‌تر اسپرم Yنسبت به اسپرم X عنوان کردند (۲۹). اسپرم حامل کروموزوم X حاوی DNA بیشتری نسبت به اسپرم حامل کروموزوم Y است که منجر به مهاجرت کندتر می‌شود و سرعت حرکت اسپرم حامل کروموزوم Y بیشتر از اسپرم حامل کروموزوم X است، اسپرم حامل کروموزوم Y دارای ۴ درصد DNA کمتری نسبت به اسپرم حامل کروموزوم X است پس سریع‌تر شنا می‌کند (۳۰). روش شنا کردن اسپرم، نمونه را به دو قسمت حرکتی و غیر حرکتی تقسیم می‌کند. پس با توجه به این بیان می‌توان گفت که Swim up منجر به جداسازی اسپرم‌های زنده با تحرک بالاتر از اسپرم های مرده یا اسپرم‌های با تحرک پایین‌تر می‌شود. جداسازی اسپرم از اهمیت بالایی برخوردار است. اسپرم حامل کروموزوم X بزرگ‌تر و بلندتر از اسپرم حامل کروموزومY است و اسپرم حامل کروموزوم X، DNA بیشتری نسبت به اسپرم حامل کروموزوم Y دارد (۳۱). پس از شنا کردن، سرعت و درصد سلول‌های حرکتی به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند. تکنیک Swim up، اسپرم با حرکت سریع‌تر را انتخاب می‌کند (۳۲). با توجه به این‌که اسپرم‌های حامل کروموزوم X و Y گاو نر با سرعت‌های مختلف شنا می‌کنند و دارای فرصت‌های مختلف برای لقاح هستند. در طی آزمایشات محققان این نتایج به‌دست آمد

که شنا کردن با استفاده از ستون عمودی موجب تولید مخزن غنی از اسپرم حامل کروموزم Y شده که قادر به باروری تخمک‌ها و تولید جنین‌هایی با درصد بالاتر جنس نر می‌شود (۸).

طبق نتایج ارائه شده برای رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح مختلف لسیتین سویا نشان داده شده‌است که این رقیق-کننده‌ها اثرات مشابهی روی زنده‌مانی و دوام سلول‌های اسپرم حامل کروموزوم X و Y داشته به‌گونه‌ای که استفاده از این رقیق‌کننده‌ها، اثر معنی‌داری در نسبت جنسیت اسپرم ایجاد نکرده است. ازآن‌جاکه استفاده از رقیق‌کننده تریس- لسیتین سویا تغییری در نسبت جنسیت ایجاد نکرده است، دو فرضیه ارائه می‌گردد، فرضیه اول این‌که ترکیبات مشترک دو رقیق‌کننده استفاده شده، حساسیت یکسان سلول‌های اسپرم حامل کروموزوم X و Y نسبت به محیط رقیق‌کننده‌ها را نشان می‌دهد به‌گونه‌ای که اگر مرگ و میر و آسیب DNA، در نمونه‌ها رخ داده درصد برابری از اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X وY را از بین برده است، فرضیه دیگر اثر محافظتی بالای دو رقیق‌کننده است که منجر به حفظ اسپرماتوزوئیدها و نیز نسبت جنسیت نمونه‌ها شده است.

یکی از فاکتورهای ضروری جهت لقاح و باروری، سلامت DNA اسپرم است که هرگونه عوامل آندوژنی و اگزوژنی می‌تواند منجر به آسیب آن گردد و سلامت جنین را به مخاطره بیندازد، از مهم‌ترین عوامل آسیب DNA اسپرم که در اکثر انواع ناباروری‌های مردان تاثیرات مضری دارد می‌توان به افزایش سطح استرس اکسیداتیو اشاره نمود (۳۳). دو عامل می‌تواند اساس منشا آسیب DNA اسپرم باشد: یکی از این عوامل در طی فرایند اسپرمیوژنز، نقص در پروتامین منجر به بسته‌بندی ضعیف کروماتین و ایجاد یک وضعیت آسیب‌پذیری در اسپرم می‌گردد و دیگری هنگامی‌که اسپرم از طریق منابع مختلف از جمله قرار گرفتن در معرض ROS برون‌زاد یا ROS درون‌زاد موجب فعال شدن آبشار آپوپتوزیس ذاتی و در نهایت آسیب اکسیداتیو DNA می‌شود (۳۴).

محققان بر این باورند که اسپرم بالغ به‌علت دارا بودن مقدار سیتوپلاسم محدود و سطح آنتی‌اکسیدانت پایین نسبت به سایر سلول‌ها و همچنین سطوح بالای اسیدهای چرب اشباع نشده در ساختار غشا خود، نسبت به سایر سلول‌ها، به استرس اکسیداتیو حساس‌تر است (۳۵). در سطوح بالای استرس اکسیداتیو، کروماتین اسپرم شروع به قطعه‌قطعه شدن می‌کند که این موضوع تاثیرات عمده‌ای را بر سلامت نسل‌های آینده اعمال می‌کند (۳۶)، در سطوح بالای استرس اکسیداتیو، کروماتین اسپرم شروع به قطعه قطعه شدن می‌کند و در نهایت آسیب DNA اسپرم را به‌همراه دارد که این موضوع می‌تواند بر میزان تخریب تلومرها کمک کند و باعث کوتاه‌شدگی طول تلومر در رده سلول‌های زایا گردد (۳۷).

منشا استرس اکسیداتیو اسپرم، میتوکندری است که تمایل به تولید سطوح بالای آنیون سوپراکسید دارد که منجر به شروع آبشار آپوپتوزیس می‌گردد، البته تفاوت بین سلول-های اسپرم با سایر سلول‌ها در این راستا وجود دارد (۳۸). از طرف دیگر، به‌نظر می‌رسد لسیتین باعث تخریب میتوکندری و کاهش انرژی در دسترس اسپرم برای جنبایی از طریق کاهش میزان کاردیولیپین و در نهایت تخریب غشا میتوکندری شده باشد (۳۹).

نتایج مطالعات گسترده بیانگر خطر بالای انتقال بیماری‌های بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای در استفاده از رقیق-کننده‌های با منشا گیاهی توسط کشورهای اروپایی به بازار مصرف عرضه شده که فرمول آن‌ها ناشناخته است. با توجه به هزینه نسبتا بالای خرید این رقیق‌کننده‌ها لازم است که جهت ساخت رقیق‌کننده کارآمد با بهره‌گیری از نگهدارنده-های با منشا گیاهی در داخل کشور اقدام شود. لسیتین سویا یک جایگزین مناسب برای منابع حیوانی بوده و موجب بهبود کیفیت منی می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که، لسیتین سویا منجر به بهبود فراسنجه‌های کیفی منی و عدم تغییر در نسبت اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X و Y شده است با در نظر گرفتن محدودیت‌های موجود در استفاده از منابع حیوانی در رقیق‌کننده‌ها، استفاده از لسیتین سویا به‌عنوان یک منبع گیاهی پیشنهاد می‌شود.

منابع

1. Hopkins BK, Herr C, Sheppard W. S. Sequential generations of honey bee (Apis mellifera) queens produced using cryopreserved semen. Reproduction, Fertility and Development. 2012; 24(8): 1079-1083.

2. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology. 2003; 59(5-6): 1241-1255.

3. Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Li WY. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. Cryobiology. 2008; 57(3): 257-262.

4. Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Capacitation status and fertility of fresh and frozen–thawed ram spermatozoa. Reprod Fertil Dev. 1997; 9(5): 481-488.

ram semen. Theriogenology. 2003; 59(5-6): 1241-1255.

14. Mousavi SM, Tohidi A, Zhandi M, Mohammadi Sang Cheshmeh A, et al. Effect of osmolarity and glycerol different levels in spybean lecithin-based external on boving sperm quality after cryopresevation. J Anim Prod. 2016; 18(3): 593-601.

15. De Graaf SP, Evans GL, Gillan MM, Guerra WM, et al. The influence

5. Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of XY homologous gene amelogenin. Biotechniques. 1993; 15(4): 636-8.

6. Morrell JM, Keeler KD, Noakes DE, Mackenzie NM, et. Sexing of sperm by flow cytometry. Vet Rec. 1988; 122(14): 322-324.

7. Song M, Zhang R, Wang X. Nano-titanium dioxide enhanced biosensing of the interaction of dacarbazine with DNA and DNA bases. Mater lett. 2006; 60(17): 2143-2147.

8. Azizeddin A, Ashkar FA, King WA. Revay T. Enrichment of Y-Chromosome-Bearing Bull Spermatozoa by Swim-up Through a Column. Reprod Domest Anim. 2014; 49(1): e1-e4.

9. Delgado PA, Lester TD, Rorie RW. Variation in the Ratio of X-to Y-Chromosome Bearing Spermatozoa in Ejaculates of Semen Collected Weekly from Beef Bulls. Animal Science. 2010; 28-30.

10. Said L, Banni M, Kerkeni A, Said K, et al. Influence of combined treatment whit zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. Food Chem Toxicol. 2010; 48(10): 2759-65.

11. Baarske LA, Capel B. B luring the edge in vertebrate sex determination. Curr Opin Genet Dev. 2008; 18(6): 499-505.

12. Sharawy SM, Saleh NH, Attalah SA, Absy GM, et al. Effect of plant extract of Tribulusterrestris and probiotics on the reproductive performance, total cholesterol and testosterone hormone levels of rams. MENASJ. 2015; 1(1): 14-19.

13. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H .Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in

ofantioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. Theriogenology. 2007; 67(2): 217-227.
16. Hansen PJ. Alternative Sperm Purification Proce. University of Florida. Animal Science. 2013.
17. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988; 16(3): 12-15.
18. Kholghi M, Heidari F, Rostamzadeh J, Razmkabir M. Investigation of the ratio of X and Y chromosomes population in Holstein bulls' ejaculation and the role of blood testosterone concentration on population ratio. JCMR. 2016; 29(1):72-79.
19. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res. 2002; 30(9): 1-10.
20. Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. BMC Bioinform. 2005; 6(62): 1-16.
21. Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. Theriogenology. 2016; 85(1): 47-64.
22. Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasa, et al. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. J Reprod Develop. 2008; 54(4): 286-289.
23. Zhang S, Hu J, Li Q, Jiang, Z. et al. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. Afr J Biotechnol. 2009; 8(22): 76-80.
24. Rehman FU, Qureshi MS, Khan RU. Effect of soybean based extenders on sperm parameters of holesteinfriesian bull diuring liquid storage at 4. Pakist J Zool. 2014; 46(1): 185-189.
25. Emamverdi M, Zhandi M, Zare Shahneh A, Sharafi M, et al. Optimization of Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically Defined Soybean Lecithin-Based Extender. Reprod Domest Anim. 2013; 48(6): 899-904.
26. Sharafi M, Forouzanfar M, Hosseini SM, Hajian M, et al. In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation. Int J Fertil Steril. 2009; 3(3): 149-152.
27. Van Wagtendonk-de Leeuw AM, Haring RM, Kaal-Lansbergen LMTE, Den Doas JHG. Fertility result using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soyben extract. Theriogenology. 2000; 54(1): 57-67.
28. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. Anim Reprod Sci. 2000; 62(1-3): 143-172.
29. Spaulding GF. Sex-associated membrane proteins and methods for increasing the probability that offspring will be of a desired sex. Washington: United States patent; 1995.
30. Yan J, Feng HL, Chen ZJ, Hu J, et al. Influence of swim-up time on the ratio of X-and Y-bearing spermatozoa. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2006; 129(2): 150-154.
31. Awan MA, Mehmood A, Sultana T, Shahzad Q, et al. Sperm sexing in Nili-Ravi buffalo through modified swim up: validation using SYBR® green real-time PCR. Anim Reprod Sci. 2017; 182: 69-76.
32. Henkel RR, Schill, WB. Sperm preparation for ART. Reprod Biol Endocrinol. 2003; 1(1): 108-130.
33. Gharagozloo P, Gutiérrez-Adán A, Champroux A, Noblanc A, et al. A novel

antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. Hum Reprod. 2016; 31(2): 252-262.
34. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Tavalaee M. Failed fertilization after ICSI and spermiogenic defects. Fertil Steril. 2008; 89(4): 892-898.
35. Du Plessis SS, Agarwal A, Halabi J, Tvrda E. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. J assist Reprod Genet. 2015; 32(4): 509-520.
36. De Iuliis, GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. Biol Reprod. 2009; 81(3): 517-524.
37. Cariati F, Jaroudi S, Alfarawati S, Raberi A, et al. Investigation of sperm telomere length as a potential marker of paternal genome integrity and semen quality. Reprod Biomed online. 2016; 33(3): 404-411.
38. Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, et al. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. Biochem J. 2011; 436: 687-698.
39. Del Valle I, Gómez-Durán A, Holt W V, Muiño-Blanco T, et al. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. J Androl. 2012; 33(4): 717-725.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Autumn 2019; 10(3)

The effect of different levels of soybean lecithin on semen quality and sex ratio of Holstien bull sperm by Real-time qPCR technique

Rostami S, M.Sc.*, Beigi Nassiri MT, Ph.D., Nazari M, Ph.D., Tabatabaei Vakili S, Ph.D.

-Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran

* Email corresponding author: s.rostami1585@gmail.com

Received: 19 Mar. 2019 Accepted: 22 Jan. 2020

Abstract

Aim: This study was designed to investigate the use of different levels of soybean lecithin in the Tris extender on semen quality and sex ratio using real-time qPCR technique.

Material and Methods: Sperm samples (in four replications) were treated with three values of zero, one, and two percent Soybean lecithin soy, and finally the qualitative parameters and the sex ratio of the semen were determined. In this study, Swim up technique used to wash the semen and remove dead cell, the PLP and SRY genes were propagated to separate the specific fragments of X- and Y- chromosomes sequences. In this procedure, PAR was used as a housekeeping gene to normalize the gene expression data in real-time qPCR.

Results: The results showed that swim up technique and different levels of soybean lecithin improve the semen quality. In addition, swim up technique significantly reduced PLP gene expression (0.75±0.11), and significantly increased SRY gene expression (1.37±0.13), but, using of different levels soybean lecithin did not change the sex ratio of the sperm.

Conclusion: In general, soybean lecithin is an appropriate substitute to animal sources and improves the quality of semen. Due to the limitations of using animal resources in bull extenders, the use of soybean lecithin as a plant source is suggested.

Keywords: real- time qPCR technique, Soybean lecithin, Sex ratio