Archive of SID

پژوهش‌های علوم دامی
Animal Science Researches

نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۸ شماره ۴/ سال۱۳۹۷/ صفحات ۵۵ تا ۶۷

ارزیابی فراسنجه‌های کیفی اسپرم منجمد-یخ گشایی شده خروس در رقیق‌کننده حاوی اسیدآمینه ال-سیستئین

آیتک بخشایش خیابانی[۱] و غلامعلی مقدم[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/٤/۱۰

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

[۲] استاد گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبه: Email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: ذخیره انجمادی سلول‌ها و بافت‌ها در یک وضعیت دمایی باعث ایجاد وقفه موقت در فعالیت‌های حیاتی آن‌ها می‌شود. فرآیند انجماد اسپرم، فاکتورهای غشائی ازجمله سیالیّت، نفوذپذیری و ترکیبات لیپیدی را تحت تأثیر قرار داده و منجر به کاهش توانایی باروری اسپرم می‌شود. **هدف**: این آزمایش به‌منظور بررسی اثر افزودن سطوح مختلف اسیدآمینه ال-سیستئین (صفر، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌مولار) به رقیق‌کننده منی در نگهداری طولانی‌مدت اسپرم منجمد خروس انجام گرفت. **روش کار**: در این طرح از ۸ قطعه خروس نژاد راس با سن ۳۰ هفتگی استفاده شد. اسپرم گیری دو بار در هفته از طریق مالش پشتی-شکمی انجام گرفت. پس از انتقال نمونه‌های منی به آزمایشگاه و ارزیابی اولیه، نمونه-های استاندارد (حداقل ۷۵ درصد اسپرم متحرک، ۸۰ درصد اسپرم زنده و حداکثر ۱۰ درصد اسپرم ناهنجار) باهم مخلوط شده و پس از رقیق‌سازی با تیمارهای موردنظر، پایوت‌های حاوی اسپرم با روش انجماد دومرحله‌ای منجمد و داخل نیتروژن مایع نگهداری شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار کاسا فراسنجه‌های موردنظر اندازه‌گیری شدند. برای بررسی اثر سیستئین در ماندگاری اسپرم خروس (به مدت یک ماه) ارزیابی نمونه‌ها دو بار و بافاصله ۱۵ روز انجام گرفت. **نتایج**: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عملکرد اسپرم در روز ۳۰ نسبت به‌روز ۱۵ کاهش یافت. همچنین رقیق‌کننده‌های حاوی ۲/۵ میلی‌مولار سیستئین بهترین عملکرد را ازنظر درصد زنده‌مانی، تحرک کلی و پیش‌رونده در بین سایر تیمارها و گروه کنترل داشتند و تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). در بین سطوح مختلف آمینواسید سیستئین، سطح ۵ میلی‌مولار بهترین عملکرد را ازلحاظ سلامت و یکپارچگی غشاء اسپرم داشت. سطح ۷/۵ میلی‌مولار سیستئین کمترین درصد ناهنجاری را داشت. **نتیجه‌گیری نهایی**: نتایج حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که سیستئین موجب بهبود کیفیت منی منجمد خروس می‌شود و می‌توان اسپرم خروس را با استفاده از سیستئین به مدت طولانی‌تری منجمد و نگهداری کرد.

واژگان کلیدی: اسیدآمینه، سیستئین، اسپرم، خروس

مقدمه

انجماد اسپرم باعث ایجاد خسارات غیرقابل‌برگشت در سلول اسپرم می‌شود. دلیل اصلی عملکرد غیرطبیعی سپرم‌ها در طول نگهداری در دماهای پایین، وقوع پر اکسیداسیون لیپیدی (LPO)[1] تولید انواع اکسیژن‌های

[1]Lipid peroxidation (LPO)

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش‌پذیر[1] و عدم تعادل آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد (تونجر و همکاران ۲۰۱۰). همچنین، عواملی مانند تشکیل کریستال‌های یخ، تولید گونه‌های اکسیژن فعال، تغییرات دمایی، پراکسیداسیون لیپیدی، تغییر در ترکیبات غشایی، مسمومیت شیمیایی ناشی از محافظت‌کننده‌های انجمادی و استرس اسمزی باعث کاهش کیفیت اسپرم پس از ذوب می‌شود (بارباس و ماسکارنهاس ۲۰۰۹). اگرچه مایع منی خود دارای یک سیستم آنتی‌اکسیدانی شامل گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و همچنین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد اما فعالیت آن‌ها تحت تأثیر فرآیند انجماد قرار می‌گیرد که باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (پارتیکا و همکاران ۲۰۱۲ و صفا و همکاران ۲۰۱۶). غشای پلاسمایی اسپرم پستانداران، ماهی‌ها و پرندگان سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع و فسفولیپیدها است (سورای و همکاران ۲۰۰۱). مقدار زیاد اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه (PUFAs)[2]موجب می‌شود اسپرم به پراکسیداسیون لیپیدی[3] بسیار حساس شود (لانگ ۲۰۰۶). واردکردن آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده موجب کاهش سرعت اکسیداسیون و آسیب‌های ناشی از شوک سرمایی شده و تحرک و زنده‌مانی اسپرم را پس از یخ گشایی حفظ می‌کند، که این کار می‌تواند در توسعه تلقیح مصنوعی در طیور تأثیرگذار باشد (لانگ و کرامر ۲۰۰۳).

مطالعات نشان می‌دهد که اسیدهای آمینه سبب مقاومت سلول‌ها در دماهای پایین و شوک سرمایی می‌شود (فرشاد و حسینی ۲۰۱۳ و خلیلی و همکاران ۲۰۱۰) که نقش آن‌ها در بهبود بقای اسپرم طی فرآیند انجماد، مربوط به اثرات متابولیکی، تنظیم اسمزی، اثر محافظتی در برابر سرما و استرس اکسیداتیو می‌باشد (مرکادو و همکاران ۲۰۰۹). سیستئین یک اسیدآمینه غیرضروری حاوی سولفور با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که به‌راحتی از غشاء سلول عبور کرده و باعث افزایش بیوسنتز گلوتاتیون داخل سلولی و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود (کائوکت و همکاران ۲۰۱۰ و ساری اوزکان و همکاران ۲۰۰۹). در سال‌های اخیر، محققین پی بردند که استفاده از سیستئین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در انجماد اسپرم پستانداران مختلف (بوکاک و همکاران ۲۰۰۹ و تونجر و همکاران ۲۰۱۰)، باعث بهبود صفات تحرک، و زنده‌مانی اسپرم‌های منجمد-یخ گشایی می‌شود، بااین‌حال گزارش‌های کمی در مورد تأثیر سیستئین بر روی اسپرم منجمد خروس وجود دارد (پارتیکا و همکاران ۲۰۱۳). لذا هدف از انجام این آزمایش بررسی اثرات ال-سیستئین بر روی ماندگاری و بهبود کیفیت اسپرم خروس بعد از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش

این پژوهش در ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشگاه تبریز واقع در جاده باسمنج انجام گرفت.

حیوانات مورداستفاده و جمع‌آوری منی

در این آزمایش از ۸ خروس نژاد راس با سن ۳۰ هفتگی استفاده شد. خروس‌ها در سالن تحقیقاتی، با برنامه نوردهی ۱۵ ساعت نور و ۹ ساعت تاریکی در قفس‌های انفرادی نگه‌داری شدند. در طول آزمایش دمای سالن با دماسنج حداکثر- حداقل اندازه‌گیری شد. تمامی خروس-ها با جیره‌ی مصرفی با جیره یکسان بر اساس کاتالوگ راس تغذیه شدند و آب به‌صورت آزاد با آب‌خوری‌های سوزنی در اختیار پرنده‌ها قرار گرفت. خروس‌ها به مدت ۳ هفته برای اسپرم گیری عادت دهی شدند. نمونه منی به‌طورمعمول ۳ بار در هفته با استفاده از روش ماساژ پشتی-شکمی جمع‌آوری گردید (باروز و کویین ۱۹۳۷). بلافاصله بعد از جمع‌آوری، منی در یک مخزن حاوی آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه انتقال داده‌شد.

[1] Reactive Oxygen Species (POS)
[2] Polyunsaturated fatty acid
[3] lipid peroxidation

www.SID.ir

Archive of SID

آماده‌سازی رقیق‌کننده و انجماد اسپرم

پس از یک ارزیابی اولیه، فقط نمونه‌های قابل‌قبول با حداقل ۷۵ درصد تحرک، ۸۰ درصد زنده‌مانی و حداکثر ۱۰ درصد ناهنجاری برای رقیق‌سازی استفاده شدند. مواد شیمیایی مورداستفاده در مطالعه حاضر از شرکت مرک آلمان تهیه شد. رقیق‌کننده استفاده‌شده در این پژوهش رقیق‌کننده بلتسویل حاوی یک درصد لسیتین سویا بود (جدول ۱). پس از تهیه رقیق‌کننده پایه، فشار اسمزی با دستگاه اسمومتر (Osmomat 030-D Gonotec Germany) و PH با دستگاه pH متر دیجیتالی (AZ 86552 pH meter) به ترتیب در ۳۱۰ mOsm / kg و ۷/۲ تنظیم شد (امینی و همکاران b۲۰۱۵ و صفا و همکاران ۲۰۱۶).

جدول ۱- اجزای رقیق‌کننده مورداستفاده

Table 1- Composition of the modified Beltsville extender

مواد استفاده شده Ingredient	مقدار Amount
پتاسیم دی فسفات Potassium phosphate dibasic trihydrate	7.59 (gr)
سدیم گلوتامات Sodium-L-glutamat	8.67 (gr)
پتاسیم سیترات Potassium citrate	0.64 (gr)
پتاسیم منو فسفات Potassium phosphate monobasic	0.7 (gr)
سدیم استات Sodium acetate trihydrate	3.1(gr)
منیزیم کلراید Magnesium chloride anhydrous	0.34 (gr)
تریس N-[Tris (hydroxymethyl) methyl]-2	2.71(gr)
فروکتوز Fructose	5 (gr)
لیسیتین Soybean lecithin	1 (٪)
گلیسرول Glycerol	8 (٪)
آب مقطر Purified water	1000 (ml)
pH	7.2
اسمولاریته Osmolality	310 (mOsm/kg)

رقیق‌کننده به ٤ قسمت مساوی تقسیم، و با ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌مولار سیستئین غنی‌سازی شد و یک گروه به‌عنوان گروه شاهد (بدون سیستئین) در نظر گرفته شد. رقیق-سازی برحسب غلظت اسپرم با نسبت ۱ به ۳۰ (سی قسمت محلول رقیق‌کننده و یک قسمت منی) انجام گرفت. سپس لوله‌های حاوی نمونه منی به‌صورت دومرحله‌ای در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به تعادل دمایی رسیدند به‌طوری‌که ابتدا ۱/۵ سی‌سی رقیق‌کننده همراه با اسپرم به مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس۱/۵ سی‌سی دیگر رقیق‌کننده (هم‌دما شده)

www.SID.ir

Archive of SID

نیز به آن اضافه شد و یک ساعت دیگر در همان دما نگه-داری شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری (IMV, L'Aigle, France) پر شدند. پایوت-های حاوی منی به مدت ۷ دقیقه به فاصله ٤ سانتی‌متری از سطح ازت مایع قرار داده شد و سپس در ازت مایع غوطه‌ور گردید. ارزیابی نمونه‌ها دو بار و بافاصله ۱۵ روز انجام گرفت. برای یخ گشایی منی، پس از خارج کردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، به مدت ۳۰ ثانیه در داخل حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (صفا و همکاران ۲۰۱٦).

ارزیابی کیفیت اسپرم

فراسنجه‌های تحرک اسپرم

اولین فراسنجه‌های مورد ارزیابی پس از انجماد-یخ گشایی بررسی تحرک کل[1] تحرک پیش‌رونده، سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده [2] سرعت اسپرم در خط مستقیم[3] میانگین سرعت در مسیر مستقیم[4] خطی بودن تحرک[5] تحرک عرضی سر[6] معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم[7] فرکانس نوسانات اسپرم‌ها بود. به این منظور سه پایوت از هر گروه تیماری با روشی که در بالا توضیح داده شد ذوب‌شده و به داخل میکرو تیوپ انتقال داده شد. سپس با استفاده از سمپلر، ۵ میکرو لیتر از نمونه روی لام گذاشته و یک لامل تمیز بر روی آن گذاشته شد، لام موردنظر با استفاده از نرم‌افزار CASA[8] بررسی شد. از هر نمونه حداقل ٤ میدان به‌طور کاملاً تصادفی انتخاب‌شده و فراسنجه‌های تحرک حداقل ۲۵۰ اسپرم به‌وسیله نرم‌افزار CASA، به‌وسیله عکس‌برداری با بزرگنمایی ۱۰۰× آنالیز شدند (نبی و همکاران ۲۰۱۵).

زنده‌مانی اسپرم

زنده‌مانی اسپرم‌ها با روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین موردبررسی قرار گرفت (اخلاقی و همکاران ۲۰۱٤). برای این کار مقداری از نمونه‌ی منی با سمپلر برداشته و روی یک لام گذاشته شد و ۲ تا ۳ برابر حجم نمونه‌ی منی، ائوزین-نیگروزین به آن افزوده و با نمونه مخلوط شد. بعد از چند ثانیه با لام دیگری گسترش تهیه شد و با استفاده از سیستم هوادهی خشک گردید. درصد اسپرم‌های زنده در چندین نقطه از لام(با شمردن ۲۰۰ تا ۳۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ٤۰۰×) تعیین شد .اسپرم‌هایی که اندکی رنگ گرفته بودند نیز جزو اسپرم‌های مرده در نظر گرفته شدند (امینی و همکاران a۲۰۱۵ و صفا و همکاران ۲۰۱٦).

یکپارچگی غشاء پلاسمایی (HOST)

برای ارزیابی سلامت و یکپارچگی غشاء اسپرم از روش هایپواسموتیک استفاده شد (سانتیاگو و همکاران ۲۰۰۹). زمانی که اسپرم در محیط هایپوتونیک قرار می‌گیرد، اگر ازلحاظ بیولوژیک سالم باشد با جذب آب حجمش زیاد می‌شود تا تعادل اسمزی بین مایع درون و برون سلولی اسپرم برقرار شود. به این منظور غشایی که اطراف دم را فراگرفته متورم می‌شود و دم دچار پیچ‌خوردگی می-شود. دم اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالم ندارند، پیچ نمی‌خورد. اسپرم‌هایی که به این تست پاسخ مثبت می‌دهند زنده هستند. اسپرم پرندگان اهلی توان باروری خود را در رقیق‌کننده‌های با اسمولاریتی ٤٦۰-۲۵۰ میلی‌اسمول حفظ می‌کند (بکست ۲۰۱۰، سکستون و فولاس ۱۹۷۸ و سوجینسکا و لوکزیوکس ۲۰۰۸).

انجام تست با مخلوط کردن ۳۰ میکرو لیتر از مایع منی رقیق‌شده ($۱۰^٦$ × ۲۰ اسپرم/ میلی‌لیتر) با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول هایپواسموتیک (فروکتوز ۹ گرم/ لیتر و سیترات سدیم ٤/۹ گرم/ لیتر) با فشار اسمزی ۱۰۰ mOsm/kg انجام شد. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس قطره کوچکی از نمونه مخلوط شده، روی لام از پیش هم‌دما شده قرار داده و با

[1] Total Motility (TM)
[2] Curvilinear velocity (micron/sec) (VCL)
[3] Straight – line velocity (micron/sec) (VSL)
[4] Average path velocity (micron/sec) (VAP)
[5] Linearity (%) (LIN= VSL/VCL×100)
[6] Lateral head displacement (micron) (ALH)
[7] Straightness (%) (STR=VSL/VAP ×100)
[8] CASA,VideoTesT-Sperm 3.1, St. Petersburg, Russia

www.SID.ir

Archive of SID

لامل پوشانده شد و بلافاصله زیر میکروسکوپ فاز کنتراست، موردبررسی قرار گرفت (۱۰۰۰× بزرگنمایی). درنهایت، ۲۰۰ اسپرم با دم متورم و غیرمتورم ثبت شد. اسپرم‌های با دم متورم و تاب‌خورده به‌عنوان اسپرم‌های با غشاء پلاسمایی سالم در نظر گرفته شدند (سانتیاگو و همکاران ۲۰۰۹).

مورفولوژی اسپرم (تست هانکوک)

برای ارزیابی اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی ۱۵میکرو لیتر از هر نمونه یخ گشایی شده به میکرو تیوب‌های حاوی ۱۵۰ میکرو لیتر محلول هانکوک که شامل فرمالین ۳۷ درصد (۶۲/۵ میلی‌لیتر)، محلول سدیم سالین (۱۵۰ میلی‌لیتر)، محلول بافر فسفات (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دو بار تقطیر (۵۰۰ میلی‌لیتر) می‌باشد، افزوده شد و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفت و توسط یک لامل پوشانده شد و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوا زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰×، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه گردید (شیفر و هلزمن ۲۰۰۰).

تجزیه آماری

این مطالعه دارای ٤ تیمار، سیستئین (۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌مولار) و تیمار شاهد (فاقد هرگونه آنتی‌اکسیدان) است و تعداد تکرار برای هریک از تیمارها ۵ می‌باشد. مدل آماری مورداستفاده در این آزمایش، طرح کاملاً تصادفی در قالب طرح فاکتوریل بوده و آنالیز داده‌ها با استفاده از رویه GLM و نرم‌افزار SAS 9. 1 انجام شد. برای مقایسات میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + (T*D)_{ij} + e_{ijk}$$

Y_{ijk}= مشاهده، μ= میانگین مشاهدات، T_i = اثر تیمارها (i=۱،۲،۳،٤) ، D_j= اثر زمان (j=۱،۲) ، $(T*D)_{ij}$ = اثر متقابل زمان و تیمار، e_{ijk}= اثر عوامل ناشناخته ijkام

نتایج

نمونه‌های منی جمع‌آوری‌شده ازنظر ویژگی‌های اولیه ازجمله حجم، غلظت، زنده‌مانی، تحرک مورد ارزیابی قرار گرفت تا مطلوب بودن آن‌ها برای انجام آزمایش مشخص گردد (جدول ۲). پس از ارزیابی اولیه، فقط نمونه‌های قابل‌قبول با حداقل ۷۵ درصد تحرک و ۸۰ درصد زنده‌مانی و حداکثر ۱۰ درصد اسپرم غیرطبیعی برای رقیق‌سازی استفاده شدند.

در این پژوهش کیفیت اسپرم حاوی سیستئین پس از ۱۵ و ۳۰ روز نگهداری در داخل نیتروژن مایع ارزیابی شد. با توجه به جدول ۳، اسپرم‌های رقیق‌شده با ۲/۵ میلی-مولار سیستئین پس از ۱۵ روز بهترین عملکرد را ازلحاظ قابلیت زنده‌مانی، نسبت به سایر دوزهای این اسیدآمینه و گروه کنترل داشت و تفاوت معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). قابلیت زنده‌مانی اسپرم‌های رقیق‌شده در زمان ۳۰ به‌مراتب پایین‌تر از زمان ۱۵ بود. سلامت و یکپارچگی غشاء اسپرم‌های رقیق‌شده با ۵ میلی‌مولار سیستئین بعد از ۱۵ روز ماندگاری در ازت مایع، بهترین عملکرد را در بین سایر دوزهای اسیدآمینه و گروه کنترل داشته است. کمترین درصد سلامت و یکپارچگی غشاء اسپرم در گروه کنترل بعد از ۳۰ روز مشاهده شد. همچنین کمترین ناهنجاری اسپرم‌ها در گروه ۷/۵ میلی-مولار سیستئین بعد از ۱۵ روز مشاهده شد (۱۸/۳٪) و بیشترین ناهنجاری اسپرم در گروه کنترل روز ۳۰ (۳۰/٦) بود و تفاوت معنی‌داری بین این دو با سایر گروه‌ها مشاهده شد (P<۰/۰۵).

نتایج جدول ٤ نشان داد که استفاده از رقیق‌کننده حاوی ۲/۵ میلی‌مولار سیستئین باعث افزایش تحرک کلی و حرکت پیشرونده اسپرم بعد از ۱۵ روز شد این در حالی است که افزایش عملکرد اسپرم بعد از ۳۰ روز کمتر از ۱۵ روز بود. با توجه به جدول ٤، سطح ۲/۵ میلی‌مولار سیستئین بعد از ۱۵ روز نگهداری در ازت مایع، باعث بهبود فراسنجه‌های LIN، VCL، VSL و ALH نسبت به سایر دوزهای آمینواسید در زمان‌های مختلف شد. در مورد سایر فاکتورهای کاسا تفاوت معنی‌داری بین دوزهای مختلف آمینواسید در زمان‌های مختلف یخ گشایی مشاهده نشد (P>۰/۰۵). به‌طورکلی با افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

مدت نگهداری در هر یک از دوزهای آمینواسید سیستئین کاهش محسوسی در فاکتورهای کاسا مشاهده شد.

جدول ۲- ویژگی‌های ارزیابی‌شده اولیه نمونه‌های منی پیش از انجماد

Table 2- The initial evaluation of semen characteristics before freezing

فراسنجه‌ها Parameters	میانگین Average	حداقل Minimum	حداکثر Maximum	انحراف معیار Standard deviation
غلظت اسپرم Sperm Concentration ($\times 10^9$/ml)	3.94	2.22	6	1.65
حرکت پیشرونده اسپرم Sperm progressive motility (%)	84.4	75	93	7.47
اسپرم غیرطبیعی Abnormal sperm (%)	6.78	3.6	9.1	2.19
زنده‌مانی Viability (%)	92.6	87	98	4.28
رنگ منی Semen color (0-5)	3.6	2	5	1.51
حجم منی Semen Volume (ml)	1.65	1	2.5	0.6

جدول ۳- اثر متقابل تیمار بازمان بر زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء و مورفولوژی اسپرم منجمد خروس

Table 3- The interaction effect of treatment with time on viability, membrane integrity and morphology of frozen rooster sperm

زمان (روز) Time (day)	تیمارها Treatments	زنده‌مانی Viability (%)	سلامت و یکپارچگی غشاء Sperm integrity (%)	اسپرم‌های غیرطبیعی Abnormal sperm morphology (%)
بعد از ۱۵ روز After 15 days	شاهد Control	54.7± 1.49^{d}	51.6± 0.99^{ef}	۸۹/۰±30.5^{a}
	۲/۵ میلی‌مولار سیستئین 2.5 mM cys	71.5± 0.38^{a}	59.3± 0.48^{ab}	24.7± 0.49^{cd}
	۵ میلی‌مولار سیستئین 5 mM cys	60.3± 0.03^{c}	60.9± 0.44^{a}	22.4± 0.47^{d}
	۷/۵ میلی‌مولار سیستئین 7.5 mM cys	65.3± 0.52^{b}	57.7± 0.70^{bc}	18.3± 1.36^{e}
بعد از ۳۰ روز After 30 days	شاهد Control	52± 0.60^{d}	49.1± 0.47^{f}	30.6± 0.43^{a}
	۲/۵ میلی‌مولار سیستئین 2.5 mM cys	64.2± 0.64^{b}	56.2± 0.64^{cd}	26.7± 1.03^{cb}
	۵ میلی‌مولار سیستئین 5 mM cys	54.4± 1.21^{d}	56.3± 1.44^{cd}	27.6± 0.91^{b}
	۷/۵ میلی‌مولار سیستین 7.5 mM cys	61.3± 1.09^{c}	53.7± 1.21^{de}	26.3± 0.93^{bc}
سطح معناداری P-Value		0.001	0.001	0.001

*داده‌ها شامل میانگین ±خطای استاندارد می‌باشند. ^{a,b,c,d}میانگین‌های با حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری دارند (p<۰/۰۵).

* Data are included means±standard error. ^{a,b,c,d} Means within the same line with different superscripts differ significantly (P<0.05).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- اثر متقابل تیمار بازمان بر پارامترهای حرکتی اسپرم منجمد خروس

Table 4- The interaction effect of treatment with time on post-thawed motility parameters of rooster sperm

زمان (روز) Time (day)	تیمار Treatment	تحرک کل Total Motility (%)	تحرک پیشرونده Progressive Motility (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	STR (%)	LIN (%)
بعد از ۱۵ روز After 15 days	شاهد Control	52.2± 0.83^{d}	25.5± 0.18^{ef}	31.4±1.30	16.1±0.17^{b}	48.5±0.55^{bc}	51.6±2.59	33.2±0.55^{abc}
	۲/۵ میلی‌مولار سیستئین 2.5 mM cys	68. 6± 0.32^{a}	41.3± 0.33^{a}	33.8±0.23	18.5±0.19^{a}	51.6±0.49^{a}	54.7±0.42	35.94±0.56^{a}
	۵ میلی‌مولار سیستئین 5 mM cys	57.3± 1.02^{c}	31± 0.95^{c}	32.7±0.36	17.4±0.53^{a}	49.3±1.12^{abc}	53.4±1.97	35.4±0.70^{ab}
	۷/۵ میلی‌مولار سیستئین 7.5 mM cys	62.4± 0.44^{b}	35.4± 0.49^{b}	33.5±0.52	18.1±0.13^{a}	50.09±0.51^{ab}	54.1±1.12	35.6±0.50^{a}
بعد از ۳۰ روز After 30 days	شاهد Control	48.9± 0.53^{e}	23.6±0.06^{f}	33.2±0.71	15.2 ±0.77^{b}	47.5±1.88^{c}	51±6.43	32.2±1.74^{c}
	۲/۵ میلی‌مولار سیستئین 2.5 mM cys	60.9± 0.68^{b}	34±0.65^{b}	31.2±1.73	18.1±0.11^{a}	50. 5±0.33^{ab}	54.4±0.62	35.86±0.35^{a}
	۵ میلی‌مولار سیستئین 5 mM cys	51.1± 0.32^{d}	26.5±1.17^{de}	33.4±0.34	15.7±0.33^{b}	48.1±0.69^{bc}	51.3±4.25	32.8±1.10^{bc}
	۷/۵ میلی‌مولار سیستئین 7.5 mM cys	58.4± 1.07^{c}	28.1±1.04^{d}	31.2±2.24	17.6±0.13^{a}	49.9±0.54^{abc}	53.1±1.03	35.3±0.43^{ab}
سطح معناداری P-Value		0.001	0.001	0.4470	0.001	0.0283	0.9730	0.0108

*داده‌ها شامل میانگین ±خطای استاندارد می‌باشند. ^{a,b,c,d}میانگین‌های با حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری دارند (p<۰/۰۵).

* Data are included means±standard error. ^{a,b,c,d} Means within the same line with different superscripts differ significantly (P<0.05).

بحث

سیستئین یک اسیدآمینه با وزن مولکولی پایین حاوی تیول بوده که پیش ساز گلوتاتیون داخل سلولی می‌باشد. این اسیدآمینه به‌راحتی از غشاء وارد سلول شده و باعث افزایش بیوسنتز گلوتاتیون داخل سلولی می‌شود که به علت خاصیت خنثی‌کنندگی غیرمستقیم رادیکال‌های آزاد از لیپیدها و پروتئین‌های غشایی محافظت می‌کند (جویان و همکاران ۲۰۱۱ و یوسال و بوکاک ۲۰۰۷). گلوتاتیون یک تری پپتید می‌باشد که حاوی آمینواسیدهای سیستئین، گلایسین و گلوتامیک اسید است. سنتز گلوتاتیون در شرایط برون‌تنی ممکن است به علت کمبود سیستئین در محیط کشت دچار نقص شود که این امر به علت ناپایداری بالای گلوتاتیون و اکسید شدن خود به خودی آن به سیستئین می‌باشد، سیستئین اثر حفاظتی در برابر انجماد در یکپارچگی عملکرد آکسوزوم و میتوکندری داشته و فعالیت حرکتی اسپرم را بعد از خروج از انجماد بهبود می‌بخشد (الششتاوی و همکاران ۲۰۰۸ و ساری اوزکان و همکاران ۲۰۰۹). پژوهش‌های متعددی در ارتباط با اثرات آنتی‌اکسیدانی سیستئین بر فرآیند انجماد اسپرم در گونه‌های مختلف پستانداران انجام‌شده است (الششتاوی و همکاران ۲۰۰۸، بهشتی و همکاران ۲۰۱۱، مایکل و همکاران ۲۰۱۰، ساری اوزکان

www.SID.ir

Archive of SID

و همکاران ۲۰۰۹ و یوسال و بوکاک ۲۰۰۷). بااین‌حال، گزارش‌های کمی در مورد تأثیر سیستئین بر روی اسپرم منجمد خروس وجود دارد.

قبلاً گزارش‌شده است که نگهداری اسپرم در حضور سیستئین تحرک اسپرم را بعد از انجماد بهبود می‌بخشد. در این آزمایش نیز سیستئین باعث افزایش درصد اسپرم‌های زنده و متحرک در مقایسه با گروه شاهد شد که با نتایج پژوهش‌های قبلی که بر روی گراز (کائوکت و همکاران ۲۰۱۰)، قوچ (جویان و همکاران ۲۰۱۱)، سگ (مایکل و همکاران ۲۰۱۰)، گاو (توپراق قلعه و همکاران ۲۰۱٤) و بز بوئر (ممون و همکاران ۲۰۱۲) انجام‌گرفته بود همخوانی داشت و همچنین با نتایج پارتیکا و همکاران (۲۰۱۳) که نشان می‌داد سیستئین (۵ میلی-مولار) باعث بهبود یکپارچگی غشاء اسپرم خروس می-شود نیز مطابقت داشت. بوکاک و همکاران (۲۰۰۹) گزارش دادند که افزودن سیستئین (۵ میلی‌مولار) و ترهالوز (۵۰ میلی‌مولار) باعث افزایش میزان اسپرم‌های متحرک و زنده قوچ بعد از فرایند انجماد–یخ گشایی شد. چاترجی و گاگنون (۲۰۰۱) گزارش دادند که افزودن گلوتاتیون احیاء شده به رقیق‌کننده انجماد اسپرم گاو باعث حذف رادیکال‌های آزاد تا میزان پنج برابر از محیط انجماد شد. گلوتاتیون احیاشده در طی واکنش با دو جایگاه سیستئینی در آنزیم تایروزین فسفاتاز باعث غیرفعال شدن این آنزیم می‌شود. آنزیم تایروزین فسفاتاز باعث خارج شدن کلسترول و فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم می‌شود. افزودن سیستئین، متیونین، کارنیتین، رافینوز، به رقیق‌کننده انجماد اسپرم گاو (تونجر و همکاران ۲۰۱۰) سبب جلوگیری از آسیب به DNA اسپرم می‌شود.

تخریب غشای پلاسمایی اسپرم یکی از دلایل اصلی کاهش باروری و تحرک سلول‌های اسپرم در طول فرایند حفاظت انجمادی می‌باشد (هالت ۲۰۰۰). عملکرد درست غشاء و تحرک اسپرم وابسته به هم بوده و فعالیت اسپرم منجمد و یخ گشایی شده از روی تحرک و سلامت غشای آن ارزیابی می‌شود که دو فاکتور مهم در باروری اسپرم می‌باشند. از طرفی اثبات‌شده که تیول‌هایی از قبیل گلوتاتیون و سیستئین مانع از دست رفتن فعالیت حرکتی اسپرم در مایع منی گاو بعد از خروج از انجماد شده و باعث بهبود زنده‌مانی، حفظ ساختار کروماتین و یکپارچگی اسپرم در طی ذخیره-سازی منی می‌شود (بهشتی و همکاران ۲۰۱۱).

نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش زمان ماندگاری اسپرم باعث افزایش در ناهنجاری اسپرم می‌شود و در نگهداری طولانی‌مدت، رقیق‌کننده حاوی ۷/۵ میلی‌مولار سیستئین نسبت به سایر دوزهای این آمینواسید اثر مثبت‌تری بر کاهش ناهنجاری اسپرم داشته و رقیق‌کننده حاوی ۵ میلی‌مولار سیستئین نیز بهترین عملکرد را در حفظ سلامت و یکپارچگی غشاء دارد. فانهاشی و همکاران (۲۰۰۵) گزارش دادند که سیستئین ۵ میلی‌مولار باعث بهبود زنده‌مانی اسپرم و سلامت آکروزم اسپرم خوک در طی نگهداری به‌صورت مایع در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد شد. بوکاک و همکاران (۲۰۰۷)، بیان کردند که در بین سطوح مختلف سیستئین (۵ و۱۰ میلی‌مولار)، ترهالوز، تائورین و هیالورونان، سیستئین (۵ mM) دارای بیشترین میزان اسپرم متحرک و زنده بعد از فرایند انجماد–یخ گشایی در قوچ بود. در مطالعه‌ای اثر آنتی‌اکسیدان‌های سیستئین ۲ میلی‌مولار و تائورین ۲ میلی‌مولار بر روی اسپرم گاو موردبررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که افزودن ۲ میلی‌مولار سیستئین منجر به تحرک بالاتر اسپرم گاو، نسبت به گروه‌های دیگر شد (ساری ازکان و همکاران ۲۰۰۹) که نتایج این پژوهش با نتایج حاصل از پژوهش ما در مورد افزایش تحرک اسپرم همخوانی داشت. مطابق با نتایج پژوهش احمدیان و همکاران (۲۰۱٤)، سطح پایین سیستئین در رقیق‌کننده بر پایه تریس بهترین پاسخ را در فرآیند انجماد–یخ گشایی اسپرم قوچ ایجاد می‌کند که با نتایج حاصل از پژوهش ما مطابقت دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

به‌هرحال لازم به ذکر است که نتایج این آزمایش با برخی دیگر پژوهش‌ها مغایرت دارد. بهشتی و همکاران (۲۰۱۱) و همچنین صالحی و رستمی (۲۰۱۳) بیان کردند که افزودن ۷/۵ میلی‌مولار سیستئین نسبت به ۲/۵ میلی-مولار باعث افزایش زنده‌مانی و تحرک اسپرم گاو پس از یخ گشایی شد که با نتایج ما مغایرت داشت که احتمال می‌رود دلیل این مغایرت مربوط تفاوت ویژگی‌های محیط نگهداری، گونه، پروسه انجماد و تفاوت در نوع رقیق-کننده استفاده‌شده و زرده تخم‌مرغ باشد. زرده تخم‌مرغ موجب کاهش تغییرات غشای سر و ناحیه‌ی میانی اسپرم می‌شود که برای تحرک و باروری حائز اهمیت است. مکانیسم اصلی حفاظت اسپرم با زرده تخم‌مرغ از طریق واکنش لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین موجود در زرده با پروتئین‌های متصل شونده به لیپید (BSP) می‌باشد، که این BSPها در منی وجود دارد و موجب حذف لیپیدهای غشا می‌شوند (برگرون و منجیوناس ۲۰۰۶ و سانتیاگو و همکاران ۲۰۱۲). علاوه بر اینکه در این پژوهش بجای زرده تخم‌مرغ از لیسیتین سویا استفاده‌شده بود، درصد گلیسرول نیز با پژوهش‌های انجام‌شده متفاوت بود. اسیدآمینه سیستئین به‌راحتی به درون غشاء سلول نفوذ کرده و به‌صورت غیرمستقیم باعث مهار رادیکال‌های آزاد می‌شود، علاوه بر این، سیستئین یک اثر محافظتی بر یکپارچگی عملکردی آکسوزوم و میتوکندری دارد (یوسال و بوکاک ۲۰۰۷). باوجوداینکه سیستئین یک اسیدآمینه غیرضروری است ولی نقش مهمی در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد دارد (بدر و همکاران ۲۰۱٤). نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از سیستئین با دوز ۲/۵ میلی‌مولار باعث بهبود کیفیت اسپرم خروس و صفات کاسا در طی مدت نگهداری شده است که با نتایج پارتیکا و همکاران (۲۰۱۵) که بیان کردند سیستئین باعث بهبود حرکت پیشرونده، زنده‌مانی و پارامترهای CASA در اسپرم خروس می شود، مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری کلی

با عنایت به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان اظهار کرد که سیستئین موجب بهبود کیفیت منی منجمد خروس شده و می‌توان اسپرم را با استفاده از سیستئین به مدت طولانی‌تری منجمد و نگهداری کرد.

منابع مورداستفاده

Ahmadian H, Moghaddam GH, Dolati P and Rafat A, 2014. Investigating the effects of adding different levels of L-glutamine and L-cysteine amino acids to Tris-based diluents on the survival of ram sperms frozen in the breeding season. MSc thesis, University of Tabriz (In Persian).

Akhlaghi A, Ahangari YJ, Zhandi M and Peebles E, 2014. Reproductive performance, semen quality, and fatty acid profile of spermatozoa in senescent broiler breeder roosters as enhanced by the long-term feeding of dried apple pomace. Animal Reproduction Science 147: 64–73.

Amini MR, Kohram H, Shahaneh AZ, Zhandi M, Sharideh H and Nabi MM, 2015a. The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. Cell Tissue Bank 16: 587–592.

Amini MR, Kohram H, Zare-Shahaneh A, Zhandi M, Sharideh H and Nabi MM, 2015b. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. Cryobiology 70: 226–232.

Badr MR, Azab AMS and Rawash ZM, 2014. Effect of Trehalose, Cysteine and Hypotaurine on Buffalo Bull Sperm Freezability, Ultrastructure Changes and Fertilizing Potentials. Assiut Veterinary Medical Journal 60: 38-45.

Beheshti R, Asadi A, Eshratkhah B, Ghiasi GhaleKandi j and Ghorban A, 2011. The Effect of Cysteine on Post-thawed Buffalo Bull (Bubalus Bubalis) Sperm Parameters. Advances in Environmental Biology 5(6): 1260-1263.

www.SID.ir

Archive of SID

Bakst MR, 2010. Physiology and endocrinology symposium: Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. Journal of Animal Science 89(5): 1323-1329.

Barbas JP and Mascarenhas RD, 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell and tissue banking 10(1): 49-62.

Bergeron A and Manjunath P, 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Molecular reproduction and development 73(10): 1338-1344.

Bucak MN, Atessahin A, Varıslı O, Yuce A, Tekin N and Akcay A, 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after the freeze–thawing process. Theriogenology 67(5): 1060–1067.

Bucak MN, Tuncer PB, Sariozkan S, Ulutas PA, Coyan K and Baspinar N, 2009. Effects of hypotaurine, cysteamine and amino acids solution on post-thawed microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. Research in Veterinary Science 87(3):468-72.

Burrows WH and Quinn JP, 1937. The Collection of Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey. Poultry Science 16: 19-24.

Chatterjee S and Gagnon C, 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. Molecular Reproduction and Development 59:000 451–458.

Coyan K, Baspınar N, Bucak MN and Peker Akalın P, 2011. Effects of cysteine and ergothioneine on post thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. Cryobiology 63:1–6.

El-Sheshtawy RI, El-Sisy GA, and El-Nattat WS, 2008. Use of selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. Global Veterinary 2(4): 146-150.

Farshad A and Hosseini Y, 2013. The cryoprotective effects of amino acids supplementation on cooled and post-thaw Markhoz bucks semen quality. Small Ruminant Research 114: 258–263.

Funahashi H and Sano T, 2005. Select antioxidants improve the function of extender boar semen stored at 10˚c. Theriogenology 6:1605-1616.

Holt WV, 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science 62: 3-22.

Kaeoket K, Chanapiwat P, Tummaruk P and Techakumphu M, 2010. Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen. Asian Journal of Andrology 12: 760-765.

Khalili B, Jafaroghli M, Farshad A and Paresh-khiavi M, 2010. The Effects of Different Concentrations of Glycine and Cysteine on the Freezability of Moghani Ram Spermatozoa. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 23(3): 318-325.

Long JA, 2006. Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? Poultry Science
85: 232–236.

Long JA and Kramer M, 2003. Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. Poultry Science 82(11): 1802-1807.

Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM and Ebrahimi M, Nadia FM, 2012. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. Animal Reproduction Science 136: 55-60.

Mercado ED, Hernandez M, Sanz E, Rodriquez A, Gomaz E, Vazquez JM, Martinez EA and Roca J, 2009. Evaluation of l-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. Animal Reproduction Science 115: 149–157.

Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN and Boscos CM, 2010. Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Reproduction of Domestic Animal 45(2):201-207.

Nabi MM, Kohram H, Yegane HM, Shahne AZ, Sharideh H and Esmaili V, 2015. Comparative evaluation of Nabi and Beltsville extenders for cryopreservation of rooster semen, Cryobiology 72 (1): 47-52.

Partyka A, Lukaszewicz E and Nizanski W, 2012. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. Theriogenology 77: 1497–1504.

Partyka A, Nizanski W, Bajzert J, Lukaszewicz E and Ochota M, 2013. The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. Cryobiology 67: 132-136.

Partyka A, Niżański W, Bratkowska M and Maślikowski P, 2015. Effects of N acetyl-L-cysteine and catalase on the viability and motility of chicken sperm during liquid storage. Reproductive Biology 15: 126-129.

www.SID.ir

Archive of SID

Perumal P, Selvaraju S, Selvakumar S, Barik AK, Mohanty DN, Das S, Das RK and Mishra PC, 2011. Effect of Pre-freeze Addition of Cysteine Hydrochloride and Reduced Glutathione in Semen of Crossbred Jersey Bulls on Sperm Parameters and Conception Rates. Journal Reproduction Domestics Animal 46: 636-641.

Safa S, Mogaddam GH, Jafari Jozani R, Daghigh Kia H and Janmohammadi H, 2016. Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. Animal reproduction Science 174: 100-106.

Salehi-Moharrar S and Karnam-Rostami M, 2013. Evaluation the effects of vitamin E and cysteine on microscopic parameters of bovine semen after freeze-thawing with Tris-Yolk extender. The 2nd National Conference on Modern Issues in Agriculture, Islamic Azad University of Saveh (In Persian).

Santiago-Moreno J, Casta˜no C, Coloma M, Gómez-Brunet A, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A and Campo J, 2009. Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. Poultry Science 88: 2661–2669.

Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Coloma MA, López-Sebastián A, Prieto M and Campo JL, 2012. Cryoprotective and contraceptive properties of egg yolk as an additive in rooster sperm diluents. Cryobiology 65: 230–234.

Sariozkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutas PA and Bilgen A, 2009. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. Cryobiology 58:134 –138.

Schäfer S and Holzmann A, 2000. The use of transmigration and Spermac^{TM} stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. Animal Reproduction Science 59: 201–211.

Sexton TJ and Fewlass TA, 1978. A new poultry semen extender: 2. Effect of the extender components on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5°C. Poultry Science 57:277–284.

Siudzin´ska A and Tukaszewicz E, 2008. Effect of Semen Extenders and Storage Time on Sperm Morphology of Four Chicken Breeds. The Journal of Applied Poultry Research 17:101–108.

Surai P, Fujihara N, Speake B, Brillard J, Wishart G and Sparks N, 2001. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 14: 1024–1050.

Topraggaleh TR, Shahverdi A, Rastegarnia A, Ebrahimi B, Shafiepour V, Sharbatoghli M, Esmaeili V and Janzamin E, 2014. Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of buffalo bull. Andrology 46: 777–783.

Tuncer PB, Bucak MN, Buyukleblebici S, Sariozkan S, Yeni D, Eken A, P.Akalin P, Kinet H, Advatek F, Fiden AF and Gundogan M, 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. Cryobiology 61: 303–307.

Uysal O and Bucak MN, 2007. Effects of oxidized Glutathione, Bovine serum albumin, Cysteine and Lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. Acta Veterinaria 76:383-390.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of frozen-thawed rooster sperm quality parameters in extender containing L-cysteine

A Bakhshayesh Khiabani[1] and Gh Moghaddam[2*]

Received: February 14, 2017 Accepted: July 1, 2017
[1]MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz,Tabriz, Iran
[2]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: ghmogaddam@tabrizu.ac.ir

Introduction: Cryopreservation of the sperm causes irreversible damage to the sperm cell. The main reason of abnormal spermatozoa during storage at low temperatures are the occurrence of lipid peroxidation (LPO), production of reactive oxygen species and antioxidants imbalances (Tuncer et al. 2010). Also, factors such as the formation of ice crystals, production of reactive oxygen species, temperature changes, lipid peroxidation, changes in membrane composition, chemical toxicity due to cryoprotectants and osmotic stress, reduce the quality of sperm after thawing (Barbas and Mascarenhas 2009). The addition of antioxidants to the diluent of bird sperm during the freezing process reduces damage to sperm and maintains motility and viability rate of sperms after its thawing, which might affect the development of artificial insemination in birds. Cysteine is a sulfur-containing amino acid with antioxidant properties that can easily penetrate the cell membrane and increases the biosynthesis of intracellular glutathione and eliminates the free oxygen radicals (Kaeoket et al. 2010, Sariozkan et al. 2009). In recent years, researchers found that the use of cysteine as an antioxidant in the freezing of various mammalian sperm (Bucak et al. 2009; Tuncer et al. 2010) improve the mobility and the viability of frozen-thawed sperm.
Materials and methods: In this study, after two weeks of adaptation period, semen was collected from eight mature roosters (Ross 308). Initial semen assessments such as volume, progressive motility, concentration, viability, and percentage of abnormal sperm were conducted in the laboratory. Next, the samples with standard quality were split into four equal aliquots and diluted (1:30; v/v) with basic extender supplemented by different concentrations of cysteine (2.5, 5 and 7.5 Mm) at 37 ˚C. In this experiment, freezing procedure was conducted in two steps. So that the 3ml of extender containing different concentrations of cysteine and semen samples, were cooled slowly at 5◦C for 2 h to reach thermal equilibrium. Then, 1 ml of the semen extender (precooled to 5◦C) was added to the semen (extender plus semen) to provide a final concentration of 100×10^6 sperm/ml and 8% glycerol at a temperature of 5℃. Immediately after 1 h the sample was loaded into 0.25 mL straws (IMV, L'Aigle, France). Then, the straws were frozen in liquid nitrogen vapor, 4 cm above the liquid nitrogen, for 7 min, and plunged into liquid nitrogen for storage. After storing, the samples were evaluated twice with an interval of 15 days and frozen straws were thawed individually at 37℃ for 30 min in a water bath and then evaluated individually.
Results and discussion: The quality of sperms in the present work was evaluated after keeping them for 15 and 30 days in liquid nitrogen. The results of this study showed that the sample diluted with 2.5 mM of cysteine indicate the highest viability performance in keeping for 15 days in the liquid nitrogen compared to the control group and samples with other dosages of this amino acid (P<0/05). The viability of the sperms diluted for 30 days is considerably lower than that of those diluted during 15 days. The integrity of the membrane of sperms diluted with 5 mM of cysteine stored in liquid nitrogen for 15 days indicate the best performance compared to the samples with other dosages of amino acid and the control group (Table 3). Based on the Table 3, the minimum abnormality of sperms was seen in the group treated with 7.5 mM of cysteine for 15 days (18.3%) while the maximum sperm abnormality was for the sperm in control group of day 30 (30.6%). Moreover, results of table 4 indicated that the samples with 2.5 mM of cysteine had the best performance in terms of total and progressive motilities among other treatments and control group

www.SID.ir

Archive of SID

(P<0/05). It has been reported that sperm storage in the presence of cysteine improves sperm motility after freezing. In this experiment, cysteine increased the viability and motility of sperm compared to the control group, which were consistent with the results of previous studies on boar (Kaeoket et al. 2010), ram (Coyan et al. 2011), dog (Michael et al. 2010) Cow (Topraggaleh et al. 2014) and Goat (Memon et al. 2012). Moreover, the results of this study was agree with Partyka and et al. 2013 that proposed the cysteine (5 mM) improves the integrity of the rooster sperm membrane. Bucak et al. (2009) reported that the addition of cysteine (5 mM) and terhalose (50 mM) increased the amount of live and motile ram sperm after freezing-thawing process. According to the results of Ahmadian et al. (2014), the low level of cysteine in the thrice-based diluent provides the best response in the process of freezing-thawing of ram sperm, which is consistent with the results of our research.

Conclusion: it was concluded that the cysteine improves semen quality and facilitates freezing rooster sperm for longer periods.

Keywords: Amino acid, Cysteine, Sperm, Rooster

www.SID.ir