نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۰، پاییز ۱۳۹۷
ص‌ص: ۵۹~۷۰

بررسی تأثیر افزودن سطوح مختلف سولفات روی بر عملکرد اسپرم قوچ قزل طی فرآیند انجماد–یخ گشایی در خارج فصل تولیدمثلی

- **حسین دقیق کیا** (نویسنده مسئول)
استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
- **سپهر جعفری**
دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

تاریخ دریافت : مرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش : آذر ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۳۳۳۹۲۰۶۲-۰۴۱
Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2017.114842.1499

چکیده

هدف از این مطالعه مقایسه اثر سطوح مختلف سولفات روی بمنظور بهبود کیفیت منی قوچ طی فرآیند انجماد – یخ گشایی در خارج از فصل تولیدمثلی بود. از پنج رأس قوچ قزل هفته‌ای دو بار و توسط واژن مصنوعی اسپرم‌گیری انجام شد. نمونه‌های اسپرم به چهار گروه تیماری مشتمل بر: شاهد، ۱۷/۵، ۳۵ و ۵۲/۵ میکرومول سولفات روی اختصاص داده شده و سپس فرآیند انجماد انجام گرفت. بعد از یخ‌گشایی نمونه‌های اسپرم از نظر جنبایی، مورفولوژی ومیزان مالون‌دی‌آلدهید مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان دهنده بیشترین میزان حرکت کل و پیش رونده در اسپرم‌های حاوی سطح ۱۷/۵ میکرومول سولفات روی بود که در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بودند (P<۰/۰۵). اختلاف معنی‌داری در مورفولوژی اسپرم در گروه دریافت کننده ۵۲/۵ میکرومول سولفات روی در مقایسه با گروه شاهد وجود داشت، که سطح ۵۲/۵ باعث افزایش اسپرم غیرنرمال شده بود (P<۰/۰۵). افزودن ۱۷/۵ میکرومول از سولفات روی باعث افزایش غیرمعنی‌دار زنده‌مانی اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل شد، اما افزودن ۳۵ و ۵۲/۵ میکرومول باعث کاهش معنی‌دار آن شد (P<۰/۰۵). درصد تولید مالون‌دی‌آلدهید در سطح ۳۵ از سایر گروه‌های تیماری و گروه شاهد کمتر بود و بین گروه ۱۷/۵ و ۳۵ در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت استفاده از سطح ۱۷/۵ و ۳۵ سولفات روی در رقیق‌کننده منی قوچ قزل سبب بهبود برخی فراسنجه‌های اسپرم بعد از فرآیند انجماد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، انجماد–یخ‌گشایی، سولفات روی، قوچ

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 120 pp: 59-70

The effect of adding different levels of zinc sulfate on Ghezel ram sperm function during the freeze-thawing process in out of breeding season

By: Daghigh Kia[1]* H. and S. Jafari[2]
1: Professor, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2: MSc Graduated, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: July 2017 **Accepted: November 2017**

The purpose of this study was to compare the effect of different levels of zinc sulfate on improving the quality of ram semen during freeze-thawing process outside of the reproductive season. Semen samples were collected from five *Ghezel* ram twice a week using the artificial vagina. Sperm samples were assigned to four treatment groups including: control, 17.5, 35 and 52.5 µm zinc sulfate, and then the freezing process was performed. After thawing motility, morphology and malondialdehyde levels of sperm were studied. Total and progressive motility of sperm containing the 17.5 µmol/ml zinc sulfate were significantly higher than control group ($P < 0.05$). There was a significant difference in sperm morphology in the group receiving 52.5 µmol of zinc sulfate compared to the control group, which caused 52.5% increase in abnormal sperm ($P < 0.05$). Adding 17.5 µmol of zinc sulfate increased unsignificantly the viability of sperms compared to the control group, but adding 35 and 52.5 µmol decreased significantly ($P < 0.05$). The level of malondialdehyde production in the 35 µmol was lower than the other treatment groups and the control group and there was a significant difference between the groups 17.5 and 35 in comparison with the control group ($P < 0.05$). Therefore, it can be concluded that the use of 17.5 and 35 µmol Zinc sulfate in Ghezel ram diluent semen improves some of the parameters of the sperm after the freeze-thawing process.

Key words: Sperm, Freeze-thawing, Zinc sulfate, Ram.

مقدمه

گوسفند قزل یکی از نژادهای دنبه دار، گوشتی- شیری می‌باشد، رنگ عمومی بدن قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره با تنوع رنگ، بیشتر در دامنه های سهند و بخصوص در منطقه میاندوآب پرورش داده می‌شود و در مناطق غربی و جنوبی آذربایجان شرقی تا حوالی دریاچه ارومیه گسترش دارد. درصد دوقلوزائی در این نژاد نسبتاً بالاست، میانگین وزن قوچ ۸۱/۶ کیلوگرم و میش ۵۳/۶ کیلوگرم می-باشد (سعادت نوری و سیاه منصور، ۱۳۸۰). انجماد اسپرم باعث توقف واکنش‌های متابولیکی آن می‌شود. با کاهش و یا توقف متابولیسم اسپرم طول عمر آن افزایش می‌یابد و در نتیجه می‌توان از آنها برای مدت زمان طولانی‌تری استفاده نمود. حفظ انجمادی اسپرم تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی را در غشای اسپرم به وجود می‌آورد که در نتیجه آن ظرفیت باروری اسپرم بعد از انجماد-یخ‌گشایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Hidiroglou و همکاران، ۱۹۸۴). از جمله عواملی که می‌توانند موجب تخریب غشای پلاسمایی، اختلال در جنبایی و دیگر فعالیت‌های اسپرم شوند، رادیکال‌های آزاد (ROS) هستند. تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و ظرفیت آنتی اکسیدانی سلول همیشه باید برقرار باشد. بر هم خوردن این تعادل باعث استرس اکسیداتیو می‌شود (Bansal و Bilaspuri، ۲۰۱۰). وقتی اسپرم‌ها طی محافظت سرمایی در معرض آسیب قرار می‌گیرند شرایط برای

تولید ROS افزایش می‌یابد و از طرف دیگر کمبود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در منی رقیق شده شرایط را آسیب‌پذیرتر می‌نماید. غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها در فرآیند رقیق-سازی کاهش قابل توجهی می‌یابد، از طرف دیگر اسپرم پستانداران ظرفیت آنتی اکسیدانی سیتوپلاسمی خود را از دست داده است و در نتیجه در مقابله با آثار زیان بار رادیکال‌های فعال اکسیژنی و پراکسیداسیون لیپیدی ضعیف است (Ijaz و همکاران، ۲۰۰۹). نقش فیزیولوژیکی ROS در ظرفیت‌پذیری اسپرم، واکنش آکروزومی و هم‌جوشی تخمک می‌باشد. مهم‌ترین رادیکال‌های آزاد پراکسیدهیدروژن، آنیون سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل هستند (Ebisch و همکاران، ۲۰۰۷). روی در حفاظت از ساختار ژنتیکی مواد و کروماتین DNA در هسته اسپرم کمک می‌کند. بسیاری از مکانیسم‌های بیوشیمیایی بدن وابسته به روی و به عنوان کوفاکتور برای بیش از ۲۰۰ آنزیم عمل می‌کند و در رونویسی DNA و سنتز پروتئین شرکت می‌کند(Arabi، ۲۰۰۵) روی یکی از عوامل کمکی در سیستم آنتی اکسیدانی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است که سبب دیسموتاسیون آنیون سوپراکساید ناشی از متابولیسم هوازی می‌شود و آن را به هیدروژن پراکساید تبدیل می‌کند. روی علاوه بر نقش کوفاکتوری برای سوپراکسیددیسموتاز با القای سیگنال‌های پاسخ به تنش در مقابله با استرس اکسیداتیو نقش دارد (Ijaz و همکاران، ۲۰۰۹). روی بطور برگشت‌پذیری به اسیدهای چرب غیراشباع زنجیر بلند متصل به فسفولیپیدهای غشایی مانند اسید آراشیدونیک متصل می‌شود (Hammadeh و همکاران، ۲۰۰۹).

روی در ثابت ماندن کروماتین اسپرم و ترمیم آسیب وارد شده به DNAدخالت دارد. گونه‌های اکسیژن فعال(ROS) آزاد شده از میتوکندری‌های اسپرم هنگام انجماد، باعث تولید مواد حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود که باعث از هم جدا شدن رشته‌های DNAمی‌شوند. این فرآیند با توان آنتی اکسیدانی روی متوقف می‌شود. روی در حفظ چربی‌ها به حالت مایع اثر داشته و به این ترتیب در پایداری غشاء سلولی موجودات زنده، از جمله اسپرماتوزوئیدها، اثر دارد (Barratt و همکاران، ۲۰۱۰).

اضافه کردن روی باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی اسپرم می‌شود و لیپیدهای غشای اسپرم را از پراکسیداسیون محافظت می‌کند (Hida و همکاران، ۱۹۹۵). غلظت روی مایع منی ارتباط مستقیم با جنبایی، زنده‌مانی و ریخت شناسی طبیعی اسپرم‌ها دارد (Aitken، ۱۹۹۵) با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی روی و همچنین به دلیل اینکه در بدن به‌طور طبیعی این ماده به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی عمل می‌کنند، ما در این تحقیق از این آنتی‌اکسیدان استفاده کردیم چون انتظار اثرات مثبت و مناسب بر کیفیت اسپرم در طول فرآیند انجماد یخ‌گشایی داشتیم. تاکنون گزارشی در رابطه با تأثیر سولفات روی بر فراسنجه‌های بعد از یخ‌گشایی اسپرم قوچ در خارج فصل تولیدمثلی صورت نگرفته است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشگاه تبریز انجام گرفت. رقیق‌کنندهٔ استفاده شده در این پژوهش رقیق‌کنندهٔ لسیتین (P3644 Sigma) بود و سولفات روی (۱۰۸۸۸۱، Merck) هفت آبه بعنوان آنتی اکسیدان استفاده شد. نمونه‌های منی بوسیله واژن مصنوعی از ۵ رأس قوچ قزل بالغ در فصل غیرتولیدمثل (اواخر پاییز و زمستان) جمع آوری شد. هفته‌ای دو بار اسپرم‌گیری انجام می‌گرفت. نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه و بررسی فراسنجه های حرکتی ریخت‌شناسی و غلظت نمونه‌های منی استحصالی، به منظور حذف اثرفردی دام با یکدیگر مخلوط و در رقیق کننده‌های تریس(۱۰۸۳۸۷، Merck)-لسیتین رقیق می‌شدند. قبل از افزودن آنتی اکسیدان‌ها خصوصیات کمی و کیفی نمونه‌های منی تازه از قبیل حجم منی، غلظت، حرکت پیش رونده و اسپرم‌های با شکل غیرنرمال ارزیابی شدند.

روش انجماد و یخ‌گشایی اسپرم

تیمارهای آزمایشی حاوی ۳ سطح (۱۷/۵-۳۵-۵۲/۵ میکرومول در میلی‌لیتر) سولفات روی بودند. همچنین یک تیمار کنترل که فاقد هرگونه آنتی اکسیدان افزودنی بود، مورد استفاده قرارگرفت. در نهایت رقیق کننده (تریس۲/۷۱ گرم در میلی‌لیتر،

اسید سیتریک ۱/۴ گرم در میلی‌لیتر ، فروکتوز یک گرم در میلی-لیتر ، گلیسرول ۷ درصد) و محلول آنتی اکسیدانی به مایع منی اضافه شده و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه سانتیگراد متعادل‌سازی شده و بعد در ارتفاع ۴ سانتیمتری بالای بخار ازت به مدت ۷ دقیقه منجمد شده و در آخر به صورت غوطه ور در ازت مایع ذخیره شدند. برای یخ‌گشایی منی پس از بیرون آوردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، پایوت‌ها ۳۰ ثانیه در آب ۳۷°C گذاشته شد. برای ارزیابی سه پایوت یخ‌گشایی شد. سپس محتوای اسپرم به درون میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری ریخته شد و فراسنجه های اسپرم ارزیابی شد.

تحرک اسپرم

اولین پارامترهای مورد ارزیابی پس از انجماد-یخ‌گشایی بررسی تحرک کل[1]، تحرک پیش‌رونده، سرعت در مسیر منحنی[2]، سرعت در مسیر مستقیم[3]، سرعت در مسیر میانگین[4]، خطی بودن جنبانی[5]، حداکثر دامنه حرکات‌جانبی سر اسپرم[6]، معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم[7]، بسامد حرکات جانبی سر[8] بود. با استفاده از سمپلر ۵ میکرولیتر از نمونه روی لام گذاشته و یک لامل تمیز بر روی آن گذاشته شد، لام موردنظر با استفاده از میکروسکوپ مجهز به سیستم آنالیز رایانه‌ای اسپرم (CASA[9], VideoTesT-Sperm 3.1, Russia) در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه تبریز بررسی شد. از هر نمونه حداقل ۱۰ فیلد بطور کاملاً تصادفی انتخاب شده و پارامترهای تحرک ۲۰۰ اسپرم بوسیله سیستم CASA، بوسیله عکس برداری با بزرگنمایی ۱۰۰× آنالیز شدند .

زنده‌مانی

زنده‌مانی اسپرم‌ها با روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین مورد بررسی قرار گرفت. برای اینکار مقداری از نمونه منی با سمپلر برداشته و روی یک لام گذاشته شد و ۲ برابر حجم نمونه 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. اسپرم‌های رنگ‌آمیزی شده در ۵ ناحیه با بزرگنمایی ×۴۰۰ با میکروسکوپ بررسی شدند. اسپرم‌های مرده به علت تغییر در ساختار غشاء رنگ را به خود جذب می‌کنند و اسپرم‌های زنده مانع ورود رنگ به درون غشاء می‌شوند و رنگ نمی‌گیرند بطوریکه اسپرم‌های زنده دارای سرسفید و سر اسپرم‌های مرده بطور کامل قرمز یا کمی رنگ گرفته است (Mehdipour و همکاران، ۲۰۱۶).

ارزیابی یکپارچگی غشاء پلاسمایی (HOST)[10]

تست هیپواسموتیک برای ارزیابی سلامت غشاء اسپرم پس از انجماد- یخ‌گشایی استفاده شد. زمانی که اسپرم در محیط هایپوتونیک قرار می‌گیرد، اگر از لحاظ 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 فرا گرفته متورم می‌شود و دم دچار پیچ‌خوردگی می‌شود. دم اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالم ندارند، پیچ نمی‌خورد. اسپرم‌هایی که به این تست پاسخ مثبت می‌دهند زنده هستند. انجام تست با مخلوط کردن ۳۰ میکرولیتر از مایع منی با ۳۰۰ میکرولیتر محلول هایپواسموتیک ۱۰۰ mOsm/kg که حاوی فروکتوز (۹گرم/لیتر) و سیترات سدیم (۹/۴ گرم/لیتر) بود انجام شد. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷°C انکوبه شد. سپس قطره کوچکی از نمونه مخلوط شده، روی لام از پیش هم دما شده قرار داده و با لامل پوشانده شد و بلافاصله زیر میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) مورد بررسی قرار گرفت (۴۰۰× بزرگنمایی). در نهایت، ۲۰۰ اسپرم با دم متورم و غیرمتورم ثبت شد. اسپرم‌های با دم متورم و تاب

[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] Beat cross frequency(BCF)
[9] Computer-assisted sperm analysis
[10] Hypo-osmotic swelling test

خورده به عنوان اسپرم‌های با غشاء پلاسمایی سالم در نظر گرفته شدند (Mehdipour و همکاران، ۲۰۱۷).

ارزیابی مورفولوژی اسپرم (تست هانکوک)

برای ارزیابی اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی ۱۵میکرولیتر از هر نمونه یخ-گشایی شده به میکروتیوب‌های حاوی ۱۵۰ میکرولیتر محلول هانکوک که شامل فرمالین ۳۷ درصد (۶۲/۵ میلی‌لیتر)، محلول سالین (۱۵۰ میلی‌لیتر)، محلول بافرفسفات (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 اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰×، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه گردید (Najafi و همکاران، ۲۰۱۷).

مالون دی آلدئید

برای بررسی غلظت مالون دی آلدئید در این پژوهش از اسید تیوباربیتوریک استفاده شد. ۱ میلی لیتر از هر نمونهٔ منی با ۱ میلی لیتر اتیلن دی آمین ترا استیک اسید(EDTA[11]) و ۱ میلی-لیتر بوتیلات هیدروکسی تولوئن(BHT[12]) و ۲ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک اسید (TCA[13]) با هم مخلوط و در لولهٔ مخروط ریخته شدند. لوله‌ها در ۱۲۰۰×g برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ شدن، ۱میلی لیتر از محلول بالای لوله با ۱ میلی لیتر تیوباربیتوریک‌اسید(TBA[14]) در میکروتیوب آمیخته شدند. لوله‌ها ۲۰ دقیقه در بن ماری ۹۵°C قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند. جذب نوری نمونه‌های مختلف به طول موج ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتری (T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) یادداشت شد و در پایان غلظت مالون‌دی‌آلدئید محاسبه شد (Najafi و همکاران، ۲۰۱۳).

تست سلامت کروماتین و DNA اسپرم

بررسی سلامت کروماتین و DNA اسپرم با تست بررسی ساختار کروماتینی اسپرم SCSA[15] و دستگاه فلوسایتومتری انجام شد. محتوای پایوت اسپرم بعد از یخ‌گشایی داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۵ دقیقه با دورg ۵۰۰ سانتریفیوژ شد. بخش رویی به آرامی برداشته و دور ریخته شد. پلیت اسپرم باقیمانده در ۲ میلی‌لیتر بافر (۰/۱۵ میلی مول NaCl، ۱ میلی مول اتیلن دی آمین ترا استیک اسید و ۱۰ میلی مولار تریس) در pH= ۷/۲ حل شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول برداشته و به آن ۴۰۰ میکرولیتر محلول اسیدی (۰/۱ درصد تریتون X-100 در ۰/۰۸ مول اسید هیدروکلریک و ۰/۱۵ مول کلرید سدیم اضافه شد. بعد از ۳۰ ثانیه ۱۲۰۰ میکرولیتر آکریدین اورانژ (شامل ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول هیدروکلرید آکریدین اورانژ در ۰/۱۵ مول کلرید سدیم ، ۱ میلی مول لیتر اتیلن دی آمین ترا استیک اسید ،۰/۷ میلی‌مول‌سدیم‌دی فسفات (Na_2HPO_4[16]) و ۰/۱ میلی‌مول اسیدسیتریک) در pH=۶ اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه اسپرم‌ها با دستگاه فلوسایتومتری ارزیابی شدند. فلورسنت سبز نشان‌دهنده اسپرم با DNA سالم و فلورسنت قرمز نشان‌دهنده اسپرم دارای DNA آسیب‌دیده در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری

نتایج حاصل از آزمایش فوق در قالب طرح کاملا تصادفی به وسیله نرم افزار SAS و با استفاده از Proc GLM آنالیز و سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد. مدل آماری طرح به شرح زیر بود:

$Yi=\mu+Ti+ei$

Yi: مشاهدات

μ: میانگین

Ti: اثر تیمار i ام (i=1, 2, 3, 4)

ei: اثرات باقیمانده

[11] Ethylenediaminetetraacetic acid

[12] Butylated hydroxytoluene

[13] Trichloro acetic acid

[14] Thiobarbituric acid

[15] - Sperm Chromatin Structure Assay

[16] Sodium phosphate dibasic

نتایج و بحث

در ارتباط با سولفات روی، اکثر پژوهش‌های انجام شده بصورت مکمل خوراکی در جیره حیوانات مورد استفاده قرار گرفته و بعنوان آنتی‌اکسیدان نیز در گونه‌های دیگر مورد آزمایش قرارگرفته است (فرهادی و همکاران، ۱۳۹۳) اما بر روی کیفیت منی قوچ تا امروز تحقیقی انجام نگرفته است و این آزمایش برای نخستین بار روی کیفیت منی قوچ و در رقیق‌کننده بر پایه تریس لسیتین انجام پذیرفت.

بر اساس جدول ۱، نتایج تحقیق نشان داد که اثر سطوح مختلف سولفات روی بر تحرک کل اسپرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در این بررسی محیط‌های حاوی سولفات روی با سطح ۱۷/۵ میکرومول بر درصد جنبایی کل اسپرم اثر افزایشی معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). سطح ۳۵ میکرومول و ۷۰ میکرومول در هر دو فراسنجه در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبودند. در فراسنجه تحرک پیش‌رونده در سطح ۱۷/۵ نسبت به گروه شاهد از نظر درصد تحرک افزایش پیدا کرد اما معنی دار نبود، درسایر سطوح نیز تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. با توجه به جدول ۱ اثر سولفات روی بر فراسنجه سرعت مسیر مستقیم (VSL) و سرعت در مسیر میانگین (VAP) معنی‌دار نبود اگرچه در سطح ۱۷/۵ سولفات روی این فراسنجه‌ها افزایش یافتند. اثر سولفات روی بر فراسنجه سرعت مسیر واقعی در سطح ۱۷/۵ افزایش یافت اما در سطوح ۳۵ و ۵۲/۵ در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). اثر سولفات روی بر درصد WOB[17] (حرکات جانبی سر اسپرم) در سطح ۵۲/۵ میکرومولار سولفات روی اثر معنی‌دار در این فراسنجه‌ها داشت و درصد WOBدر این سطح افزایش یافت در فراسنجه STR سطح ۱۷/۵ افزایش معنی‌دار پیدا کرد. در فراسنجه‌های ALH وMAD و BCF و LIN اثر معنی‌داری مشاهده نشد.

از آنجائیکه تحرک اسپرم در فرآیند انجماد و یخ‌گشایی بسیار تحت تأثیر قرار می‌گیرد، معمولاً بعنوان یک فراسنجه قابل‌اعتماد برای ارزیابی پروتکل انجماد در نظر گرفته می‌شود. این نتایج مشابه با نتایج کومار و همکاران بود. در مطالعه کومار و همکاران در سال ۲۰۰۶، اثر سطوح مکمل روی بر فراسنجه های کمی و کیفی اسپرم و سطح تستوسترون سرم خون گاو نر مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که مصرف مکمل روی در قالب معدنی (سولفات روی) و فرم آلی (پروپیونات روی) سبب افزایش کیفیت اسپرم گاو در مقایسه با گروه شاهد شد. مکمل روی در جیره غذایی گاو در درصد تحرک کل افزایش معنی‌دار نشان داد. همچنین نتایج مطالعه حاضر مشابه با نتایج گزارش‌های wong و همکاران (۲۰۰۱) بر روی اسپرم مردان، Kendall و همکاران (۲۰۰۰) بر روی اسپرم قوچ و Tharwat بر روی اسپرم خرگوش نر (۱۹۹۸) بود.

Eickhoff و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش دادند عامل مهارکننده مهاجرت ماکروفاژها نقش مهمی در فرآیند بلوغ اسپرم موش هنگام عبور از اپیدیدیم دارد که با آغاز کم شدن روی و اثر بر عامل سولفیدریل در تاژک صورت می‌گیرد و باعث شروع تحرک در اسپرم می‌گردد.

در پژوهشی که روی اسپرم گاو انجام شده نتایج نشان داد که سولفات روی بر جنبایی و تحرک اسپرم اثر معنی‌داری ندارد (فرهادی و همکاران، ۱۳۹۳) و این نتایج در تضاد با نتایج بدست آمده مطالعه ما بود. دلیل این اختلاف را می‌تواند به تفاوت نوع گونه و نوع رقیق‌کننده و نوع انجام آزمایش مربوط باشد. رقیق‌کننده‌ای که فرهادی و همکاران (۱۳۹۳) استفاده کردند رقیق‌کننده تجاری آندرومد بود و رقیق‌کننده آزمایش ما تریس-لسیتین بود. همچنین مقدار سطح انتخابی سولفات روی توسط این محققان ۵۰ ، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومول بود که با سطوح انتخابی آزمایش ما تفاوت داشت.

در پژوهشی که روی اسپرم انسان انجام گرفت، گزارش کردند که اضافه کردن سطح ۱/۲ میکرومول بر میلی‌لیتر روی به محیط کشت، سبب کاهش معنی‌داری در درصد جنبایی اسپرم می‌شود، یعنی با گذشت زمان درصد جنبایی کاهش یافت اما با افزودن ۰/۶ میکرومول به محیط کشت سبب افزایش جنبایی اسپرم در مقایسه با گروه شاهد شد، هرچند اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین درصد بازیافت اسپرم در گروه ۰/۶ میکرومول

[17] WOB= VAP/VCL

بیشتر بود و تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشت (Dissanayake و همکاران، ۲۰۰۶). نتایج آزمایشی دیگر که موافق با نتایج ما درباره فراسنجه تحرک اسپرم بود، نشان داد که استفاده از مکمل سولفات روی خوراکی در انسان سبب کاهش آگلوتیناسیون اسپرم غیرطبیعی می‌شود و باعث افزایش تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها می‌شود (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۶). مطالعه Kotdawala و همکاران (۲۰۱۲) که اثر روی بر کیفیت اسپرم انسان بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی بود، نشان داد روی باعث افزایش تحرک در هر دو گروه افراد نرمال (با تعداد و تحرک طبیعی اسپرم)[18] و گروه بیماران با اسپرم غیرطبیعی شد. در مطالعه‌ای که استفاده از مکمل روی و سلنیوم بر کیفیت اسپرم بز بررسی شده بود، مشاهده شد که حجم مایع منی افزایش یافته و تحرک اسپرم، تعداد اسپرم، درصد زنده‌مانی اسپرم، سلامت آکروزوم هم افزایش معنی‌دار داشت (Kumar و همکاران، ۲۰۱۴). در پژوهش دیگر روی اسپرم گاومیش، نتایج نشان داد که سولفات روی موجود در پلاسمای منی ارتباط مستقیمی با زنده‌مانی و جنبایی پیش‌رونده اسپرم‌ها دارد (Alavi-Shoushtari و همکاران، ۲۰۰۹). رادیکال‌های آزاد می‌توانند تأثیرات مضر و مفیدی بر عملکرد اسپرم داشته باشند. این تأثیرات متناسب با نوع و غلظت رادیکال‌های آزاد و مدت زمانی که اسپرم در معرض آن قرار می‌گیرد، متغیرند. نشان داده‌شده است که مقدار اندکی ROS توسط اسپرم‌ها در شرایط فیزیولوژیک ایجاد می‌شود که برای ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی اسپرم نیاز است، اما مقادیر زیاد آن با جنبایی و تعداد اسپرم رابطه منفی دارد (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۶). علاوه براین، برخلاف نتایج ما بررسی Riffo و همکاران در سال ۱۹۹۲ نشان داد که روی می‌تواند تحرک و بالغ شدن اسپرم را کاهش دهد و واکنش آکروزومی اسپرم انسان را مهار کند.

افزایش معنی‌دار درصد تحرک پس از انجماد-یخ‌گشایی، پس از افزودن روی می‌تواند به علت اثر ثبات روی بر میکروفلامنتها در الیاف متراکم بیرونی باشد. علاوه بر این، عنصر روی با اثر بر میتوکندری اسپرم در افزایش ATP موردنیاز برای حرکت اسپرم کمک کند. میتوکندری غنی از آنزیم SOD می‌باشد که وابسته به روی است و غشا را از آسیب رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند. اضافه نمودن روی ممکن است در برقراری ثبات در پروتئین‌های هسته و کروماتین اسپرم کمک کند. یک مطالعه توسط Kvist و همکاران (۱۹۸۵) نشان داد که روی مانع از بین رفتن کروماتین اسپرم انسان در طول ذخیره‌سازی در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد می‌شود. همچنین نتایج ما مخالف با نتایج مطالعه Egwurugwu و همکاران در سال ۲۰۱۳ و Carpino و همکاران در سال ۱۹۹۸ بودکه نشان داد افزایش غلظت روی خوراکی منجر به کاهش تحرک و مورفولوژی اسپرم می‌شود ($P<0/05$).

میانگین درصد زنده‌مانی در سطح ۱۷/۵ سولفات روی روند افزایشی داشت اما در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود و در سطح ۳۵ و سطح ۵۲/۵ زنده‌مانی کاهش پیدا کرد و در سطح دوم که دارای ۳۵ میکرومول سولفات روی بود، کاهش معنی‌دار و اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت ($P<0/05$). این نتایج مخالف با نتایج پژوهش فرهادی و همکاران (۱۳۹۳) بود که در آن سطح ۱۰۰ میکرومول سولفات روی معنی‌دار شده بود و هر سه سطح سولفات روی زنده‌مانی را افزایش داده بود. این اختلاف می‌تواند به دلیل نحوه انجام آزمایش و تفاوت نوع گونه و نوع رقیق‌کننده باشد. این موضوع همچنین می‌تواند ناشی از اثر منفی سطوح اضافی سولفات روی بر زنده‌مانی اسپرم قوچ باشد.

در فراسنجه مورفولوژی اسپرم‌های غیرطبیعی سطح ۱۷/۵ میکرومول بطور معنی‌داری کاهش یافت و سطح ۳۵ و ۵۲/۵ افزایش یافتند و بالاتر از میانگین گروه شاهد مشاهده شدند و در سطح ۵۲/۵ در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار می‌باشد ($P<0/05$).

تست هاست که سلامت غشا را مورد ارزیابی قرار می‌دهد در این آنتی‌اکسیدان‌ها در سطح ۱۷/۵ و ۳۵ افزایش یافت اما در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نیستند؛ که مخالف با نتایج فرهادی و همکاران (۱۳۹۳)، Omu و همکاران (۲۰۰۸)، Kendall و همکاران (۲۰۰۰) و Kumar و همکاران (۲۰۰۶) بود.

درصد تولید مالون‌دی‌آلدئید در محیط‌های ۱۷/۵ و ۳۵ میکرومول

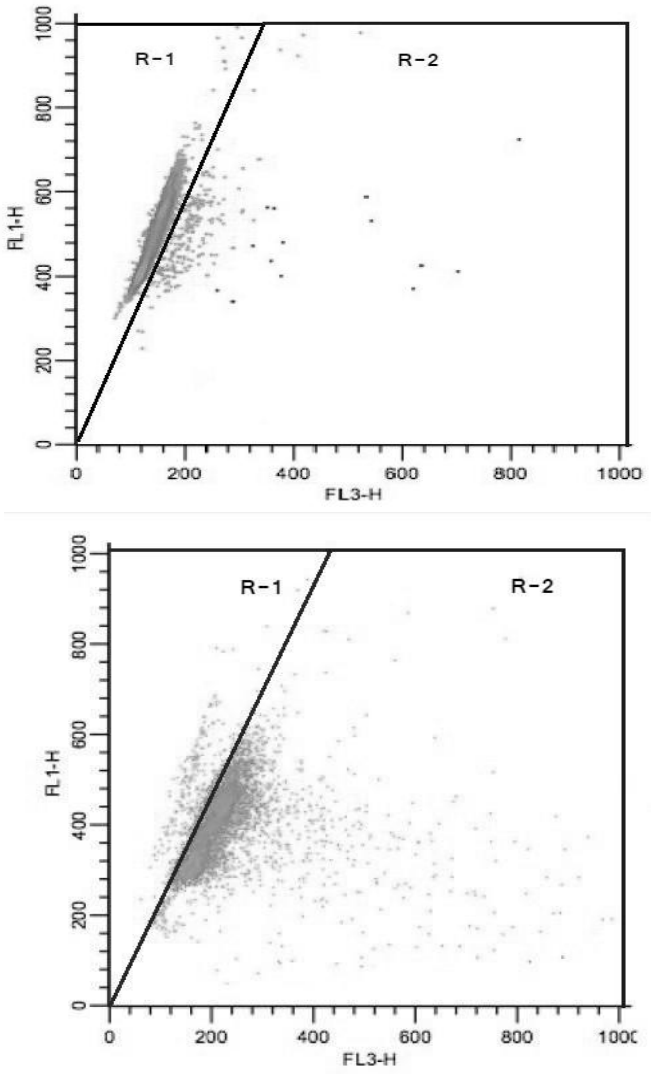
[18] - Normospermia

سولفات روی کمتر بوده و اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵). نتایج این بررسی مشابه با نتایج پژوهش فرهادی و همکاران (۱۳۹۳) بود که در آن میانگین درصد تولید مالون‌دی آلدئید در دو سطح ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار سولفات روی در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بود. روی با انتقال آهن (Fe^{3+}) مانع ورود آهن به چرخه تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (Ohkawa و همکاران، ۱۹۷۹). افزودن عنصر روی در نمونه‌های اسپرم انسان، تفاوت معنی‌داری ازلحاظ پراکسیداسیون لیپیدها و سلامت غشاء پلاسمایی با گروه شاهد ایجاد کرد؛ بنابر این روی دارای تأثیرات آنتی‌اکسیدانی است (Arabi، ۲۰۰۵). در آزمایشی که اثر کمبود روی در بیضه مطالعه شد، مشخص شد که کمبود روی باعث جلوگیری از انتقال اسپرماتید می‌شود و این نشان‌دهنده نقش احتمالی روی بر فرآیند اسپرماتوژنز است (Orgebin-Cristet و همکاران، ۱۹۷۱).

در فراسنجه آسیب به کروماتین و DNA، افزودن ۱۷/۵ و ۳۵ سولفات روی باعث کاهش آسیب به کروماتین و DNA اسپرم شد و سطح ۱۷/۵ سولفات روی در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). سلامتی DNA اسپرم شاخص مهمی از باروری جنس نر است. با مشخص شدن نقش مهم سلامت و کیفیت DNAاسپرم در باروری و در تلقیح مصنوعی و همچنین معرفی تکنیک‌های جدید برای ارزیابی وضعیت و سلامت DNA اسپرم مانند بررسی آپوپتوز اسپرم بوسیله تکنیک تانل (TUNEL[19])، بررسی ساختار کروماتین اسپرم توسط روش SCSA، مشخص کردن قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم بوسیله تست SCD و روش COMET می‌توان اشاره کرد.

Zhang و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم انسانی پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۹۷ درجه سانتیگراد افزایش می‌یابد، درحالیکه آنها هیچ تفاوت معنی‌داری را پس از دو ساعت انکوباسیون اسپرم در دمای ۹۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده نکردند. همچنین در آزمایش فرهادی و همکاران (۱۳۹۳) میانگین درصد DNA آسیب‌دیده در سطح ۱۵۰ میکرومول در مقایسه با محیط‌های دیگر بیشتر شد و افزایش معنی‌دار پیدا کرد. در این تحقیق نیز میزان درصد DNA آسیب‌دیده در سطح بالای سولفات روی در ۵۲/۵ میکرومول نسبت به گروه‌های دیگر افزایش داشت که از این نظر با آزمایش فرهادی و همکاران (۱۳۹۳) مشابه بود، اما از نظر بهبود درصد DNA سالم مغایر با نتایج ما بود. یکی از علل آسیب DNA اسپرم ممکن است به خاطر تنش اکسیداتیو باشد. استرس اکسیداتیو، رادیکال‌های فعال اکسیژن را طی این فرآیند افزایش می‌دهد (Calamera و همکاران، ۲۰۰۱). سلول‌های اسپرم نسبت به رادیکال‌های فعال اکسیژن حساس و آسیب‌پذیر هستند. حساسیت و آسیب‌پذیری به دلایل مختلفی از قبیل حضور اسیدچرب غیراشباع بالا در غشای اسپرم و عدم وجود آنتی‌اکسیدان کافی در سیتوپلاسم اسپرم است. همچنین سلول‌های اسپرم خود تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌کنند. روی به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و حضور در گروه‌های سولفیدریل اسپرم، باعث تشکیل پیوندهای S....ZN....S در ساختار کروماتین اسپرم می‌شود و باعث پایداری ساختار کروماتین اسپرم در مراحل اسپرم‌سازی و در محافظت بهتر طی فرآیند انجماد-یخ‌گشایی اثر مثبت دارد (Calamera و همکاران، ۲۰۰۱). در مطالعه‌ای که بر روی اسپرم انسان انجام شد، نتایج مشابه با نتایج تحقیق حاضر بدست آمد و سطح ۱۰۰ میکرومول در مقایسه با گروه شاهد دارای درصد DNA سالم بیشتری بود (Kotdawala و همکاران، ۲۰۱۲). قطعه‌قطعه شدن DNA ارتباط معنی‌داری با پارامترهای اسپرمی دارد. هنگامی‌که میزان فراگمانتاسیون DNA افزایش پیدا می‌کند، تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم کاهش می‌یابد. در مطالعه صادق پور و همکاران (۱۳۹۳) روی قادر به کاهش معنی‌داری در میزان آسیب به DNA در اسپرم انسانی شد.

[19] Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling



نمودار ۱- آنالیز فلوسیتومتریک کروماتین اسپرم قوچ در اثر آنتی‌اکسیدان‌ها بعد از انجماد-یخ‌گشایی با رنگ‌آمیزی فلورسنت/ R-1: نشان دهنده اسپرم‌هایی با DNA آسیب‌دیده R-2: نشان‌دهنده اسپرم‌هایی با DNA سالم.

روی نقش فیزیولوژیک بسیار مهمی بر عملکرد سلول‌های اسپرم دارد که شامل تأثیر بر تحرک و نگهداری مورفولوژی طبیعی آن‌هاست. کاهش سطح روی باعث کاهش کیفیت اسپرم و مایع منی می‌شود و شانس باروری را کاهش می‌دهد. این عنصر به دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی عملکرد مهمی در مهار گونه‌های فعال اکسیژن دارد. همچنین نقش ویژه‌ای در عملکرد طبیعی بیضه‌ها و عملکرد فیزیولوژیکی اسپرم‌ها دارد و کاهش مقدار آن باعث کاهش حجم بیضه‌ها و ظهور صفات ثانویه جنسی نامناسب و اختلال در عملکرد لوله‌های اسپرم‌ساز می‌شود(Prasad، ۱۹۹۵) کمبود روی در بدن با اختلال در سازوکار تدافعی و تهاجمی آنتی‌اکسیدان‌ها بازده اثر آن‌ها را کاهش می‌دهد. همچنین کمبود روی با اختلال در سازوکار بازسازی DNA سبب حساس شدن سلول اسپرم در تنش‌های اکسیداتیو می‌شود (Zago و همکاران، ۲۰۰۱). همچنین روی برای نگهداری اطلاعات مولکولی بسیاری از آنزیم‌هاRNA, DNA و نیز پروتئین‌ها لازم است .(Zago و همکاران، ۲۰۰۱).

نتیجه گیری

در این آزمایش افزودن سولفات روی به محیط انجماد اسپرم قوچ قزل نشان داد که این ماده بر فراسنجه‌های کیفی و حیاتی اسپرم اثر مثبت دارد و می‌توان با استفاده از غلظت مناسب آن به عنوان مکملی مناسب در رقیق کننده منی از اسپرم قوچ محافظت بهتری انجام داد.

جدول ۱- تأثیر سطوح مختلف سولفات روی (میکرومول در میلی‌لیتر) بر فراسنجه های حرکتی اسپرم قوچ قزل پس از فرآیند انجماد-یخ گشایی (میانگین ± SEM)

فراسنجه های حرکتی	شاهد	۰/۱۷	۰/۳۵	۵۲/۵	SEM
تحرک کل (درصد)	۳۹/۰۰^{b}	۴۴/۲۵^{a}	۳۹/۷۵^{ab}	۴۱/۲۵^{ab}	۱/۱۹
تحرک پیش‌رونده (درصد)	۲۸/۰۰	۳۳/۰۰	۲۷/۵۰	۲۹/۰۰	۱/۳۰
VSL (میکرومتر بر ثانیه)	۲۰/۵۴	۲۳/۶۱^{a}	۱۸/۰۲	۱۷/۹۶	۲/۵۹
VCL (میکرومتر بر ثانیه)	۶۲/۹۹^{a}	۶۶/۵۷^{a}	۳۷/۵۰^{b}	۳۵/۲۱^{b}	۵/۱۶
ALH (میکرومتر بر ثانیه)	۰/۹۵	۰/۷۵	۰/۸۴	۱/۳۳	۰/۱۹
BCF (تعداد در ثانیه)	۱۷/۴۰	۱۶/۴۳	۱۵/۶۱	۱۵/۸۸	۰/۶۱
WOB (درصد)	۴۷/۴۰^{b}	۴۳/۲۶^{b}	۴۲/۹۳^{b}	۶۳/۳۱^{a}	۷/۱۰
VAP (میکرومتر بر ثانیه)	۳۳/۰۸	۳۵/۲۴	۳۱/۷۲	۳۸/۶۰	۳/۵۷
LIN (درصد)	۳۷/۶۰^{ab}	۴۰/۲۰^{a}	۳۱/۵۰^{b}	۳۲/۳۰^{b}	۱/۳۳
STR درصد	۶۳/۹۶^{ab}	۷۱/۰۲^{a}	۶۰/۶۵^{b}	۵۱/۵۲^{b}	۳/۲۰

در هر ردیف تیمارهایی که حداقل یک حرف مشترک دارند اختلاف معنی¬دار ندارند) با سطح احتمال ۵ درصد).

VSL:Straight line velocity; VCL:Curvilinear velocity; ALH:Lateral head displacement; BCF:Beat cross frequency; WOB:side to side movement of the sperm head (VAP/VCL); VAP:Average path velocity; LIN:Linearity; STR:Straight line velocity

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف سولفات روی (میکرومول در میلی‌لیتر) بر زنده‌مانی، مورفولوژی و میزان مالون دی آلدئید(MDA) و آسیب به DNA اسپرم قوچ قزل پس از فرآیند انجماد-یخ گشایی (میانگین ± SEM)

فراسنجه	شاهد	سطح ۱۷/۵	سطح ۳۵	سطح ۵۲/۵	SEM
زنده‌مانی (درصد)	۵۳/۷۵^{a}	۵۴/۷۵^{a}	۴۲/۳۲^{b}	۴۶/۳۳^{ab}	۲/۲۹
مورفولوژی (درصد)	۳۱/۵۰^{b}	۲۰/۲۷^{c}	۳۳/۰۰^{b}	۴۳/۰۰^{a}	۲/۴۶
یکپارچگی غشا (درصد)	۳۷/۵۰	۴۱/۲۵	۴۱/۲۵	۳۷/۲۵	۲/۲۶
MDA (نانومول در میلی‌لیتر)	۲/۰۳^{a}	۰/۷۸^{b}	۰/۷۰^{b}	۱/۵۶^{ab}	۰/۲۴
آسیب به DNA	۸/۰۹^{a}	۵/۰۸^{b}	۵/۷۹^{ab}	۸/۳۰^{a}	۲/۰۷

در هر ردیف تیمارهایی که حداقل یک حرف مشترک دارند اختلاف معنی دار ندارند(با سطح احتمال ۵ درصد)

منابع

صادقپور، س، قاسم‌زاده، ع، نوری، م، دانایی، ش، نژادبرنجی، ح ق.، ۱۳۹۳. بررسی تأثیر درمان‌های آنتی‌اکسیداتیو بر روی DNAفراگمانتاسیون اسپرم و نتایج بارداری در IUI. مجله پزشکی ارومیه ۲۵، ۱۰۵۰-۱۰۵۹.

فرهادی، ف، توحیدی، ا، شاکری، م. ۱۳۹۳. اثر افزودن سطوح متفاوت سولفات روی به رقیق‌کنندهٔ منی بر کیفیت اسپرم گاو پس از انجماد-ذوب. علوم دامی ایران ۴۵، ۳۳۵-۳۴۲.

Agarwal, A., Gupta, S., Sikka, S. (2006). The role of free radicals and antioxidants in reproduction. Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 18: 325-332.

Aitken, R.J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reproduction, Fertility and Development. 7: 659-668.

Alavi-Shoushtari, S., Rezai, S.A., Kh Ansari, M., Khaki, A. (2009). Effects of the seminal plasma zinc content and catalase activity on the semen quality of water buffalo (Bubalus bubalis) bulls. Pak. J. Biol. Sci. 12: 134-139.

Arabi, M. (2005). Antioxidant effect of manganese on human spermatosoa treated in the different conditions comparision with zinc, nickle, and trolox. *Iranian Journal of Biology*. 17: 316-332.

Bansal, A.K., Bilaspuri, G. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet. Med. Int. 2011.

Barratt, C.L., Aitken, R.J., Björndahl, L., Carrell, D.T., de Boer, P., Kvist, U., Lewis, S.E., Perreault, S.D., Perry, M.J., Ramos, L. (2010). Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications—a position report. Hum. Reprod. 25: 824-838.

Bedwal, R., Bahuguna, A. (1994). Zinc, copper and selenium in reproduction. Experientia. 50: 626-640.

Calamera, J., Fernandez, P., Buffone, M., Acosta, A., Doncel, G. (2001). Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. Andrologia. 33: 79-86.

Carpino, A., Siciliano, L., Petroni, M., De Stefano, C., Aquila, S., Ando, S., Petrone, M. (1998). Low seminal zinc bound to high molecular weight proteins in asthenozoospermic patients: evidence of increased sperm zinc content in oligoasthenozoospermic patients. Human reproduction (Oxford, England). 13: 111-114.

Dissanayake, D., Wijesinghe, P., Ratnasooriya, W., Wilmalasena, S., Palihawadana, T. (2008). Effects of different Zinc levels in the sperm culture medium on sperm recovery and quality of sperms in the swim up procedure for sperm processing. Ceylon J Med Sci. 49.

Ebisch, I., Thomas, C., Peters, W., Braat, D., Steegers-Theunissen, R. (2006). The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. Human reproduction update. 13: 163-174.

Egwurugwu, J., Ifedi, C., Uchefuna, R., Ezeokafor, E., Alagwu, E. (2013). Effects of zinc on male sex hormones and semen quality in rats. Niger. J. Physiol. Sci. 28: 17-22.

Eickhoff, R., Baldauf, C., Koyro, H.-W., Wennemuth, G., Suga, Y., Seitz, J., Henkel, R., Meinhardt, A. (2004). Influence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) on the zinc content and redox state of protein-bound sulphydryl groups in rat sperm: indications for a new role of MIF in sperm maturation. Mol. Hum. Reprod. 10: 605-611.

Hida, H., Coudray, C., Calop, J., Favier, A. (1995). Effect of antioxidants on adriamycin-induced microsomal lipid peroxidation. Biol. Trace Elem. Res. 47: 111-116.

Hidiroglou, M., Knipfel, J. (1984). Zinc in Mammalian Sperm: A Review1. J. Dairy Sci. 67: 1147-1156.

cryopreservation. Animal reproduction science. 177: 35-41.

Najafi, A., Zhandi, M., Towhidi, A., Sharafi, M., Akbari Sharif, A., Khodaei Motlagh, M., 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: 275-282.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95: 351-358.

Omu, A., Al-Azemi, M., Kehinde, E., Anim, J., Oriowo, M., Mathew, T. (2008). Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. Med. Princ. Pract. 17: 108-116.

Prasad, A.S. (1995). Zinc: an overview. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.). 11: 93-99.

Riffo, M., Leiva, S., Astudillo, J. (1992). Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction. Int. J. Androl. 15: 229-237.

Tharwat, E., 1998. The use of zinc sulfate to improve semen characteristics and fertility of New Zealand white rabbit bucks during hot season, Proceeding of the Seventh Conference of Agricultural.

Wong, W.Y., Flik, G., Groenen, P.M., Swinkels, D.W., Thomas, C.M., Copius-Peereboom, J.H., Merkus, H.M., Steegers-Theunissen, R.P. (2001). The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. Reprod. Toxicol. 15: 131-136.

Zago, M.P., Oteiza, P.I. (2001). The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. Free Radic. Biol. Med. 31: 266-274.

Zhang, X.-D., Chen, M.-Y., Gao, Y., Han, W., Liu, D.-Y., Huang, G.-N. (2011). The effects of different sperm preparation methods and incubation time on the sperm DNA fragmentation. Hum. Fertil. 14: 187-191.

Kendall, N., McMullen, S., Green, A., Rodway, R. (2000). The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. Anim. Reprod. Sci. 62: 277-283.

Kotdawala, A.P., Kumar, S., Salian, S.R., Thankachan, P., Govindraj, K., Kumar, P., Kalthur, G., Adiga, S.K. (2012). Addition of zinc to human ejaculate prior to cryopreservation prevents freeze-thaw-induced DNA damage and preserves sperm function. J. Assist. Reprod. Genet. 29: 1447-1453.

Kumar, N., Verma, R.P., Singh, L.P., Varshney, V.P., Dass, R.S. (2006). Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (Bos indicus Bos taurus) bulls. Reprod. Nutr. Dev. 46: 663-675.

Kumar, P., Yadav, B., Yadav, S. (2014). Effect of zinc and selenium supplementation on semen quality of Barbari bucks. Indian J Anim Res. 48: 366-369.

KVIST, U., BJÖRNDAHL, L. (1985). Zinc preserves an inherent capacity for human sperm chromatin decondensation. Acta physiologica. 124: 195-200.

Mehdipour, M., Kia, H.D., Najafi, A., Dodaran, H.V., Garcia-Alvarez, O. (2016). Effect of green tea (Camellia sinensis) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. Cryobiology. 73: 297-303.

Mehdipour, M., Kia, H.D., Nazari, M., Najafi, A. (2017). Effect of lecithin nanoliposome or soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw flow cytometric, microscopic and oxidative parameters in ram semen. Cryobiology.

Najafi, A., Daghigh-Kia, H., Dodaran, H.V., Mehdipour, M., Alvarez-Rodriguez, M. (2017). Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm