Archive of SID

اثر تره‌هالوز و سیستئین بر کیفیت اسپرم گاو بعد از انجماد

مهدی ژندی[1*]، الهه نجاتی امیری[1]، اردشیر نجاتی جوارمی[1]، محسن شرفی[2]، افشین سیفی‌جمادی[1]، حسین واثقی دودران[3]

[1] کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی

[2] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم طیور

[3] تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۳

چکیده

هدف ازاین پژوهش مطالعه اثر مقادیر مختلف تره‌هالوز و سیستئین بر کیفیت اسپرم گاو بعد از انجماد-یخ‌گشایی بود. در این مطالعه، نمونه‌های منی از سه رأس گاو نر جمع‌آوری و پس مخلوط شدن به شش بخش مساوی تقسیم‌شده و هربخش بایکی از رقیق‌کننده‌های زیر رقیق و منجمد شد. ۱- فاقد سیستئین و تره‌هالوز (T_0C_0)، ۲- دارای ۵ میلی‌مول سیستئین و فاقد تره‌هالوز (T_0C_5)، ۳- دارای ۱۰ میلی‌مول سیستئین و فاقد تره‌هالوز (T_0C_{10})، ۴- فاقد سیستئین و دارای ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز ($T_{100}C_0$)، ۵- دارای ۵ میلی‌مول سیستئین و ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز ($T_{100}C_5$) و ۶- دارای ۱۰ میلی‌مول سیستئین و ۱۰۰ میلی-مول تره‌هالوز ($T_{100}C_{10}$). پس‌از یخ‌گشایی، جنبایی، وضعیت آپوپتوزیس، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و آکروزوم مورد ارزیابی قرارگرفت. داده‌های بدست آمده در قالب آزمایش فاکتوریل۲×۳ مورد تجزیه‌وتحلیل قرارگرفتند. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که سیستئین اثری بر فراسنجه‌های حرکتی، وضعیت آپوپتوزیس، یکپارچگی غشای آکروزومی و زنده‌مانی اسپرم گاو پس‌از یخ‌گشایی نداشته ($P\geq۰,۰۵$) و در همه فراسنجه‌های فوق در گروه فاقد تره‌هالوز به‌طور معنی‌داری بهتر از گروه دارای تره‌هالوز بود ($P\leq۰,۰۵$). همچنین، بررسی اثرات متقابل تره‌هالوز و سیستئین در این آزمایش نشان می‌دهد که تیمار T_0C_{10} بیشترین زنده‌مانی ($P\leq۰,۰۵$) و کمترین میزان اسپرم‌های آپوپتوز شده را داشت. براساس این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که سیستئین اثری بر اسپرم گاو نداشته و تره‌هالوز اثر منفی بر کیفیت اسپرم گاو دارد.

واژه‌های کلیدی: انجماد اسپرم، محافظت انجمادی، آنتی‌اکسیدان، منی گاو

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۶۳۲۲۴۸۰۸۲ ، پست الکترونیکی: mzhandi@ut.ac.ir

مقدمه

بی‌گمان تلقیح مصنوعی یکی‌از موفق‌ترین فناوری‌های تولیدمثلی در صنعت گاو شیری است که به‌عنوان یک ابزار ارزشمند در برنامه‌های ژنتیکی به شمار می‌رود (۱۶). موفقیت در یک برنامه تلقیح مصنوعی به مدیریت صحیح جمع‌آوری، انجماد و یخ‌گشایی بهینه منی و ذخیره‌سازی مناسب آن بستگی دارد (۲). گزارش‌های بسیاری وجود دارد که نشان می‌دهند، فرایند انجماد-یخ‌گشایی منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود که در تحرک، استحکام غشا و باروری اسپرم اختلال ایجاد می‌کند و باعث واکنش زودهنگام آکروزومی، از دست دادن محتویات سلولی، کاهش جنبایی و باروری اسپرم می‌شود (۷). تنش اکسیداتیو درنتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها رخ می‌دهد و می‌تواند منجر به تخریب، بدشکل شدن و احتمالاً ناباروری اسپرم شود. گزارش‌شده است که از یک‌سو تولید رادیکال‌های آزاد به‌وسیله اسپرم، یک فرایند طبیعی فیزیولوژیک است و

www.SID.ir

Archive of SID

نقش بسیار مهمی را در فرایند فیزیولوژیکی اسپرم همانند ظرفیت‌دار شدن و واکنش آکروزومی ایفا می‌کند. اما از طرف دیگر، مقادیر بالای ROS عامل اصلی اختلال در عملکرد اسپرم است (۶ و ۱۲). علاوه برآن، گونه‌های فعال اکسیژن توسط اسپرم‌های مرده، اکسیژن محیطی و یا اتمسفری تولید می‌شوند و باعث کاهش جنبایی (احتمالاً به‌وسیله از دست دادن ATP داخل سلولی که منجر به آسیب آکسونمال می‌شود)، کاهش یکپارچگی غشا و درنهایت کاهش باروری می‌شوند (۶ و ۸).

غشای پلاسمایی یکی‌از اجزای کلیدی سلول می‌باشد که باید در حین انجماد به‌منظور زنده‌ماندن سلول به شکل مناسبی از آسیب‌های ایجادشده حفظ شود (۱). وجود مقدار زیاد اسیدهای چرب غیراشباع در غشا موجب مستعد شدن اسپرم به واکنش پراکسیداسیون لیپیدی در حضور رادیکال‌های آزاد می‌شود (۲۸). پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که محافظت از غشای اسپرم در مقابل واکنش اکسیداتیو، توسط آنتی‌اکسیدان‌ها صورت می‌گیرد. درواقع آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش تشکیل، حذف و پاک‌سازی و غیرفعال‌سازی رادیکال‌های آزاد، شرایط سلولی را به‌گونه‌ای تغییر می‌دهند که جنبایی و کیفیت اسپرم حفظ شود. بسیاری از ترکیبات نظیر برخی از عصاره‌های گیاهی، برخی مواد شیمیایی صنعتی و برخی از اسیدهای آمینه می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان فعالیت کرده و رادیکال‌های آزاد را در محیط خنثی کنند (۲۶). یکی‌از اسیدآمینه‌هایی که در پژوهش‌های مختلف نقش آنتی‌اکسیدانی آن تأییدشده است، سیستئین است (۶). سیستئین اسیدآمینه‌ای با وزن مولکولی پایین است که دارای گروه تیول می‌باشد. گروه‌های تیول مانع از تشکیل پراکسید هیدروژن در اسپرم می‌شوند. همچنین، تیول پیش‌ماده بیوسنتز گلوتاتیون درون‌سلولی است و سطح آن را افزایش می‌دهد. از سوی دیگر، سیستئین می‌تواند از فعالیت متابولیت‌های سمی اکسیژن که باعث پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم می‌شوند، جلوگیری کند (۳۴).

یکی دیگر از عوامل اصلی تخریب سلول اسپرم طی فرایند انجماد، تشکیل کریستال‌های یخ در داخل سلول است که درنهایت منجر به کاهش زنده‌مانی اسپرم می‌شود. یکی از راه‌های جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ، استفاده از قندها در رقیق‌کننده است (۱و ۳). قندها ترکیباتی هستند که در مطالعات مختلف، نقش سرما محافظی آن‌ها اثبات شده است (۱۶). افزون براین، قندها، نقش‌های دیگری از قبیل فراهم کردن انرژی برای اسپرم (۱۰) و حفظ فشار اسمزی رقیق‌کننده را نیز (۱ و ۲۹) ایفا می‌کنند. دراین‌بین و براساس گزارش‌های مختلف، به نظر می‌رسد که دی‌ساکارید تره‌هالوز اثر بهتری نسبت به سایر قندها بر اسپرم داشته باشد (۱، ۲۵و ۳۶). برخی از پژوهش‌گران گزارش کرده‌اند که تره‌هالوز یک محیط هایپرتونیک ایجاد می‌کند و با ایجاد فشار اسمزی باعث دهیدراسیون اسمزی سلول قبل از انجماد می‌شود. این اثر، یخ‌زدگی داخل سلولی را کاهش و باعث کاهش تعداد سلول‌های آسیب‌دیده به‌وسیله کریستال‌های یخ می‌شود (۳۰). در پژوهشی دیگر، گزارش‌شده است که فرایند انجماد – یخ‌گشایی، ظرفیت‌دار شدن اسپرم را تحریک و باعث کاهش باروری آن می‌شود. تره‌هالوز پتانسیل کاهش ظرفیت‌دار شدن را دارد و یکپارچگی آکروزوم را حفظ می‌کند (۳۱). در خصوص اثر متقابل تره‌هالوز و سیستئین، گزارش‌شده است که اثر افزودن همزمان تره‌هالوز و سیستئین باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ طی سردسازی شده است (۱۳). علاوه بر آن بدر و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که ترکیب تره‌هالوز (۵ میلی‌مول)، سیستئین (۱۰۰ میلی‌مول) و هایپوتائورین (۲۰ میلی‌مول) باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاومیش پس از یخ‌گشایی می‌شود (۵). بنابراین، باتوجه به این فرضیه که احتمالاً ترکیب تره‌هالوز و سیستئین بااثر هم‌افزایی ایجادشده، سبب بهبود ویژگی‌های اسپرم گاو پس از یخ‌گشایی می‌شوند، هدف این پژوهش مطالعه اثر افزودن همزمان سطوح مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

سیستئین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و تره‌هالوز به‌عنوان منبع قندی در رقیق‌کننده بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاو بود.

مواد و روشها

جمع‌آوری منی: دراین پژوهش از منی سه راس گاو نر هلشتاین با میانگین سنی ۲/۵-۲ سال استفاده شد. گاوهای نر در مرکز تولید و انجماد اسپرم در فیروزکوه (شرکت زرژن) نگه‌داری می‌شدند. جمع‌آوری منی با استفاده از واژن مصنوعی از گاوهای نر آموزش‌دیده، به مدت سه هفته و به‌صورت دو بار در هفته (درمجموع ۶ تکرار) انجام شد.

محیط انجماد: درپژوهش حاضر از رقیق‌کننده تجاری اپتیدیل (IMV، فرانسه) استفاده گردید. طبق راهنمای موجود برای رقیق‌کننده اپتیدیل، میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر مایع رقیق‌کننده در داخل ۷۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر ریخته شده و سپس به مدت ۵ دقیقه روی شیکر (IMV، فرانسه) با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد هم زده شد. پس‌ازآن، رقیق-کننده پایه داخل حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. تیمارهای آزمایش به‌صورت ترکیب دو سطح از تره-هالوز (شامل سطوح صفر و ۱۰۰ میلی‌مول) و سه سطح سیستئین (شامل سطوح صفر، ۵ و ۱۰ میلی‌مول) در قالب طرح فاکتوریل ۳×۲ [۶ تیمار شامل: ۱- رقیق‌کننده فاقد سیستئین و تره‌هالوز (T0C0)، ۲- رقیق‌کننده دارای ۵ میلی‌مول سیستئین و فاقد تره‌هالوز (T0C5)، ۳- رقیق-کننده دارای ۱۰میلی‌مول سیستئین و فاقد تره‌هالوز (T0C10)، ۴- رقیق‌کننده فاقد سیستئین و دارای ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز (T100C0)، ۵- رقیق‌کننده دارای ۵ میلی‌مول سیستئین و ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز (T100C5) و ۶- رقیق‌کننده دارای ۱۰ میلی‌مول سیستئین و ۱۰۰ میلی-مول تره‌هالوز (T100C10)] آماده شدند.

فرآوری و انجماد منی: پس‌از جمع‌آوری منی، نمونه‌ها به‌طور هم‌زمان در حمام خشک ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند و بررسی‌های ابتدایی نظیر ارزیابی جنبایی به روش چشمی و به‌وسیله میکروسکوپ نوری و تعیین غلظت به‌وسیله لام هموسایتومتر روی آن‌ها انجام شد. نمونه‌هایی با غلظت بیشتر از ۱۰۹ × ۲ اسپرم در میلی‌لیتر، جنبایی پیش‌رونده بیش‌تر از ۷۵ درصد در هر انزال به‌عنوان منی بهینه در نظر گرفته شد (۱۴). پس از اطمینان از بهینه بودن کیفیت نمونه‌ها، برای از میان برداشتن اثرات فردی، نمونه‌ها با یکدیگر آمیخته شدند و به شش قسمت مساوی (به تعداد تیمارهای آزمایش) تقسیم شدند. رقیق‌سازی تیمارها تا رسیدن به غلظت پایانی اسپرم به میزان ۱۰۶ × ۱۰۰ اسپرم در هر میلی‌لیتر انجام شد. پس‌ازاین مرحله، لوله‌های آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده‌شده و سپس به مدت ۱۵۰ دقیقه داخل کابینت سرد (IMV، فرانسه) در ۴ درجه سانتی‌گراد قرارداده شدند. پس از گذشت این زمان، نمونه‌های داخل کابینت سرد به درون پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری (IMV، فرانسه) کشیده شدند. در گامه بعد، پایوت‌های پرشده برای انجماد در داخل دستگاه قابل‌برنامه‌ریزی انجماد اسپرم (IMV، فرانسه) گذاشته شدند. سپس دما تا رسیدن به ۱۰- درجه سانتی‌گراد با سرعت منفی ۳ درجه در هردقیقه کاهش یافت تا از رسیدن هرگونه شوک دمایی در این مرحله حساس جلوگیری شود و پس‌ازاین دما که مرحله کریستال شدن شروع می‌شود دما با سرعت منفی ۴۰ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه به ۱۱۰- درجه سانتی‌گراد رسید. سپس دما با سرعت منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه به ۱۴۰- درجه سانتی‌گراد رسید. پس از رسیدن دما به ۱۴۰- درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها به‌سرعت برداشته شدند و بی‌درنگ در درون لیوان‌های پر از ازت قرارگرفته و درنهایت در تانک ازت برای مدت یک ماه ذخیره شدند.

ارزیابی اسپرم پس از یخ‌گشایی:

جنبایی: در این پژوهش، یخ‌گشایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفته و فراسنجه-

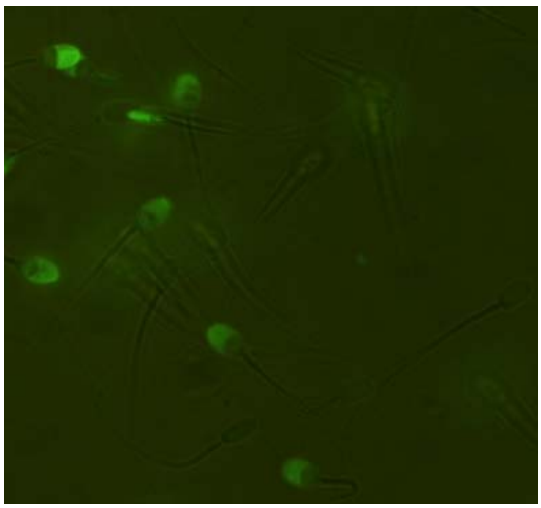
www.SID.ir

Archive of SID

های جنبایی با میکروسکوپ نوری– فاز کنتراست و با استفاده از نرم‌افزار CASA (Sperm Class analyzer ((SCA), Version 5.1; Microptic, Barcelona, Spain ارزیابی شد. فراسنجه‌های جنبایی شامل جنبایی پیشرونده (PM)، سرعت واقعی اسپرم درمسیر طی شده (VCL)، سرعت اسپرم در خط مستقیم (VSL)، میانگین سرعت در مسیر مستقیم (VAP)، معیار خطی بودن حرکت اسپرم (LIN)، معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم (STR)، متوسط زاویه چرخش (WOB)، حداکثر دامنه حرکات جانبی (ALH) و متوسط زاویه چرخش (MAD)، فرکانس حرکات جانبی (BCF) بودند.

فعالیت غشاء اسپرم: دراین پژوهش، برای تعیین فعالیت غشای اسپرم از آزمون HOS استفاده شد. باتوجه به این‌که اسمولاریتی محیط این آزمون، ۱۰۰ میلی‌اسمول در کیلوگرم و اسمولاریته‌ی موردنیاز برای اسپرم گاو ۵۲۵ – ۴۲۵ میلی‌اسمول در کیلوگرم است. بنابراین، اسپرم با قرارگرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به‌سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. بدیهی است که تنها اسپرم‌های زنده و دارای غشای فعال (سالم) توانایی دارند به‌این محیط واکنش دهند. برای ساخت محیط HOS، ۰/۹ گرم فروکتوز و ۰/۴۹ گرم سدیم سیترات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد (۲۰). سی میکرولیتر از منی یخ‌گشایی شده به ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک HOS افزوده شد. سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از گذشت این زمان، از نمونه‌ها اسلاید تهیه‌شده و تعداد ۲۰۰ اسپرم از هر اسلاید شمارش شد و درصد اسپرم‌های بادم گره‌خورده و متورم (دارای غشای فعال) محاسبه شد.

یکپارچگی آکروزوم: برای اندازه‌گیری یکپارچگی آکروزم از روشی که توسط تس و همکاران (۲۰۰۹) توضیح داده‌شده بود باکمی تغییرات استفاده شد (۳۲). در این روش، ۵۰۰ میکرولیتر از اسپرم یخ‌گشایی شده (۱×۱۰۶ اسپرم/میلی‌لیتر) در میکروتیوپی ریخته و با سرعتی معادل g ۶۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی بیرون ریخته شده و پلت اسپرم در ۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد حل شد. پس از مخلوط شدن کامل اسپرم با اتانول، محلول بدست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس، ۲۰ میکرولیتر از محلول روی یک لام قرار داده‌شده و به شکل یک‌لایه نازک پخش شد تا اتانول نمونه کاملاً تبخیر گردد. پس‌ازاین مرحله، ۲۰ میکرولیتر رنگ PSA (Pisum sativum agglutinin) روی نمونه ریخته شده و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. اسلاید بدست آمده با استفاده از آب مقطر (۱۵ بار) شستشو شده و پس از خشک شدن و آغشته شدن با گلیسرول، لامل گذاری شد. سپس، ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus, BX51, Japan) ارزیابی شد. اسپرم‌هایی با سر، سبز به‌عنوان آکروزوم سالم و اسپرم دارای یک کمربند سبز در قسمت استوایی یا بدون رنگ فلورسنت سبز به‌عنوان اسپرم‌های با آکروزم تخریب‌شده در نظر گرفته شدند (شکل ۱) (۹).



شکل ۱- اسپرم‌های رنگ‌آمیزی شده بارنگ PSA برای سنجش یکپارچگی آکروزوم.

ارزیابی وضعیت آپوپتوزیس (جابجایی فسفاتیدیل

www.SID.ir

Archive of SID

سرین): برای سنجش جابجایی فسفاتیدیل سرین اسپرم از کیت آنکسین-V (Immune Quality Products (IQP), Groningen, The Netherlands) و براساس دستورالعمل ارائه‌شده توسط شرکت سازنده استفاده شد. آنکسین-V یک پروب وابسته به کلسیم است که می‌تواند بیرون آمدن فسفاتیدیل سرین را در غشای اسپرم مشخص نماید. در مرحله نخست، اسپرم در یک بافر کلسیم شستشو داده شده و با غلظت یک‌میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر محلول تنظیم شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر آنکسین-V متصل به پروب FITC به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول اسپرم اضافه‌شده و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. پس‌ازآن، ۱۰ میکرولیتر رنگ پروپیدیوم آیوداید (PI) به محلول اضافه‌شده و محلول بدست آمده مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. سپس، برای هر نمونه ۱۰۰۰۰ رخداد به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتر (Becton Dickinson, San Khosoz, CA, USA) ثبت شد. اسپرم‌ها به چهار گروه زیر تقسیم شدند: اسپرم‌های آپوپتوز نشده (آنکسین منفی و PIمنفی)، اسپرم‌هایی که اوایل مرحله آپوپتوز بودند (آنکسین مثبت و PI منفی)، اسپرم‌هایی که در اواخر مرحله آپوپتوز بودند (آنکسین منفی و PI مثبت) و اسپرم‌های نکروز شده (آنکسین مثبت و PI مثبت) (۳۵).

آنالیز آماری: این آزمایش در قالب طرح آماری فاکتوریل ۳ × ۲ با شش تکرار انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین حداقل مربعات ± انحراف معیار میانگین (Lsmean ± SEM) نشان داده‌شده‌اند. داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS 9.1 (۲۴) و به رویه‌ی Mixed با استفاده از مدل آماری زیر تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین‌های بدست آمده از آزمون توکی استفاده شد.

$$Y_{ijkl}=\mu+C_i+T_j+R_k+CT_{ij}+e_{ijkl}$$

Yijkl: مشاهدات، μ: میانگین جامعه، Ci: اثر سیستئین (i=1, 2, 3)، Tj: اثر ترهالوز (j=1, 2)، Rk: اثر تکرار (j=1, 2, … ,6)، TCij: برهمکنش ترهالوز و سیستئین، eilk: اثرات باقیمانده.

نتایج

نتایج حاصل از این آزمایش نشان می‌دهد که سیستئین اثری بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم گاو پس‌از یخ‌گشایی ندارد (P≥۰,۰۵). همچنین، میزان جنبایی پیش‌رونده، سایر فراسنجه‌های حرکتی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و یکپارچگی آکروزوم و زنده‌مانی گروه T0 بیشتر از گروه T100 بودند (P≤۰,۰۱). نتایج گزارش‌شده حاکی از آن است که اثر متقابل ترهالوز و سیستئین بر فراسنجه‌های جنبایی، یکپارچگی غشای پلاسمایی یکپارچگی آکروزوم و زنده‌مانی ازنظر آماری معنی‌دار نبودند (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- اثر سطوح مختلف ترهالوز و سیستئین بر فراسنجه‌های جنبایی، یکپارچگی آکروزم و غشای پلاسمایی اسپرم گاو پس از یخ‌گشایی.

فراسنجه	ترهالوز (T) (میلی‌مول)			سیستئین (C) (میلی‌مول)			P value		
	صفر	۱۰۰	SEM	صفر	۵	۱۰	SEM	ترهالوز (T)	سیستئین (C)	C×T
جنبایی پیش‌رونده (٪)	۵۸/۱۵[a]	۱۳/۸۲[b]	۲/۱۸	۳۵/۱۷	۳۴/۵۹	۳۸/۱۹	۲/۶۸	**	ns	ns
VAP (μm/s)	۴۵/۲۴[a]	۱۷/۹۴[b]	۱/۳۹	۳۰/۸۹	۳۲/۳۸	۳۱/۵۱	۱/۶۹	**	ns	ns
VSL (μm/s)	۳۵/۷۷[a]	۱۲/۲۳[b]	۱/۲۹	۲۳/۸۶	۲۴/۴۶	۲۳/۶۹	۱/۵۹	**	ns	ns
VCL (μm/s)	۶۶/۳۴[a]	۳۱/۹۲[b]	۱/۷۴	۱۵/۴۷	۵۰/۵۶	۴۹/۶۷	۲/۱۳	**	ns	ns
ALH (μm)	۲/۸۹[a]	۲/۴۶[b]	۰/۰۷	۲/۵۴	۲/۷۹	۲/۶۹	۰/۰۹	**	ns	ns
LIN (%)	۵۳/۸۵[a]	۳۸/۱۹[b]	۱/۷۴	۴۷/۳۸	۴۵/۲۶	۴۵/۴۱	۲/۱۳	**	ns	ns
STR (%)	۷۸/۸۳[a]	۶۷/۳۳[b]	۱/۴۹	۷۳/۸۶	۷۲/۲۰	۷۳/۱۸	۱/۸۳	**	ns	ns
BCF (Hz)	۱۱/۵۳[a]	۷/۴۱[b]	۰/۲۶	۹/۶۱	۹/۲۵	۹/۵۴	۰/۳۱	**	ns	ns

www.SID.ir

Archive of SID

a و b: میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی وجود تفاوت معنی‌دار می‌باشد (**: $P \leq 0.01$، ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار)

جدول ۲- اثر سطوح مختلف تره‌هالوز و سیستئین بر یکپارچگی و فعالیت غشای پلاسمایی و یکپارچگی غشای آکروزومی اسپرم گاو پس از یخ‌گشایی.

فراسنجه(٪)	تره‌هالوز (T) (میلی‌مول)			سیستئین (C) (میلی‌مول)				P value		
	صفر	۱۰۰	SEM	صفر	۵	۱۰	SEM	تره‌هالوز (T)	سیستئین (C)	C×T
یکپارچگی غشای پلاسمایی (٪)	۵۸/۴۴^{a}	۴۲/۷۷^{b}	۳/۹۲	۵۷/۰۰	۵۴/۰۰	۴۰/۸۳	۴/۸۰	**	ns	ns
فعالیت غشای پلاسمایی (٪)	۵۳/۵۰^{a}	۳۲/۲۲^{a}	۲/۳۷	۳۹/۵۰	۴۵/۸۳	۴۳/۲۵	۲/۹۰	**	ns	ns
یکپارچگی غشای آکروزومی (٪)	۵۰/۳۳^{a}	۵۷/۵۸^{b}	۲/۳۸	۶۰/۰۰	۵۱/۸۷	۵۰/۰۰	۲/۹۲	*	ns	ns

a و b: میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی وجود تفاوت معنی‌دار می‌باشد (**: $P \leq 0.01$، *: $P \leq 0.05$، ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار)

نتایج ارائه‌شده در جدول ۳ نشان می‌دهد که سطوح مختلف سیستئین هیچ اثری بر میزان اسپرم‌های زنده (آپوپتوز نشده) نداشته است (P≥۰,۰۵). همچنین، افزودن تره‌هالوز باعث کاهش میزان اسپرم‌های زنده و افزایش میزان اسپرم‌ها در مرحله نهایی آپوتوزیس نسبت به گروه فاقد تره‌هالوز شده است (P≤۰,۰۵).

جدول ۳- اثر سطوح مختلف تره‌هالوز و سیستئین بر وضعیت آپوپتوز اسپرم گاو پس از فرآیند یخ‌گشایی.

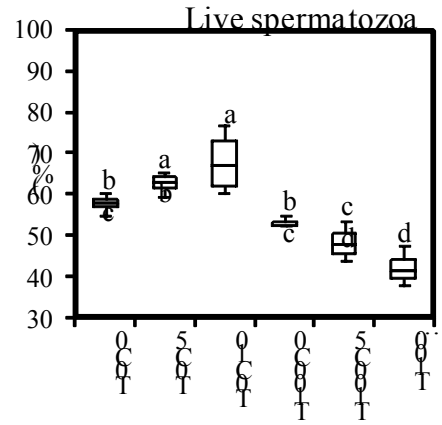
فراسنجه(٪)	تره‌هالوز (T) (میلی‌مول)			سیستئین (C) (میلی‌مول)				P value		
	صفر	۱۰۰	SEM	صفر	۵	۱۰	SEM	تره‌هالوز (T)	سیستئین (C)	C×T
اسپرم زنده	۶۲/۸۲^{a}	۴۸/۰۳^{b}	۱/۲۴	۵۵/۶۹	۵۵/۰۳	۵۵/۵۵	۱/۵۲	**	ns	**
اسپرم در مرحله اولیه آپوپتوز	۴/۶۷	۵/۸۳	۱/۶۳	۴/۵۷	۶/۸۳	۴/۳۴	۱/۹۹	ns	ns	ns
اسپرم مرحله در نهایی آپوپتوز	۳/۶۱^{a}	۹/۰۷^{b}	۱/۷۴	۴/۳۶	۱۰/۳۲	۴/۳۵	۲/۱۴	*	ns	*
اسپرم نکروز شده	۲۸/۸۰	۳۷/۴۱	۳/۰۰	۳۵/۳۶	۲۷/۸۰	۳۵/۷۵	۳/۶۸	ns	ns	ns

a و b: میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی وجود تفاوت معنی‌دار می‌باشد (**: $P \leq 0.01$، *: $P \leq 0.05$، ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار)

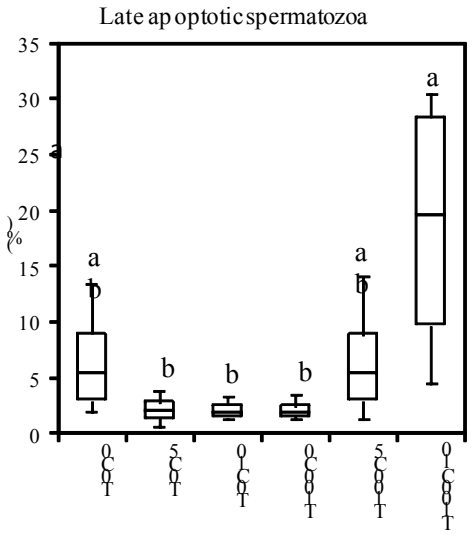
نتایج گزارش‌شده در نمودارهای ۱ و ۲ اثرات متقابل سطوح مختلف تره‌هالوز و سیستئین در مورد اسپرم‌های زنده و اسپرم‌های در مرحله نهایی آپوپتوزیس را نشان می‌دهد. تیماری که حاوی ۱۰ میلی‌مول سیستئین و بدون تره‌هالوز بود (T0C10) بیشترین زنده‌مانی (P≤۰,۰۵) و کمترین میزان اسپرم‌های آپوپتوز شده را نشان داده است. براساس این نتایج، نامطلوب‌ترین ترکیب، گروه تیماری حاوی ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز و ۱۰ میلی‌مول سیستئین (T100C10) بوده است (P≥ ۰,۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱- اثر متقابل سطوح مختلف ترهالوز و سیستئین بر میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها. T_0C_0: رقیق‌کننده بدون ترهالوز و بدون سیستئین، T_0C_5: رقیق‌کننده بدون ترهالوز و حاوی ۵ میلی‌مول سیستئین، T_0C_{10}: رقیق‌کننده بدون ترهالوز و حاوی ۱۰ میلی‌مول سیستئین، $T_{100}C_0$: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز و بدون سیستئین، $T_{100}C_5$: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز و ۵ میلی‌مول سیستئین و $T_{100}C1_0$: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز و ۱۰ میلی‌مول سیستئین.



نمودار ۲- اثر متقابل سطوح مختلف ترهالوز و سیستئین بر میزان اسپرم‌هایی که در مرحله نهایی آپوپتوز هستند. T_0C_0: رقیق‌کننده بدون ترهالوز و بدون سیستئین، T_0C_5: رقیق‌کننده بدون ترهالوز و حاوی ۵ میلی‌مول سیستئین، T_0C_{10}: رقیق‌کننده بدون ترهالوز و حاوی ۱۰ میلی‌مول سیستئین، $T_{100}C_0$: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز و بدون سیستئین، $T_{100}C_5$: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز و ۵ میلی‌مول سیستئین و $T_{100}C1_0$: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز و ۱۰ میلی‌مول سیستئین.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن ۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز به رقیق‌کننده باعث کاهش شدید فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم می‌شود. این نتایج برخلاف نتایج نجفی و همکاران (۲۰۱۳) در ارتباط بااثر این دی‌ساکارید بر ویژگی‌های اسپرم قوچ بود. آن‌ها گزارش کردند که افزودن ۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز به همراه ۵ درصد گلیسرول باعث افزایش معنی‌دار جنبایی کل و پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم‌ها می‌شود (۲۱). همچنین، در مطالعه‌ای دیگر، پژوهشگران میزان بهینه ترهالوز در محافظت از اسپرم قوچ را ۵۰ میلی‌مول برآورد کردند (۸). در مقابل، نتایج پژوهش حاضر با مطالعه‌ی اسکوایرز و همکاران (۲۰۰۴)که اثر سرما محافظ‌های مختلف را در بهبود ویژگی‌های اسپرم اسب بررسی کردند، مطابقت داشت. آن‌ها گزارش کردند که ترهالوز نتوانست تفاوت معنی‌داری در جنبایی کل و پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم اسب، نسبت به گلوکز و رافینوز ایجاد نماید (۲۹). همچنین مدودو و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که ترهالوز هیچ اثر مثبتی بر زنده‌مانی، یکپارچگی DNA و سطح ATP اسپرم‌های یخ‌گشایی شده خروس و کبک بربری نداشت (۱۷). به نظر می‌رسد نتایج متفاوت در پژوهش‌های مختلف به دلیل تأثیرگذاری متفاوت ترهالوز در گونه‌ها و شرایط مختلف آزمایشی باشد، به‌گونه‌ای که حتی در دو مطالعه متفاوت که روی قوچ صورت گرفته

www.SID.ir

Archive of SID

است پژوهشگران دوزهای متفاوتی از ترهالوز را به‌عنوان دوز مؤثر گزارش کرده‌اند (۸ و ۲۱).

تنش اکسیداتیو فرایندی تحت تأثیر رادیکال‌های آزاد است که مهم‌ترین دلیل کاهش باروری اسپرم است. طی فرایند انجماد- یخ‌گشایی مهم‌ترین عواملی که با افزایش میزان رادیکال‌های آزاد در اسپرم باعث القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) و کاهش جنبایی و به دنبال آن کاهش باروری در گاو (۲۷)، گوسفند و بز (۱۹) و اسب (۲۶) می‌شوند عبارتند از: شوک سرمایی ناشی از تشکیل کریستال‌های یخ، ترکیبات رقیق‌کننده، نرخ سردسازی و تنش اسمزی. در این راستا و بر اساس مطالعات صورت گرفته اولین و شناخته‌شده‌ترین راهکار برای مقابله با اثرات منفی رادیکال‌های آزاد، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در رقیق-کننده است. سیستئین اسیدآمینه‌ای حاوی گوگرد (گروه تیول) است که اثر آنتی‌اکسیدانی آن در اسپرم گاو (۲۳)، خروس (۲۲) و قوچ (۸) بررسی و به اثبات رسیده است. سیستئین می‌تواند با حذف رادیکال‌های آزاد میزان آسیب وارده به سلول اسپرم توسط این رادیکال‌ها را کاهش دهد. سازوکار اصلی این فرایند در گزارش مگنس و همکاران (۱۹۸۰) آورده شده است. ان استیل- ال-سیستئین به‌عنوان پیش‌ساز بیوسنتز سیستئین و گلوتاتیون داخل سلولی است که این ترکیبات نقش اساسی در متابولیسم گلوتاتیون دارند. از طرف دیگر، گلوتاتیون نیز نقش اساسی در فعالیت سوپر اکسید دیسمیوتاز دارد که ترکیب اخیر اصلی‌ترین عامل پاکسازی رادیکال‌های آزاد در اسپرم است (۱۸). در این راستا در پژوهشی، اویسال و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که افزودن سیستئین به رقیق‌کننده اسپرم قوچ باعث افزایش میزان زنده‌مانی آن‌ها شده است (۳۳). در مطالعه‌ای دیگر، پارتیکا و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که افزودن سیستئین به رقیق‌کننده اسپرم خروس باعث بهبود جنبایی کل و پیش‌رونده و زنده‌مانی شده است (۲۲). همچنین، فوناهاشی و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که افزودن ۵ میلی‌مول سیستئین به رقیق‌کننده باعث بهبود میزان زنده-مانی اسپرم خوک می‌شود. اما برخلاف این مطالعات، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن سیستئین در حضور و یا عدم حضور ترهالوز تأثیری بر میزان فراسنجه‌های جنبایی و زنده‌مانی اسپرم گاو نداشت (۱۱). همچنین، در پژوهش حاضر مطالعه اثرات متقابل سیستئین و ترهالوز بر فراسنجه‌های اسپرم نشان می‌دهد که ترکیب تیماری که حاوی ۱۰ میلی‌مول سیستئین و بدون ترهالوز بود (T0C10) بیشترین زنده‌مانی و کمترین میزان اسپرم‌های آپوپتوز شده را داشته است. براساس نتایج بدست آمده از این پژوهش به نظر می‌رسد افزایش سطوح ترهالوز و سیستئین (T100C10) اثر هم‌افزایی نداشته و نسبت به همه‌ی تیمارهای دیگر بدترین پاسخ را نشان دادند. در این راستا، آتساهین و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که افزایش دوز ترهالوز از ۲۵ به ۷۵ میلی‌مول باعث کاهش جنبایی اسپرم بز شده در حالیه میزان مالون‌دی‌آلدهاید (MDA) کاهش‌یافته است. کاهش میزان MDA با افزایش توانایی آنتی‌اکسیدانی اسپرم‌های تیمار شده همراه بود. همچنین، آن‌ها اشاره کردند که افزایش دوزهای سیستئین از صفر به ۱۵ میلی‌مول باعث بهبود جنبایی و توانایی آنتی‌اکسیدانی اسپرم‌های می‌شود (۴). باتوجه به این یافته-ها، به نظر می‌رسد افزایش میزان ترهالوز صرف‌نظر از ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی که دارد، باعث بروز اثرات سمی در اسپرم شده و جنبایی و زنده‌مانی آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برخلاف این نتایج، بدر و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که ترکیب ترهالوز (۵ میلی‌مول)، سیستئین (۱۰۰ میلی‌مول) و هایپوتائورین (۲۰ میلی‌مول) باعث بهبود جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی آکروزومی و ظرفیت آنتی-اکسیدانی اسپرم گاومیش پس از یخ‌گشایی می‌شود (۵). بنابراین، به نظر می‌رسد برای اثبات برهمکنش دقیق ترهالوز و سیستئین بر ویژگی‌های اسپرم و باتوجه به نتایج کاملاً متفاوت در پژوهش‌های مختلف، مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است.

نتیجه‌گیری کلی

www.SID.ir

Archive of SID

بر اساس نتایج این پژوهش افزودن سیستئین و تره‌هالوز به رقیق‌کننده اسپرم گاو تأثیر مثبتی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از فرایند انجماد یخ‌گشایی ندارد. همچنین، مشخص شد که افزودن ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز می‌تواند اثر منفی بر جنبایی و زنده‌مانی اسپرم گاو دارد. باتوجه به نتایج ضدونقیض در پژوهش‌های گذشته به نظر می‌رسد برای روشن شدن همه زوایا، به مطالعات تکمیلی و بیشتر نیاز باشد.

منابع

1- Aboagla, E. M. E., and Terada, T., 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. Biology of Reproduction. 69, PP: 1245-1250.

2- Ahmad, E., and Aksoy, M., 2012. Trehalose as a cryoprotective agent for the sperm cells: A Mini Review. Animal Health, Production and Hygiene. 1, PP: 123-129.

3- Aisen, E., Alvarez, H., Venturino, A., and Garde, J., 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. Theriogenology. 53, PP: 1053-1061.

4- Atessahin, A., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., and Kızıl, M., 2008. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze–thawing process. Small Ruminant Research. 77, PP: 38-44.

5- Badr, M., Azab, A., and Rawash, Z., 2014. Effect of trehalose, cysteine and hypotaurine on buffalo bull sperm freezability, ultrastructure changes and fertilizing potentials. Assiut Veterinary Medicine Journal. 60, PP: 38-45.

6- Bansal, A. K., and Bilaspuri, G., 2010. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Veterinary Medicine International. 2011, PP: 1-8.

7- Beconi, M., Francia, C., Mora, N., and Affranchino, M., 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. Theriogenology. 40, PP: 841-851.

8- Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varışlı, Ö., Yüce, A., Tekin, N., and Akçay, A., 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. Theriogenology. 67, PP: 1060-1067.

9- Emamverdi, M., Zhandi, M., Zare Shahneh, A., Sharafi, M., and Akbari-Sharif, A., 2013. Optimization of Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically Defined Soybean Lecithin-Based Extender. Reproduction in Domestic Animals. 48(6), PP: 899-904.

10- Fukuhara, R., and Nishikawa, Y., 1973. Effects of pH, sperm concentration, washing and substrate concentration on respiration and motility of goat spermatozoa. Japanies Journal of Zootechnology Science. 44, PP: 266-270.

11- Funahashi, H., and Sano, T., 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 C. Theriogenology. 63, PP: 1605-1616.

12- Gonçalves, F., Barretto, L., Arruda, R., Perri, S., and Mingoti, G., 2010. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. Reproduction in Domestic Animals. 45, PP: 129-135.

13- Gungor, S., Ozturk, C., and Omur, A., 2017. Positive effects of trehalose and cysteine on ram sperm parameters. Veterinarni Medicina. 62, PP: 245-252.

14- Hu, J. H., Zan, L. S., Zhao, X. L., Li, Q. W., Jiang, Z. L., Li, Y. K., and Li, X., 2010. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. Journal of Animal Science. 88, PP: 1657-1662.

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

16- Liu, Z., Foote, R. H., and Brockett, C. C., 1998. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. Cryobiology. 37, PP: 219-230.

17- Madeddu, M., Berlinguer, F., Pasciu, V., Succu, S., Satta, V., Leoni, G. G., Zinellu, A., Muzzeddu, M., Carru, C., and Naitana, S., 2010. Differences in semen freezability and intracellular ATP content between the rooster (Gallus gallus domesticus) and the Barbary partridge (Alectoris barbara). Theriogenology. 74, PP: 1010-1018.

18- Magnes, L., and Li, T., 1980. Isolation and properties of superoxide dismutase from bovine spermatozoa. Biology of Reproduction. 22, PP:

www.SID.ir

Archive of SID

965-969.

19- Naijian, H. R., Kohram, H., Shahneh, A. Z., Sharafi, M., and Bucak, M. N., 2013. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process. Cryobiology. 66, PP: 151-155.

20- Naing, S., Wahid, H., Mohd Azam, K., Rosnina, Y., Zuki, A., Kazhal, S., Bukar, M., Thein, M., Kyaw, T., and San, M., 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. Animal Reproduction Science. 122, PP: 23-28.

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

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

23- Sarıözkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Ulutaş, P. A., 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, PP: 134-138.

24- SAS Institute (2002). 'SAS proprietary software release 9.0' (SAS Inst. Inc.: Cary, NC).

25- Schulz, M., Risopatrón, J., Matus, G., Pineda, E., Rojas, C., Isachenko, V., Isachenko, E., and Sánchez, R., 2017. Trehalose sustains a higher post-thaw sperm motility than sucrose in vitrified human sperm. Andrologia. 2016, PP: 1-3.

26- Seifi-Jamadi, A., Kohram, H., Zareh-Shahne, A., Dehghanizadeh, P., and Ahmad, E., 2016. Effect of various concentrations of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on freezing capacity of Turkman stallion sperm. Animal Reproduction Science. 170, PP: 108-113.

27- Shah, N., Singh, V., Yadav, H. P., Verma, M., Chauhan, D. S., Saxena, A., Yadav, S., and Swain, D. K., 2017. Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Hariana bull spermatozoa. Animal Reproduction Science. 182, PP: 111-122.

28- Sikka, S. C., Rajasekaran, M., and Hellstrom, W. J., 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. Journal of Andrology. 16, PP: 464-468.

29- Squires, E. L., Keith, S. L., and Graham, J. K., 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. Theriogenology. 62, PP: 1056-1065.

30- Storey, B. T., Noiles, E. E., and Thompson, K. A., 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. Cryobiology. 37, PP: 46-58.

31- Thomas, A., Meyers, S., and Ball, B., 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. Theriogenology. 65, PP: 1531-1550.

32- Thys, M., Nauwynck, H., Maes, D., Hoogewijs, M., Vercauteren, D., Rijsselaere, T., Favoreel, H., and Van Soom, A., 2009. Expression and putative function of fibronectin and its receptor (integrin α5β1) in male and female gametes during bovine fertilization in vitro. Reproduction. 138, PP: 471-482.

33- Uysal, O., and Bucak, M., 2007. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. Acta Veterinaria Brunensis. 76, PP: 383-390.

34- Uysal, O., Bucak, M., Yavas, I., and Varisli, O., 2007. Effect of various antioxidants on the quality of frozen–thawed bull semen. Journal of Animal and Veterinary Advances. 6, PP: 1362-1366.

35- Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneh, A., Najafi, A., Mahdi Nabi, M., Mohammadi- and Sangcheshmeh, A., 2013. Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Ruminant Research. 114, PP: 120-125.

36- Zhu, Z., Fan, X., Pan, Y., Lu, Y., and Zeng, W., 2017. Trehalose improves rabbit sperm quality during cryopreservation. Cryobiology. 75, PP: 45-51.

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of trehalose and cysteine on bull sperm quality after freezing

Zhandi M.[1], Nejati-Amiri E.[1], Nejati-Javaremi A.[1], Sharafi M.[2], Seifi-Jamadi A.[1] and Veseghi Dodaran H.[3]

[1] **Animal Science Dept., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. of Iran**

[2] **Poultry Science Dept., Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, I.R. of Iran**

[3] **Animal science Dept., Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran**

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of different doses of trehalose and cysteine on bull frozen-thawed sperm quality. In this study, semen samples were collected from three healthy mature Holstein bulls by an artificial vagina. After primary evaluations, the samples were pooled to eliminate individual effects. Then, semen samples were divided into six equal parts and each part was extended and frozen with one of the following extenders. 1) without cysteine and trehalose (T_0C_0), 2) Five mM cysteine without trehalose (T_0C_5), 3) Ten mM cysteine without trehalose (T_0C_{10}), 4) A hundred mM trehalose without cysteine ($T_{100}C_0$), 5) Five mM cysteine with 100 mM trehalose ($T_{100}C_5$), 6) Ten mM cysteine with 100 mM trehalose ($T_{100}C_{10}$). Motility parameters, acrosome and membrane integrity and phosphatidylserine translocation assay were evaluated after thawing. All data were analyzed using a 2×3 factorial trail following data collection. The results of this study showed that cysteine had no effect on motion characteristics, apoptotic status, acrosome integrity and viability ($P\geq0.05$). Also motion parameters, viability, acrosome and membrane integrity, in group without trehalose was higher than group containing that ($P\leq0.05$). Regarding to interactive effects, the T_0C_{10} group had higher amount of viability ($P\leq0.05$) and lower necrotic sperms compared to rest of the groups. Based on the results, it can be concluded that cysteine had no remarkable effect and addition of Trehalose could negatively affects post-thawed bull sperm quality.

Key words: Antioxidants, Bull semen, Cryopreservation, Semen Freezing.

www.SID.ir