مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۸، شماره ٤، زمستان ۱۳۹٦

تاثیر سطوح متفاوت سولفات روی به رقیق کننده منی بر کیفیت اسپرم قوچ نژاد فراهانی پس از انجماد–ذوب

مبینا پویا .M.Sc، مهدی خدایی مطلق .Ph.D*، امیرحسین خلت آبادی فراهانی .Ph.D، مهدی میرزایی .Ph.D

– دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی، اراک، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-motlagh@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۶

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر افزودن سطوح متفاوت روی به رقیق‌کننده‌ی منی بر ویژگی‌های حیاتی اسپرم پس از انجماد-ذوب در قوچ بود.

مواد و روش‌ها: اسپرم‌گیری از پنج راس قوچ نژاد فراهانی (با میانگین سنی ۰/۵±۳ سال و وزن ۵±۶۰ کیلوگرم)، هفته‌ای دوبار انجام شد. منی از قوچ‌ها توسط واژن مصنوعی جمع‌آوری شده و سپس برای جلوگیری از اثرات فردی هر قوچ، نمونه‌ها با هم مخلوط شدند. نمونه‌های اسپرم (در پنج تکرار) به‌طور تصادفی به چهار گروه (سطوح صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومول سولفات‌روی) تقسیم شدند، که به‌هر فالکون مقدار رقیق‌کننده‌ی مورد نظر افزوده شد و با سولفات‌روی و تریس مخلوط شده و جهت انجام مراحل فریز آماده‌سازی شدند. نمونه‌ها در پایوت‌های نیم میلی‌لیتری و در شرایط هم‌دما و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با نمونه‌ها نگه‌داری و در این شرایط پر و منجمد شدند. نمونه‌های اسپرم بعد از یخ‌گشایی از نظر ویژگی‌های: تحرک، تحرک پیشرونده، زنده‌مانی (تست ائوزین– نگروزین)، یکپارچگی غشای اسپرم (هاست) و ریخت‌شناسی اسپرم‌ها (تست هانکوک) بررسی شدند.

نتایج: نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری در درصد تحرک و یکپارچگی غشای اسپرم در محیط‌های دارای سولفات روی با گروه شاهد مشاهده نشد. تیمار ۵۰ میکرومول سولفات روی سطح معنی‌داری بیشتری در درصد تحرک پیشرونده در مقایسه با گروه شاهد از خود نشان داد ($p<۰/۰۵$). از نظر افزایش درصد زنده‌مانی، سطح دارای ۱۰۰ میکرومول سولفات روی در مقایسه با سطوح دارای ۵۰ و۱۵۰ میکرومول سولفات روی، اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: استفاده از سولفات روی در رقیق‌کننده‌ی منی قوچ احتمالا می‌تواند سبب بهبود برخی فراسنجه‌های اسپرم بعد از فرایند انجماد-ذوب شد.

واژگان کلیدی: سولفات روی، قوچ، اسپرم، رقیق‌کننده

مقدمه

فرآیند انجماد منجر به بروز شوک سرمایی و حمله اکسیداتیو در غشا اسپرم شده که بقای اسپرم و قدرت باروری آن را کاهش داده و در نهایت سبب مرگ اسپرم و تاثیر منفی بر تلقیح مصنوعی می‌شود (۱). رادیکال‌های آزاد را می‌توان اصلی‌ترین عامل تنش شیمیایی یا تنش اکسیداتیو، طی فرایند انجماد-ذوب دانست که به‌دو نوع ROS (Reactive Oxygen Species) و RNS (Reactive Nitrogen Species) دسته‌بندی می‌شوند (۲ و ۳). همواره در سال‌های اخیر محققین تحقیقات زیادی را در مورد نحوه حذف رادیکال‌های آزاد از محیط‌های انجماد-ذوب داشته‌اند. البته لازم به‌ذکر است که تمام روش‌های جلوگیری از فعالیت رادیکال‌های آزاد همواره در دسته روش‌های تدافعی بوده است (۴). این روش‌ها به‌طور رایج شامل استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌هایی همچون گلوتاتیون، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و سایر آنزیم‌های سنتتیک می‌باشد که قابلیت نسبتا خوبی برای مقابله با رادیکال‌های آزاد دارند (۵). در تحقیقات اخیر محققان نشان دادند که افزودن آنتی‌اکسیدانت‌ها به محیط انجماد گونه‌های مختلف، باعث بهبود صفات تحرک، زنده‌مانی و باروری اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی می‌شود (۶ و ۷).

عنصر روی یکی از آنتی‌اکسیدانت‌های مهم می‌باشد که در تشکیل پروتئین zinc finger نقش دارد (۸). این پروتیئن در نواحی خاصی با DNA باند می‌شود. روی یک عنصر ضروری برای باند شدن این پروتئین با DNA است (۹). غلظت روی در اعضایی همچون پروستات، بیضه و مایع سمینال بالا است و این مطلب نشان‌دهنده نقش روی در دستگاه تولید مثل می‌باشد که به‌صورت تقویت اسپرماتوژنز، بلوغ اسپرم و حفظ اپی‌تلیوم زاینده می‌باشد (۱۰ و ۱۱). همچنین روی یک عنصر آنتی‌اکسیدانتی است و نقش مهم و محافظت‌کننده‌ای در برابر رادیکال‌های آزاد دارد (۱۲ و ۱۳).

بین غلظت روی و تستوسترون پلاسما ارتباط معنی‌داری وجود دارد بنابراین تامین روی کافی برای عملکرد اسپرم ضروری است (۱۴). سایر مطالعات نشان می‌دهند کمبود روی سبب آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز شده و باعث اختلال اسپرماتوژنز در رت‌ها می‌شود (۱۵).

در مطالعه دیگر نشان داده شده است که مصرف روی می‌تواند از آسیب بیضه و توکسیستاشیاز کرومیوم جلوگیری کند (۹). همچنین در تحقیقی دیگر نشان داده شده است که روی یک عنصر حیاتی جهت حفظ خصوصیات اسپرم می‌باشد (۱۶). روی در حفظ سلامتی اسپرم دارای نقش اساسی است و سبب حفظ ساختمان اسپرم و کروماتین هسته، افزایش فعالیت اسپرم و حرکت رو به جلوی اسپرم می‌شود و کمبود آن سبب از بین رفتن واکنش آکروزومی و اختلال در قدرت باروری تخمک می‌شود (۱۰). همچنین تعداد و وزن موش‌های نر دریافت‌کننده روی به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه قرار گرفته در معرض صوت افزایش یافت در این مطالعه به وضوح مشخص شد که میزان جنین‌های مرده و حتی جذب شده با مصرف روی کاهش می‌یابد (۱۲).

طبق گزارش‌های مشخص شده که روی برای ساخت اسپرم و تولید تستوسترون ضروری است. اضافه کردن روی باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی اسپرم می‌شود و لیپیدهای غشای اسپرم را از پراکسیداسیون محافظت می‌کند (۱۷) غلظت روی مایع منی ارتباط مستقیم با جنبایی، زنده‌مانی و ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم‌ها دارد (۱۸). افزودن روی به محیط رقیق‌کننده به‌علت خاصیت آنتی‌اکسیدانتی از تاثیرات مخرب ROSها جلوگیری می‌کند، در نتیجه می‌تواند تاثیر مهمی در کاهش آسیب‌رسانی به DNA و پراکسیداسیون لیپید اسپرم طی انجماد منی داشته باشد (۱۹).

هدف از این پژوهش، مقایسه‌ی اثر افزودن سطوح متفاوت روی به رقیق‌کننده‌ی منی بر ویژگی‌های حیاتی اسپرم پس از انجماد در قوچ نژاد فراهانی بود. از صفات کیفی مورد بررسی می‌توان به تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، یکپارچگی غشا، زنده‌مانی و ریخت‌شناسی سلول اسپرم اشاره کرد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در مزرعه‌ی دامپروری و آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اراک انجام شد. برای این منظور، تعداد پنج رأس قوچ بالغ نژاد فراهانی استفاده (با میانگین سنی۰/۵±۳ سال و وزن ۵±۶۰ کیلوگرم)، شد. جمع‌آوری منی با استفاده از مهبل مصنوعی هفته‌ای دوبار انجام گرفت. سپس نمونه‌های منی به آزمایشگاه منتقل و بررسی‌های ابتدایی روی آن‌ها انجام گرفت (جدول ۱). نمونه‌های جمع‌آوری شده همه با هم به‌دلیل جلوگیری از اثرات و پراکنش در قوچ‌ها مخلوط شده و برای آنالیزهای مربوطه مورد استفاده قرار گرفتند. در این آزمایش از رقیق‌کننده بر پایه‌ی تریس استفاده شد که ترکیبات آن شامل: ۳/۶۳۴ گرم تریس (هیدروکسی متیل) آمینومتان، ۰/۵ گرم فروکتوز، ۱/۹۹ گرم اسید سیتریک، ۱۵ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ، ۵ میلی‌لیتر گلیسرول، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین، ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین و آب مقطر برای رساندن حجم رقیق‌کننده به ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌باشد. pH=۷ و اسمولاریته ۳۲۰ میلی‌اسمول، به عنوان رقیق‌کننده پایه منی استفاده شد.

تیمارها شامل: تیمار۱: رقیق‌کننده پایه تریس، تیمار۲: رقیق‌کننده حاوی ۸/۰۵ میلی‌لیتر ماده روی سولفات، تیمار ۳: رقیق‌کننده تریس حاوی ۱۶/۱ میلی‌لیتر ماده سولفات روی و تیمار۴: رقیق‌کننده تریس حاوی۲۴/۱۶ میلی‌لیتر ماده سولفات‌روی. پس از تهیه‌ی تیمارهای آزمایشی اقدام به ریختن نمونه‌ها به‌درون پایوت‌های۰/۵ میلی‌لیتری شد و به‌منظور سپری شدن دوره‌ی تعادل (کاهش دما به ۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت) پس از دوره‌ی تعادل پایوت‌ها در فاصله ۵ سانتی‌متری به‌مدت ۱۰ دقیقه در معرض بخار ازت مایع منجمد و سپس در ازت مایع غوطه‌ور شدند و برای نگه‌داری به تانک ازت منتقل شدند (۲). برای بررسی جنبایی اسپرم سه پایوت از هر گروه تیمار ذوب شده و به‌داخل لوله‌های اپندروف انتقال داده شدند، سپس با استفاده از سمپلر و با برداشتن ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام و گذاشتن یک لامل تمیز روی آن، لام مورد نظر با استفاده از نرم‌افزارCASA فراسنجه‌های ارزیابی تحرک مانند درصد کل اسپرم‌های متحرک و درصد اسپرم‌های پیشرونده محاسبه شدند.

برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین استفاده شد. مواد تشکیل‌دهنده این محیط شامل: رنگ ائوزین (۱۶/۷ گرم در لیتر)، رنگ نگروزین (۱۰۰ گرم در لیتر) و سیترات‌سدیم (۲۹ گرم در لیتر) و آب مقطر تا رساندن به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر بود. برای این رنگ‌آمیزی ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های اسپرم را روی لام قرار داده شد. ۲۰ میکرولیتر از رنگ آماده شده را برداشته و روی نمونه ریخته و با سرسمپلر به‌آرامی نمونه را هم زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ۳۰ ثانیه، ۲۰ میکرولیتر از مخلوط نمونه و رنگ را برداشته و در گوشه لام دیگری گذاشته شد و با یک لام دیگر روی آن به‌آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن، لام زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ قرار داده شد و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کم‌رنگ به‌خود گرفته یا تنها بخشی از آن‌ها رنگ گرفته بود نیز به‌عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شد (۱).

جدول۱: ارزیابی فراسنجه اسپرم‌ها پس از جمع‌آوری (درصد)

زنده‌مانی	حرکت موجی	تحرک	حرکت پیشرونده	ناهنجاری‌ها	اسپرم طبیعی
۸۰±۷	۵±۰/۰۵	۸۶±۵	۸۰±۳	۷±۱	۹۳±۱

یکپارچگی غشای پلاسمایی با استفاده از تست محلول هایپواسموتیک (HOST) شامل: (فروکتوز ۰/۹ گرم، سدیم سیترات ۰/۴۹ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) استفاده شد (۲۰). برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک اضافه شد. سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده پس از انکوباسیون نمونه با ملایمت مخلوط شده و یک قطره از نمونه‌های انکوبه شده را روی لامی که قبلا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم شده قرار داده و سپس آن‌را با لامل پوشانیده شد، ارزیابی و شمارش اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری فازکنتراست و با بزرگنمایی ۴۰۰ صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. اسپرم‌هایی با دم گره‌خورده به‌عنوان اسپرم‌های زنده و اسپرم‌هایی که دم آن‌ها صاف است به‌عنوان اسپرم مرده تلقی می‌شوند. برای ارزیابی اسپرم با مورفولوژی غیر طبیعی حداقل سه قطره از هر نمونه به میکروتیوپ‌های حاوی یک میلی‌لیتر محلول هانکوک که این محلول شامل: فرمالین ۳۷ درصد (۶۲/۵ میلی‌لیتر)، محلول سالین (۱۵۰ میلی‌لیتر)، محلول بافر فسفات (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دوبار تقطیر ۵۰۰ میلی‌لیتر می‌باشد (۲۱). منابع افزوده شده و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفت و توسط یک لامل پوشانده شده و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی (آکروزوم غیرطبیعی، سر جدا شده، انتهای دم و میانه غیرطبیعی اسپرم) به کل اسپرم‌های شمارش شده محاسبه شده و درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی حساب شد.

آنالیز آماری

ارزیابی نرمال بودن و آنالیز واریانس داده‌ها به‌ترتیب با استفاده از رویه‌ی univariate وGLM در نرم‌افزار SAS 9.1 انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس مدل طرح کاملا تصادفی صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها به‌روش دانکن و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

تحرک

با توجه به نتایج حاصل از آنالیز فراسنجه‌ی تحرک که در جدول ۲ آمده است، میانگین تحرک کل در تمام سطوح با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشتند.

جدول ۲: اثر غلظت سولفات روی (میکرومول) بر خصوصیّت درصد تحرّک اسپرم قوچ

فراسنجه اسپرم	۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	p-value	SEM
تحرک کل (درصد)	۵۵	۵۱/۸۰	۵۰/۶۰	۵۴/۲۰	۰/۷۰	۱/۴۳

تحرک پیشرونده: در این تحقیق با توجه به آنالیز مربوط به تحرک پیشرونده اسپرم‌ها، میانگین تحرک پیشرونده گروه کنترل (جدول ۳) با تیمار حاوی ۵۰ میکرومول سولفات روی در سطوح معنی‌داری بود (p<۰/۰۵). ولی با سایر سطوح تفاوت معنی‌داری نداشت (کاهش معنی‌دار حدود ۱۲ درصدی سطح ۵۰ میکرومول نسبت به گروه کنترل)

جدول ۳ :اثر غلظت سولفات روی بر خصوصیّت درصد پیشروندگی اسپرم قوچ

فراسنجه اسپرم	۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	P-value	SEM
پیشروندگی (درصد)	۴۳/۴۰[a]	۳۲[b]	۳۴/۲۰[ab]	۴۰/۲۰[ab]	۰/۰۵	۱/۷۳

یکپارچگی غشای اسپرم

در این تحقیق با توجه به آنالیز مربوط به یکپارچگی غشای اسپرم‌ها که در جدول ۴ آمده است، میانگین یکپارچگی غشای اسپرم گروه کنترل، با همه سطوح هیچ تفاوت معنی‌داری نداشت. از نظر عددی سطح حاوی ۱۰۰ میکرومول سولفات‌روی با ۷۵/۸ درصد بیشترین و سطح حاوی ۱۵۰ میکرومول سولفات‌روی با ۶۱/۴ درصد کمترین درصد یکپارچگی را به خود اختصاص دادند.

جدول ٤: اثر سطوح سولفات‌روی (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میکرومول) بر فراسنجه‌ی یکپارچگی غشای اسپرم قوچ فراهانی

فراسنجه اسپرم	۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	P-value	SEM
یکپارچگی‌غشاء (درصد)	۶۹	۶۵/۸	۷۵/۸	۶۱/۴	۰/۱۳	۲/۲۵

زنده‌مانی

در این تحقیق با توجه به آنالیز مربوط به زنده‌مانی اسپرم‌ها که در جدول ۵ آمده است، صفت زنده‌مانی در سطح معنی‌داری قرار داشت (p<۰/۰۵). از نظر آماری سطح دارای ۱۰۰ میکرومول سولفات‌روی با سطح دارای ۱۵۰ میکرومول اختلاف معنی‌داری از خود نشان داد و در مقایسه با سطح ۱۵۰ میکرومول افزایش معنی‌دار چشمگیری (حدود ۲۳ درصد) را دارا بود (p<۰/۰۵). ولی با سایر سطوح تفاوت معنی‌داری نداشت.

ریخت‌شناسی

در این تحقیق با توجه به آنالیز مربوط به ریخت‌شناسی اسپرم‌ها که در جدول ۵ آمده است، از نظر آماری، میانگین ریخت‌شناسی گروه کنترل و سطح دارای ۱۰۰ میکرومول سولفات‌روی اختلاف معنی‌داری را با سطح حاوی ۱۵۰ میکرومول سولفات‌روی داشتند (p<۰/۰۵). ولی با سطح حاوی ۵۰ میکرومول اختلاف معنی‌داری نداشتند. در حالی‌که از نظر عددی سطح حاوی ۱۵۰ میکرومول سولفات‌روی کمترین درصد مربوط به صفت ریخت‌شناسی که معادل۴۴/۸٪ بود و بیشترین میزان را گروه کنترل با ۵۶/۶ درصد به خود اختصاص داد.

جدول ۵: اثر غلظت سولفات روی بر خصوصیّت درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ

فراسنجه اسپرم	۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	P-value	SEM
زنده‌مانی (درصد)	۴۸/۶^{ab}	۴۲/۲^{ab}	۵۸/۶^{a}	۳۶/۴^{b}	۰/۰۲	۲/۸۸
ریخت‌شناسی (درصد)	۵۶/۶^{a}	۵۰/۴^{ab}	۵۵/۴^{a}	۴۴/۸^{b}	۰/۰۱	۱/۵۳

حروف متفاوت نشان از معنی‌داری می‌باشد.

بحث

تحرک اسپرم فراسنجه‌ی مهمی است که به شدت با توانایی اسپرم برای انتقال در سراسر مجاری تناسلی ماده برای رسیدن، واکنش و بارور کردن اووسیت ثانویه مرتبط است. علت ناباروری جنس نر ممکن است به‌خاطر کاهش قابل توجه در تعداد اسپرم‌های متحرک و یا اختلال در کیفیت حرکتی اسپرم باشد. عملکرد میتوکندری به‌عنوان یک عامل احیاکننده‌ی تحرک اسپرم شناخته شده است. میتوکندری اسپرم واقع در قطعه‌ی میانی بوده و انرژی مورد نیاز برای تولید و انتشار امواج تاژکی را فراهم می‌کند (۲۲)

تحرک اسپرم یکی از مهم‌ترین فراسنجه‌ها بوده که به‌طور جدی تحت تاثیر فرایند انجماد قرار می‌گیرد. معمولا تصور می‌شود تحرک اسپرم یکی از مهم‌ترین ویژگی‌ها برای ارزیابی قدرت باروری اسپرم انزال شده است. نشان داده شده است که لقاح تخمک انسان و حیوانات در شرایط آزمایشگاهی ارتباط مثبتی با تحرک اسپرم دارد (۲۳). مطالعات پیشین نشان داد که ویژگی‌های حرکتی اسپرم رابطه مستقیمی با عملکرد باروری دارد (۲۴). به‌طوری‌که اسپرم‌هایی با سرعت حرکتی بیشتر شانس بالاتری را برای رسیدن به محل لقاح دارند. این در حالی است که به سبب آسیب‌های وارده به اسپرم در طول انجماد از میزان تحرک سلول‌ها به‌طور محسوس کاسته می‌شود. بنابراین افت باروری گله با به‌کار بردن اسپرم منجمد شده اجتناب ناپذیر است. محققین در این زمینه اشاره نموده‌اند که ویژگی‌های حرکتی اسپرم با میزان فعالیت میتوکندری‌ها به‌عنوان موتور تامین کننده انرژی حرکت اسپرم ارتباط نزدیکی دارد (۲۵). غلظت‌های بالای گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند برای سلامت سلول‌ها و فعالیت میتوکندری مخاطره آمیز باشد. در عین حال آنتی‌اکسیدانت‌هایی نظیر سوپر اکسید دیسموتاز نقش غیر قابل انکاری در پاک‌سازی گونه‌های آزاد اکسیژنی ایفا می‌کند. لذا افزودن آنتی‌اکسیدانت‌ها به منی، با بهبود شرایط محیطی برای اسپرم و افزایش زنده‌مانی، تحرک بیشتر اسپرم‌ها را نیز به‌همراه خواهد داشت. مطالعات حاکی از آن است که عنصر روی نقش کلیدی در پایداری غشا و خصوصیات مکانیکی فیبرهای ضمیمه، مورفولوژی دم اسپرم و تحرک اسپرم ایفا می‌کند. همچنین روی در ارتباط با ATP بوده، در انقباض و تنظیم انرژی فسفولیپیدهای آن نقش دارد و بنابراین تاثیر مستقیمی بر تحرک اسپرم دارد (۲۶). در حالی‌که در این پژوهش تغییر سطوح عنصر روی به‌شکل سولفات روی اثر معنی‌داری بر تحرک نداشت و با نتایج Lewis و همکاران(۲۶) تفاوت داشت احتمالا اختلاف در نژاد حیوان مورد استفاده در تحقیق و همچنین سطوح عنصر روی و نوع استفاده از ترکیب روی تفاوت وجود داشته است. در حین عبور اسپرم از اپی‌دیدیم، روی بین سلول‌های اپی‌تلیال و اسپرماتوزوئید مبادله می‌شود (۲۷). دفع روی اضافی از اسپرم، مرحله‌ای ضروری برای فرایند

توانا شدن اسپرم و نفوذ آن در منطقه زونا تخمک است و اسپرم‌هایی که روی زیادی خود را از دست داده باشند قادر به نفوذ در تخمک نیستند (۲۸). دادن مکمل روی به حیوانات مبتلا به کمبود آن، با افزایش غلظت و میزان تحرک اسپرم باعث بهبود در باروری می‌شود (۲۹). Kendall و همکاران (۳۰) گزارش کردند که قوچ‌هایی که در مرتع چرا می‌کردند و به نظر نمی‌رسید که کمبود روی داشته باشند، مکمل روی خوراندند و کیفیت منی آنها را با اندازه‌گیری حجم منی، اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، مورفولوژی غیر طبیعی، تحرک و درصد اسپرم زنده و میزان روی در پلاسمای منی را ارزیابی کردند. قوچ‌های با جیره مکمل‌دار، افزایش چشم‌گیر تحرک و درصد اسپرم زنده نشان دادند. در آزمایش حاضر نتایج تا حدودی با تحقیق مذکور اختلاف داشت و شاید تفاوت در نحوه استفاده از روی علت آن باشد در تحقیق حاضر کار در محیط آزمایشگاهی انجام شد در حالی‌که در تحقیق Kendall و همکاران عنصر روی به صورت خوارکی به حیوان تغذیه شد از طرف دیگر امکان دارد که نوع روی جیره آلی باشد در حالی‌که در مطالعه حاضر از سولفات روی که به‌صورت معدنی بود استفاده شد. اختلاف در نژاد قوچ هم می‌تواند در این تفاوت موثر باشد. وجود مقدار زیاد روی در رقیق‌کننده منی، درصد تحرک اسپرم را پایین می‌آورد که ناشی از بالا رفتن مشتقات آزاد روی است که توسط اسپرم جذب می‌شود (۳۱) و باعث کاهش قابلت دسترسی اکسیژن می‌شود، چون مقدار زیاد روی مصرف اکسیژن اسپرم را مختل می‌کند (۳۲ و ۳۳) Dorostkar و همکاران (۳۴)گزارش کردند افزودن سولفات روی به رقیق‌کننده منی، توان آنتی‌اکسیدانی تام اسپرم را بعد از انجماد به‌شکل وابسته به دوز بالا می‌برد. Omu و همکاران (۳۵) بهبود فراسنجه‌های اسپرم که با افزودن مکمل روی به منی ایجاد می‌شود، با افزایش توان آنتی‌اکسیدانی منی و کاهش حالت تنش اکسیداتیو همراه است. Hidiroglou و Knipfel (۱۷) نیز توان آنتی‌اکسیدانتی یون‌های روی را در مرحله تعادل و انجماد منی گزارش کردند که سبب تحرک می‌شود. طبق مطالعات انجام شده که در سه نژاد گوسفند در الجزایر انجام گرفت دیده شد که مکمل‌های خوراکی در بهبود فراسنجه‌های اسپرم نقش قابل توجهی را دارد و تنها فراسنجه‌ی تحرک پیشرفت معنی‌داری نداشت (۳۶). Alavi- Shoushtari و همکاران (۱۸)، میانگین میزان عنصر روی پلاسمای منی ۵۴ نمونه منی گاومیش را در شمال غرب کشور حدود ۱۵۴/۴ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند که با میزان تحرک رو به جلو، توان زنده ماندن و با میزان کاتالاز ارتباط خیلی زیاد، با تحرک گروهی ارتباط مثبت و با مورفولوژی غیر طبیعی ارتباط منفی داشت. در این بررسی، گروهی از نمونه‌های منی که در پلاسما، روی بیشتری داشتند طی فرایند انجماد-ذوب کیفیت خود را بهتر حفظ کرده و آسیب کمتری دیدند. تحرک پیش‌رونده‌ی اسپرم به همراه برخی از فراسنجه‌های سرعت برای رسیدن اسپرم به مرحله‌ی لقاح ضروری می‌باشند. فراسنجه‌های تحرک و سرعت به‌طور غیر مستقیم عملکرد میتوکندری و وضعیت انرژی سلول اسپرم را بیان می‌کنند (۳۷). تحقیقات پیشین نشان داد که استفاده از سوپراکسیددیسموتاز در رقیق‌کننده نگه‌داری کوتاه مدت اسپرم اسب و انجماد منی خوک سبب حفظ ویژگی‌های حرکتی و عملکرد سلول‌های اسپرم و در نهایت بهبود باروری می‌شود (۳۸ و ۳۹).

رادیکال‌های آزاد در غلظت‌های کنترل‌شده و پایین در عمل‌کردهای خاصی از اسپرم از قبیل ظرفیت‌دار شدن و واکنش آکروزومی نقش تنظیم‌کننده دارند. بنابراین برای فهم درستی از عمل‌کرد اسپرم باید تعادل لیپیدها، رادیکال‌های فعال اکسیژنی و اجزای مختلف سیستم آنتی‌اکسیدانتی سلول را در نظر گرفت.

در حالی‌که در تحقیق حاضر میزان تحرک بعد از انجماد با استفاده از عنصر روی کاهش یافت که از علل

آن می‌توان به شرایط انجماد و ذوب، تفاوت نژاد مورد تحقیق، سطوح متفاوت عنصر روی اشاره کرد. مطالعات نشان می‌دهد در طول فرایند انجماد-ذوب، با افزایش سطح ROS یا به‌عبارت دیگر تنش اکسیداتیو، اسیدهای چرب غیراشباع غشاء پلاسمایی اسپرم گاو مستعد پراکسیداسیون است، به‌علاوه ترکیبات سمی حاصل از این فرایند (مانند مالونیل‌دی‌آلدئید) می‌تواند در ساختمان و عملکرد اندامک‌های مهمی مانند غشای پلاسمایی، میتوکندری و DNA اختلال ایجاد کند، در نتیجه این تغییرات، تحرک و در نهایت باروری اسپرم را کاهش می‌دهد (۴۰). اضافه کردن آنتی‌اکسیدانت‌های لازم برای محافظت از غشای سلول‌های اسپرم و جلوگیری از تشکیل پراکسیداسیون لازم و ضروری است و می‌تواند اثرات زیان‌بار رادیکال‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داده و سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی منی از قبیل جنبایی پس از ذوب شود (۲۱). در پژوهشی روی اسپرم گاومیش، نشان داده شد که عنصر روی موجود در پلاسمای منی ارتباط مستقیمی با تحرک پیشرونده اسپرم‌ها دارد (۱۸). بین عنصر روی پلاسمای منی و تعداد اسپرم ارتباط قابل توجهی وجود دارد (۴۱).

عنصر روی باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم می‌شود و لیپیدهای غشای اسپرم را از پراکسیداسیون محافظت می‌کند (۱۷). همچنین محققین دریافتند که روی در حفظ سلامتی اسپرم دارای نقش اساسی است و باعث حفظ ساختمان اسپرم و حرکت رو به جلوی اسپرم‌ها می‌شود (۴۲) در تحقیق حاضر افزودن عنصر روی باعث کاهش معنی‌دار تحرک پیشرونده اسپرم‌ها در سطح ۵۰ میکرومول سولفات‌روی نسبت به گروه کنترل شد و با نتایج Saksena و همکارانش (۴۲) در یک راستا نبود که از علل آن می‌توان به نژاد حیوان، اثر تنش اکسیداتیو و میزان دوز مصرفی سولفات‌روی اشاره کرد. میزان عنصر روی موجود در اسپرم بعد از قرار گرفتن در مایع منی افزایش می‌یابد و نشان می‌دهد که اسپرم، این فلز را هنگام عبور از بیضه به مجرای ادرار، در خود ذخیره می‌کند.

اضافه کردن آنتی‌اکسیدانت‌های لازم برای محافظت از غشای سلول‌های اسپرم و جلوگیری از تشکیل پراکسیداسیون اکسیژن لازم و ضروری است و می‌تواند پراکسیداسیون لیپیدی و رادیکال‌های فعال اکسیژن را کاهش داده و سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی منی از قبیل یکپارچگی غشای اسپرم پس از ذوب شود (۲۱). پروتئین‌ها عمل‌کرد موثر خود را در ارتباط با ساختمان آنزیم‌ها، گیرنده‌ها و کانال‌های یونی غشا از دست بدهند و در نتیجه پس از انجماد ممکن است یکپارچگی ساختاری و عملکردی غشای اسپرم‌ها از بین برود (۴۳). در پژوهش حاضر نیز در برخی سطوح با کاهش یکپارچگی غشا روبه رو شدیم که یکی از عوامل اصلی در این اتفاق می‌توان به برهم خوردن تعادل بین پروتئین-چربی اسپرم بعد از ذوب اشاره کرد. افزودن عنصر روی به عنوان آنتی‌اکسیدان به رقیق‌کننده‌ی منی از بی‌ثباتی غشای اسپرم هنگام یخ‌گشایی جلوگیری و همچنین به حفظ محتویات آکروزوم کمک می‌کند (۴۴). عنصر روی در پایداری غشا و خصوصیات مکانیکی فیبرهای ضمیمه نقش مهمی دارد. عنصر روی در پایداری غشا و خصوصیات مکانیکی فیبرهای ضمیمه نقش مهمی دارد (۲۶). Chia و همکاران (۴۵)، گزارش کردند افزودن عنصر روی باعث پایداری غشای سلول و کروماتین هسته‌ی اسپرم می‌شود که خود فاکتور اصلی در برابر فعالیت‌های ضد باکتری است. در تحقیق حاضر افزودن سولفات روی در هیچ یک از سطوح تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت که با نتایج Chia و همکارانش مغایرت داشت که از علل آن می‌توان به تنش اکسیداتیو و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و نژاد حیوان مورد استفاده اشاره کرد که با افزایش تنش

اکسیداتیو سبب کاهش یکپارچگی غشای اسپرم می‌شود.

همچنین در مطالعه‌ی دیگر نشان داده شده است که روی یک عنصر حیاتی جهت حفظ خصوصیات اسپرم می‌باشد (۱۶). روی در حفظ سلامتی اسپرم دارای نقش اساسی است و سبب حفظ ساختمان اسپرم و کروماتین هسته، افزایش فعالیت اسپرم و حرکت رو به جلوی اسپرم می‌شود و کمبود آن سبب از بین رفتن واکنش آکروزومی و اختلال در قدرت باروری تخمک می‌شود (۴۶). ولی در مطالعه‌ی حاضر افزودن عنصر روی در افزایش فراسنجه‌های اسپرم از جمله یکپارچگی نقش نداشت و می‌توان اشاره کرد که میزان افزایش یا کاهش این صفت تا حدودی به میزان دوز مصرفی سولفات‌روی و نژاد دام مرتبط می‌شود مهم‌ترین عامل در کاهش صفت یکپارچگی غشای اسپرم در این پژوهش نیز می‌توان به افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و رادیکال‌های فعال اشاره نمود درصد اسپرم‌های زنده از جمله عوامل مهم در میزان کیفیت اسپرم بعد از ذوب می‌باشد (۴۷). در طی حفاظت انجمادی، اسپرم در معرض شوک سرمایی و فشار اسمزی قرار می‌گیرد و به‌دنبال افزایش اکسیداسیون غشا باعث کاهش زنده‌مانی اسپرم می‌شود (۴۸ و ۴۹). تنش‌های ناشی از ذوب اسپرم می‌توانند باعث آسیب‌های زیادی در ساختار اسپرم شوند که در نتیجه‌ی آن غشای پلاسمایی، به‌شدت آسیب می‌بیند و در نهایت باعث کاهش تعداد اسپرم‌های زنده و کاهش باروری می‌شوند (۵۰). رادیکال‌های آزاد می‌توانند تاثیرات مضر و مفیدی بر عملکرد اسپرم داشته باشند این تاثیرات متناسب با نوع و غلظت رادیکال‌های آزاد و مدت زمانی‌که اسپرم در معرض آن قرار می گیرد، متغییر بوده و نشان داده شده 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 تعداد اسپرم‌های زنده رابطه منفی دارد (۵۱). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به‌طور گسترده برای جلوگیری از کاهش زنده‌مانی در رقیق‌کننده‌های اسپرم گونه‌های متفاوت استفاده شده‌اند (۶). عنصر روی در منی انسان نقش مهمی در عمل‌کرد فیزیولوژیکی اسپرم دارد که کاهش سطح آن در کیفیت پایین اسپرم و کاهش شانس باروری منجر می‌شود (۵۲ و ۵۳). Irani و همکاران (۵۴) در پژوهشی دریافتند که استفاده از مکمل عنصر روی به همراه فولات می‌تواند فراسنجه‌های کیفی اسپرم در جنس نر را بهبود بخشد در نهایت سبب افزایش باروری شود. بین عنصر روی پلاسمای منی و تعداد اسپرم‌ها ارتباط قابل توجهی وجود دارد (۴۲).

در پژوهشی روی اسپرم گاومیش، مشخص شد که عنصر روی موجود در پلاسمای منی ارتباط مستقیمی با زنده‌مانی اسپرم‌ها دارد (۱۸). که طبق مطالعه‌ای قوچ‌هایی که در مرتع چرا می‌نمودند و به‌نظر نمی‌آمد که کمبود روی داشته باشند، مکمل روی خوراندند و کیفیت منی آنها را با اندازه‌گیری درصد اسپرم زنده و میزان روی در پلاسمای منی را ارزیابی کردند. قوچ‌های با جیره مکمل‌دار، افزایش چشم‌گیری در تحرک و درصد اسپرم زنده نشان دادند (۳۱).

در تحقیق حاضر نیز افزایش دوز سولفات‌روی تا میزان ۱۰۰ میکرومول، سبب افزایش حداکثری میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها شد که از علل آن می‌توان به نقش آنتی‌اکسیدانتی عنصر روی اشاره کرد چرا که این ویژگی سبب کاهش تنش اکسیداتیو و فشار اسمزی شده و در نتیجه باعث افزایش کمی و کیفی اسپرم‌های زنده می‌شود که البته کاهش زنده‌مانی در دوزهای بالاتر از ۱۰۰ میکرومول سولفات‌روی می‌تواند مربوط به میزان ماده سولفات‌روی مصرفی و نیز نژاد دام مورد استفاده باشد.

تنش‌های ناشی از ذوب اسپرم می‌توانند باعث آسیب‌های زیادی در ساختمان اسپرم شوند که در

نتیجه‌ی آن غشای پلاسمایی و سیتوپلاسم و ساختمان ژنومی اسپرمی به شدت آسیب می‌بیند و در نهایت باعث کاهش باروری می‌شود (۵۰) و اضافه کردن روی باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی اسپرم می‌شود و لیپیدهای غشای اسپرم را از پراکسیداسیون محافظت می‌کند. غلظت روی مایع منی ارتباط مستقیمی با جنبانی، زنده‌مانی و ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم دارد (۵۵).

مکمل عنصر روی به اشکال آلی یا معدنی در جیره گاوهای نر دورگ باعث بهبود خصوصیات کمی (حجم انزال، غلظت اسپرم و تعداد اسپرم به ازای هر انزال) و کیفی (pH منی، تحرک توده‌ای، تحرک فردی، درصد زنده‌مانی اسپرم، درصد اسپرم غیرطبیعی و ...) می‌شود (۵۶). محققین بیان کردند که افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مختلف به رقیق‌کننده‌ی منی قوچ در طی مدت ذخیره‌سازی اسپرم، تحرک اسپرم را بهبود می‌بخشند و میزان آسیب سلولی را کاهش داده و در نهایت سبب باروری در شرایط لقاح درون آزمایشگاهی می‌شود (۱). غلظت عنصر روی مایع منی ارتباط مستقیم با ویژگی ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم‌ها دارد (۱۸). مکمل روی در قوچ‌های جوان باعث افزایش تولید اسپرم و کاهش تولید اسپرم‌های غیرطبیعی می‌شود (۵۷).

در تحقیق حاضر اضافه کردن سولفات‌روی از نظر عددی تا حدودی سبب افزایش تولید اسپرم‌هایی با مورفولوژی طبیعی گردید ولی سطح حاوی بیشترین میزان عنصر روی (۱۵۰ میکرومول) کاهش سطح معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل دارا بود و کمترین درصد اسپرم‌های با مورفولوژی سالم را به خود اختصاص دادند که با نتایج Underwood and Somers مغایرت داشت (۵۷). به‌طورکلی از علل آن می‌توان به آسیب‌های وارد شده به اسپرم در طول مدت انجماد-ذوب و رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو اشاره کرد. البته میزان دوز مصرفی این عنصر نیز در تولید اسپرم با مورفولوژی سالم نقش دارد چرا که با افزایش دوز مصرفی جذب اکسیژن توسط سلول‌های اسپرم افزایش یافته و در نتیجه تاثیر منفی بر فراسنجه‌های اسپرم و تولید اسپرم‌های ناسالم می‌شود.

نتیجه‌گیری

آزمایش نشان داد که اختلاف معنی‌داری در درصد جنبایی و یکپارچگی غشای اسپرم در محیط‌های دارای سولفات روی با گروه شاهد وجود نداشت. محیط دارای ۵۰ میکرومول سولفات روی سطح معنی‌داری بیشتری ($p<۰/۰۵$) در درصد جنبایی پیش‌رونده در مقایسه با گروه شاهد از خود نشان داد. از نظر درصد زنده‌مانی، سطح دارای ۱۰۰ میکرومول سولفات روی در مقایسه با سطوح دارای ۵۰ و۱۵۰ میکرومول سولفات روی، اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$). از نظر ریخت‌شناسی، سطح دارای ۱۵۰ میکرومول سولفات روی کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد از خود نشان داد ($p<۰/۰۵$). بنابراین استفاده از روی در رقیق‌کننده‌ی منی قوچ می‌تواند در بهبود برخی فراسنجه‌های اسپرم بعد از فرایند انجماد-ذوب موثر باشد.

منابع

1. Evans G, Maxwell WMC. "Frozen storage of semen". Salamon ś Artificial Insemination of Sheep and Goats. 1987; 122-141.

2. Bucak MN, Atessahin A, Varisli O, Yuce A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Theriogenology. 2007; 67(5): 1060-1067.

3. Chatdarong K, Chaivechakarn A, Thuwanut P, Ponglowhapan S. Effects of cold

storage prior to freezing on superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities, level of total reactive oxygen species and sperm quality in dogs. Reprod Dom Anim. 2012; 47(6): 274-277.

4. Pribenszky C, Vajta G, Molnar M, Du Y. Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. Biol Reprod. 2010; 83: 690-697.bil

5. Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. J Agric Food Chem. 2005; 53(20): 7749-7759.

6. Bilodeau JF, Blanchette S, Gangnon C, Sirard MA. Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology. 2001; 56: 275-286.

7. Roca J, Rodri´Guez, MJ, Gil, MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. J Androl. 2005; 26(1): 15-24.

8. Piedmonte M, Calendine C, Macknin ML. Zinc gluconate lozenges for treating the common cold in children A randomized controlled trial cold in children.JAMA. 1998; 279(24): 1962-1967.

9. Maham H, Escott-stump S. Krauses food and nutrition therapy. Pennsylvania Saunders Co. 2008; 764-809.

10. Masters DG, Fels HE. Effect of zinc supplementation on the reproductive performance of grazing Merino ewes. Biol Trac Elem Res. 1980; 2(4):281–90.

11. Valle BL. The biochemical basis of zinc physiology. Phys Rev. 1993; 73(1): 79-118.

12. Jain A, Agrawal BK, Jadhav AA. Serum zinc and malondialdehyde concentrations and their relation to total antioxidant capacity in protein energy malnutrition. J Nutr Sci Vit. 2008; 54(5): 392-5.

13. Roussel AM, Zouari N, Mahjoub S, Matheau JM, Anderson RA. Antioxidant Effects of Zinc Supplementation in Tunisians with Type2 Diabetes Mellitus. J Amer Coll Nutr. 2003; 22(4): 316-21.

14. Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R. Zinc and immunoresistance to infections in ageing: new biological tools. Trends Pharmacol Sci. 2000; 21(6): 205–20.

15. Rasby RJ, Berger AL, Bauer DE, Brink DR (2011). Minerals and vitamins for beef cows,http://www.ianrpubs.unl.edu/epublic/live/ec288/

16. Olivera CEA, Badu CA, Ferreira WM, Lana AMQ. Effect of dietary zinc supplementation on spermatic characteristics of Rabbit Breeders. Proceedings of the 8th World Rabbit Congress September. 2005; 7-10.

17. Hidiroglou, M, Knipfel, J. Zinc in mammalian sperm: a review. J Dairy Sci. 1984; 67(6): 1147-1156.

18. Alavi-Shoushtari S, Rezai SA, Ansari MK, Khaki A. Effects of the seminal plasma zinc content and catalase activity on the semen quality of water buffalo (Bubalus bubalis) bulls. Pak J Bio Sci. 2009; 12(2):134-139.

19. Kvist U, Björndahl L, Kjellberg S (1987). Sperm nuclear zinc chromatin stability and male fertility. Scan Micr. 1987; 1(3): 1241-1244.

20. Revell SG, Mrode RA. An osmo-tic resistant test for bovine semen. Anim Reprod Sci. 1994; 35(3): 305-312.

21. Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. Theriogenology. 2002; 57(7):1801-1808.

22. Macleod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility marriage. Fertil steril. 1951; 2(5): 394-414.

23. Bongso TA, Ng SC, Mok H, Lim MN, Teo HL, Wong PC, Ratnam SS. effect of sperm motility on in vitro fertilization. Arch Androl. 1989; 22(3): 185-90.

24. Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. Theriogenology. 2003; 60(4): 743-758.

34. Dorostkar K, Alavi-Shoushtari SM and Khaki A. Effects of in vitro zinc sulphate additive to the semen extender on water buffalo (Bubalusbubalis) spermatozoa before and after freezing. Int J Fertil Steril. 2014; 8(3): 325-33.

35. Omu AE, Al-Azemi MK, Kehinde EO, Anim JT, Oriowo MA. Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. Med Prin and Prac. 2008; (17): 108-116.

36. Litim M, Bereksi RK. Changes in sperm charateistics of the three main breeds of sheep in Algeria after dietary supplementation, Asian Pac J Reprod. 2016; 5(3): 236-239.

37. Farrell PB, Foote RH, McArdle MM, Touem-Trend VL, Tardif AL. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). Androl. 1996; (17): 293-300.

38. Cocchia N, Pasolini MP, Mancini R, Petrazzuolo O, Cristofaro I, Rosapane I, Sica A, Tortora G, Lorizio R, Paraggio G, Mancini A. Effect of SOD (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. Theriogenology. 2011; 75: 1201-1210.

39. Roca J, Rodri´Guez, MJ, Gil, MA., Carvajal G, Garcia, EM, Cuello C, Vazquez, JM and Martinez EA (2005). Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. Journal of Andrology, 26(1): 15-24.

40. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet Med Inter. 2011; 115: 1-7.

41. Netter A, Nahoul K, Hartoma R. Effect of zinc administration on plasma testosterone, dihydrotestosterone, and sperm count. Sys Biol Reprod Med. 1981; 7(1): 69-73.

42. Saksena S, White MJ, Mertzlufft J, Lau I. Prevention of cadmium-induced sterility by zinc in the male rat. Contracep. 1983; 27(5): 521-30.

25. Ruiz Pesini, E, Alvarez, E, Enriquez, JA, López Pérez, MJ. Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. IntJ Androl. 2001; 24(6): 335-340.

26. Lewis SE, Sterling IS, Young, W Thompson. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fert and Ster. 1997; 67(1): 142-147.

27. Stoltenberg M, Sorensen MB, Danscher G, Juhl S, Andreasen A, Ernest E. Autometallographic demonstration of zinc ions in the rat sperm cells. Mol Hum Reprod. 1997; 3(9): 763-767.

28. Andrews JC, Nolan JP, Hammerstedt RH, Bavister BD. Role of zinc during hamster sperm capacitation. Biol Reprod. 1994; 51(6): 1238-1247.

29. Cupic Z, Sinovec Z, Veselinovic S, Ivkov O, Veselinovic S, Medic D. The effect of dietary zinc, on semen quality in holstein-friesian bulls. Proceedings of the 4th International symposium on animal reproduction, Ohrid, Macedonia. 1998; 96.

30. Kendall NR, McMullen S, Green A, Rodway RG. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace elements status and semen quality of ram lambs. Anim Reprod Sci. 2000; 62(4): 277–83.

31. Carpino A, Siciliano L, Petrone M, Stefano C, Aquila S, Ando S. Low seminal Zinc bound to high molecular weight proteins in asthenozoospermic patients: evidence of increased sperm Zn content in oligoasthenozoospermic patients. Hum Reprod. 1998; 13(2): 111-114.

32. Colagar AH, Marzony ET, Chaichi MJ. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. Nutr Res. 2009; 20(2): 82-88.

33. Sorensen MB, Bergdahl IA, Hjollund NH, Bonde JP, Stoltenberg M, Ernst E. Zinc, magnesium and calcium in human seminal plasma fluid: relation to other semen parameters and fertility. Mol Hum Reprod. 1993; 5(4): 331-337.

43. Medeiros CM, Forell F, Oliveira, AT, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better Theriogenology. 2002; 57(1): 327-344.

44. Bettger W, O'Dell BA. Critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. Life Sci. 1981; 28(13): 1425–1438.

45. Chia SE, Ong CN, Chua LH, Ho LM, Tay K. Comparison of Zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. J Androl. 2000; 21: 53-57.

46. Shiva Saksena S, White MJ, Mertzlufft J, Lau I. Prevention of cadmium-induced sterility by zinc in the male rat. Contracep. 1993; 27: 521-30.

47. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim Reprod Sci. 2000; 62(1-3): 3-22.

48. Parks JE, Gaham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology. 1992; 38(2): 209-222.

49. Yue HX, Li P, Jiang M, Lin L, Xu KH. Influence of cryopreservation with glycerol and freezing-thawing procdures on the motility of human sperm. Zhonghua Nan Ke Xue. 2005; 11: 204-206.

50. Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Anim Reprod Sci. 2000; 62(1-3): 113-141.

51. Agarwal A, Nandipati KC, Sharma RK, Zippe CD, Raina R. Role of oxidative stress in the pathophysiological mechany ism of erectile dysfunction. J Androl. 2006; 27(3): 335-47.

52. Caldamone AA, Freytag MK and Cockett AT. Seminal zinc and male infertility. Urol. 1979; 13(3): 280-1.

53. Marmar JL, Katz S, Praiss DE, De Benedictis TJ. Semen zinc levels in infertile and post vasectomy patients and patients with prostatitis. Fertil steril.1975; 26(11): 1057.

54. Irani, M, Amirian, M, Sadeghi R, Lez JL, Latifnejad R. The Effect of Folate and Folate Plus Zinc Supplementation on Endocrine Parameters and Sperm Characteristics in Sub-Fertile Men: A Systematic Review and Meta-Analysis.Urol J. 2017; 14(5): 4069-4078.

55. Kimball SR, Chen S, Risica R, Jefferson LS, Leure-du, Pree AE. Effects of zinc deficiency on protein synthesis and expression of specific mRNA in rat liver. Metabolism. 1995; 44: 126-33.

56. Kumar N, Verma RP, Singha LP, Varshney VP, Dass RS. Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (Bosindicus×Bostaurus) bulls. Reprod Nutr Develop. 2006; 46(6): 663-675.

57. Underwood EJ, Somers M. Studies of zinc nutrition in sheep. The relation of zinc to growth, testicular development and spermatogenesis in young rams. Aust Agric Res. 1969; 20: 889-897.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Winter 2018; 8(4)

Effect of different levels of zinc sulfate of semen extender in Farahani ram breed sperm quality after freezing- thawing

Pouya M, M.Sc, Khodaei-Motlagh M, Ph.D.*, Khalt-Abadi Frahani AH, Ph.D., Mirzaei M

- Department of animal science Faculty of Agriculture and Natural Science Arak University

* Email corresponding author: m-motlagh@araku.ac.ir

Received: 29 Nov. 2017 Accepted: 25 Feb. 2018

Abstract

Aim: The purpose of this study was to investigate the effect of adding different levels of zinc (Zn) to semen extender on the sperm parameters after freezing and thawing in rams.

Material and methods: The spermatozoa of five Farahani rams breed (with a mean age of 3 ± 0.5 years and weight of 60 ± 5 kg) were taken twice a week. The semen was collected from the rams by artificial vagina and then the samples were mixed to removing the individualistic effects. The sperm samples (in five replicates) were randomly divided into four groups (zero, 50, 100 and 150 μM of zinc sulfate). Each falcon had the desired diluent that was mixed with Zn and tris and prepared for freezing steps. Samples were stored in semi-milliliter straw and kept with samples under the same conditions and temperatures of 37 °C. Moreover, in these conditions were filled and frozen. Sperm samples were evaluated after thawing for motility, progressive motility, survival (eosin-neogrosin test), sperm membrane integrity (HOST) and sperm morphology (Hancock test).

Results: Results showed no significant difference in the motility percentage and sperm membrane integrity in zinc sulfate environments compared with the control group. The treatment with 50 μm of zinc sulfate showed a higher level of significant ($P<0.05$) in the percentage of progressive motility compared with the control group. In sperm viability test, the treatment with 100 μm of zinc sulfate was significantly different from those of 50 and 150 μm zinc sulfate treatment ($P<0.05$).

Conclusion: application of zinc sulfate in ram semen extender might be improving some of sperm parameters after the freezing-thawing.

Keywords: Zinc, Ram, Sperm, Extender