Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

Dietary co-supplementation of rams with zinc, manganese and copper on freezing ability of semen

Sona Zargari[1], Armin Towhidi[2*], Kamran Rezayazdi[2]

[1] PhD candidate, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran,
[2] Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran,
Email: atowhidi@ut.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 07/29/2023
Revised: 09/12/2023
Accepted: 09/13/2023

Keywords:
Cryopreservation
Ram
Semen
Trace mineral

Abstract

Background and Objectives: Dietary supplementation of trace minerals (zinc, copper and manganese) has positive effects on various aspects of reproductive performance of farm animals and it has a strong antioxidant effect on sperm function. Also, feeding with trace minerals affects the functional structure of sperm cells and increases the quality of sperm for cryopreservation because it may lead to cell damage, production of reactive oxygen species and reducing the antioxidant capacity of seminal plasma. The objective of this study was to investigate whether dietary supplementation of zinc, copper and manganese affected on sperm motion characteristics, percentage of viability, sperm membrane integrity after thawing, and flow cytometry tests including apoptosis, hydrogen peroxide and molecular oxygen.

Materials and Methods: Ten mature Afshari rams were all fed a nutritionally adequate diet for 70 days, from the end of September to the beginning of December. Half of the rams were randomly designated to receive dietary supplementation with a sulfate source of zinc, copper and manganese once daily for 70 days, starting 1 week after the study began. All ejaculates were diluted with a Tris-based cryoprotective extender. The extended semen was subsequently loaded into 0. 5 mL plastic straws and then they were frozen by the bio-freezer machine. One week after freezing, three straws of each ram were thawed and evaluated for sperm motion characteristics by computer-assisted-semen-analysis system, hypoosmotic swelling test and live sperm percentage. In addition, we examined hydrogen peroxide, molecular oxygen and apoptosis in frozen sperm. Proc Mixed was used for analysis of repeated measures data.

Results: Motion characteristics, percentage of sperm viability and sperm membrane integrity after thawing in the Supplemented group was relatively stable and significantly higher than in the Control group from day 28 onwards (P<0/05). At the end of this research, the levels of hydrogen peroxide, molecular oxygen, early apoptosis, late apoptosis and necrosis in the control group were significantly higher than the Supplemented group (P<0/05). The average number of live sperm in the Supplement group increased slightly at the end of the research period outside the breeding season, but it was not significant compared to the beginning of the period, but this rate at the end of the

period was significantly higher than that of the Control group (P<0.05).

Conclusion: The results showed that the simultaneous supplementation of zinc, copper and manganese elements, even after the reproductive season, can have beneficial effects on the quality and freezing ability of sperm after thawing and prevent the creation of reactive oxygen species and the occurrence of apoptosis.

Cite this article: Zargari, S., Towhidi, A., Rezayazdi, K. (2023). Dietary co-supplementation of rams with zinc, manganese and copper on freezing ability of semen. *Journal of Ruminant Research*, 12(1), 35-50.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/ejrr.2023.21500.1905
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش در نشخوارکنندگان
شاپا چاپی: ۴۲۶۱-۲۳۴۵
شاپا الکترونیکی: ۴۲۵۳-۲۳۴۵

تأثیر مکمل‌سازی هم‌زمان عناصر روی، مس و منگنز بر انجمادپذیری منی قوچ

صونا زرگری[۱]، آرمین توحیدی[۲*]، کامران رضایزدی[۲]

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی گروه علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
[۲] استاد گروه علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، رایانامه: atowhidi@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۷
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۶/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۲۲

واژه‌های کلیدی:
انجماد
عناصر معدنی
قوچ
منی

چکیده

سابقه و هدف: مکمل کردن برخی از مواد معدنی کم‌نیاز (روی، مس و منگنز) نقش محوری بر جنبه‌های مختلف عملکرد تولیدمثلی حیوانات مزرعه دارد و دارای اثرات آنتی‌اکسیدانتی قوی بر کارکرد اسپرم می‌باشد. همچنین، تغذیه با مواد معدنی بر عملکرد اسپرم تأثیر می‌گذارد و باعث افزایش کیفیت اسپرم برای انجماد می‌شود؛ زیرا انجماد ممکن است منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن و درنتیجه آسیب به سلول اسپرم و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی پلاسمای منی شود. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر مکمل‌سازی هم‌زمان مواد معدنی کم‌نیاز روی، مس و منگنز بر ویژگی‌های جنبایی، درصد زنده‌مانی، درصد یکپارچگی غشای اسپرم بعد از ذوب و تولید گونه‌های فعال اکسیژن و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول بود.

مواد و روش‌ها: ۱۰ رأس قوچ نژاد افشاری به‌طور تصادفی در دو گروه آزمایشی که هر گروه شامل پنج تکرار بود قرار گرفتند. در گروه تیمار قوچ‌ها مکمل خوراکی با منبع سولفات روی، مس و منگنز را یک‌بار در روز به مدت ۷۰ روز از اواخر شهریور تا اوایل آذرماه تغذیه کردند. اسپرم قوچ‌ها به‌طور جداگانه با رقیق‌کننده انجماد بر پایه تریس- زرده تخم‌مرغ رقیق شد و در پایوت‌های نیم میلی‌لیتری به‌طور جداگانه با ایجاد خلأ کشیده شد و سپس توسط دستگاه بایو فریزر منجمد شدند. یک هفته بعد از انجماد، پایوت‌ها ذوب شدند و ویژگی‌های جنبایی اسپرم توسط سیستم آنالیزگر اسپرم، آزمون تورم هایپواسموتیک برای ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم و درصد اسپرم زنده ارزیابی شد. همچنین، گونه‌های فعال اکسیژن شامل پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول نیز در اسپرم منجمد موردبررسی قرار گرفت. داده‌ها به روش داده‌های تکرارپذیر و رویه MIXED تجزیه‌وتحلیل شدند.

یافته‌ها: میانگین تغییرات ویژگی‌های جنبایی اسپرم، درصد یکپارچگی غشای اسپرم و درصد اسپرم زنده بعد از ذوب در گروه تیمار تقریباً در طول دوره ثابت بود و از روز ۲۸ آزمایش با خارج شدن از فصل تولیدمثل افت پیدا نکرد و از روز ۲۸ تا روز ۷۰ به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود ($P<۰/۰۵$). در پایان این پژوهش مقادیر پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه و نکروز در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده مکمل بود ($P<۰/۰۵$). میانگین شمار اسپرم زنده در گروه مکمل در انتهای دوره

پژوهش در خارج از فصل تولیدمثل به مقدار کمی افزایش پیدا کرد، ولی نسبت به ابتـدای دوره معنی‌دار نبود اما این میانگین در انتهـای دوره بـه‌طـور معنـی‌داری بیشـتر از گـروه شـاهد بـود (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که مکمل‌سازی هم‌زمان عناصر روی، مس و منگنز حتی با خـارج شدن از فصل تولیدمثل می‌تواند بر انجمادپذیری اسپرم بعد از ذوب تأثیرات مفیـدی بگـذارد و مانع افزایش مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول و ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن شود.

استناد: زرگری، ص.، توحیدی، آ.، رضایزدی، ک. (۱۴۰۳). تأثیر مکمل‌سازی هـم‌زمـان عناصـر روی، مـس و منگنـز بـر انجمادپـذیری منـی قـوچ. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۲(۱)، ۵۰-۳۵.

DOI: 10.22069/ejrr.2023.21500.1905

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

انجماد منی روشی برای حفظ ژن‌های برتر برای مدت طولانی و تسریع درروند بهبود ژنتیکی اصلاح نژاد دام است (Du Plessis و همکاران، ۲۰۰۸). در طول انجماد، منی در معرض شوک سرمایی و اکسیژن هوا قرار می‌گیرد که به‌نوبه خود حساسیت به پراکسیداسیون لیپیدها[1] را به علت تولید بیشتر گونه-های فعال اکسیژن[2] (راس)، افزایش می‌دهد (Alizadeh و همکاران، ۲۰۲۰). همچنین، رقیق‌سازی پلاسمای منی موجب کاهش غلظت آنتی‌اکسیدانت‌های موجود در آن می‌شود. هنگامی‌که اسپرم در طی روش‌های یاری‌دهنده تولیدمثل دست‌کاری می‌شود، خطر تولید و در معرض گونه-های فعال اکسیژن قرار گرفتن برای سلول‌های اسپرم وجود دارد (Du Plessis و همکاران، ۲۰۰۸). سازوکار آسیب انجماد ممکن است منجر به تنش اسمزی، شوک سرمایی، تشکیل بلور یخ داخل سلول، تولید بیش‌ازحد گونه‌های فعال اکسیژن، تغییر در سامانه‌های دفاع آنتی‌اکسیدانتی و ترکیبی از این شرایط شود (Bilodeau و همکاران، ۲۰۰۰). استفاده از مواد افزودنی مانند اسیدهای آمینه، پروتئین‌های پلاسمای منی و آنتی‌اکسیدانت‌ها به منی تازه یا منجمد یک روش معمول است که به افزایش جنبایی اسپرم و کنترل ترشح آنزیم‌ها کمک می‌کند و از آسیب اسپرم به علت رقیق شدن و انجماد جلوگیری می‌کند (Sangeeta و همکاران، ۲۰۱۵). در سال‌های اخیر نشان داده‌شده است که تغذیه با مواد معدنی در حیوانات مزرعه‌ای سبب افزایش قابلیت انجمادپذیری و توانایی اسپرم برای لقاح می‌شود (Dance و همکاران، ۲۰۱۶). مکمل‌های معدنی به حفظ درصد بیشتری از اسپرم با غشای سالم و افزایش خواص آنتی‌اکسیدانتی در آن‌ها کمک می‌کند (Kendall و همکاران، ۲۰۰۰). نشان داده‌شده است که تغذیه با مواد معدنی بر عملکرد سلول‌های اسپرم تأثیر می-گذارد (Kumar و همکاران، ۲۰۰۶). ریزمغذی‌ها در تولیدمثل حیوانات اهلی حیاتی هستند. به‌عنوان مثال، روی در عملکرد اسپرم مهم است زیرا کاهش غلظت روی پلاسمای منی، کیفیت اسپرم را کاهش می‌دهد و بر لقاح تأثیر منفی می‌گذارد. در گاو نر، مکمل روی باعث افزایش حجم مایع منی، غلظت اسپرم، درصد اسپرم زنده و جنبایی اسپرم می‌شود (Rowe و همکاران، ۲۰۱۴). اثرات آنتی‌اکسیدانتی و محافظتی منگنز در برابر پراکسیداسیون لیپیدی در سامانه‌های زیستی مختلف تأییدشده است (Chen و همکاران، ۲۰۰۶).

مس نیز برای بسیاری از فرآیندهای زیستی موردنیاز است. مس عنصری است که می‌تواند بر تولید، بلوغ و باروری اسپرم تأثیر بگذارد (Wong و همکاران، ۲۰۰۱). مکمل‌سازی جیره خوراکی گاو نر با روی، مس و منگنز باعث بهبود ظرفیت میتوکندری اسپرم، درصد اسپرم زنده و یکپارچگی غشای کروموزوم می‌شود (Geary و همکاران، ۲۰۲۱). با توجه به دانش ما، اثرات مکمل‌سازی هم‌زمان روی، مس و منگنز بر انجمادپذیری منی قوچ گزارش نشده است. هدف از این مطالعه ارزیابی تأثیر مکمل‌سازی این سه ماده معدنی کم‌نیاز به‌طور هم‌زمان بر ویژگی‌های جنبایی اسپرم، درصد اسپرم زنده، درصد یکپارچگی غشای اسپرم بعد از ذوب و آزمایش‌های فلوسایتومتری شامل مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول[3]، پراکسید هیدروژن[4] و اکسیژن مولکولی[5] بود.

مواد و روش‌ها

1. Lipid Peroxidation
2. Reactive Oxygen Species (ROS)
3. Apoptosis
4. H_2O_2
5. O_2

طرح آزمایش: این آزمایش از اواخر شهریور تا اوایل آذرماه ۱۴۰۰ انجام شد. ۱۰ رأس قوچ بارور نژاد افشاری واقع در دامداری کشت و صنعت فردوس زنجان با میانگین سنی ۲/۵ سال و میانگین وزنی ۱۰۰ کیلوگرم، به‌طور تصادفی به دو گروه ۵ تایی شامل گروه شاهد و مکمل (محتوی منبع سولفات عناصر سه‌گانه) تقسیم شدند. قوچ‌ها بعد از قرار گرفتن در جایگاه انفرادی به مدت ۷۰ روز همراه با جیره پایه، مکمل اختصاصی تنظیم‌شده مطابق با جداول استاندارد احتیاجات غذایی انجمن تحقیقات ملی[1] (۲۰۰۷)، تهیه‌شده در شرکت زیست فن‌آور آریانا، به‌صورت سرک یک‌بار در روز (صبح‌ها) همراه با مقدار کمی خوراک (برای اطمینان از مصرف کامل مکمل‌ها) تغذیه شدند (جدول ۱). در مجموع، قوچ‌ها سه بار در روز (در حد اشتها) با دسترسی آزاد به آب تغذیه شدند. بعد از نمونه‌گیری اول (روز ۰) تغذیه قوچ‌های گروه مکمل با مکمل معدنی اختصاصی سولفات شامل روی، مس و منگنز آغاز شد (جدول ۱). قابل‌ذکر است، تمامی اجزای جیره پایه و مواد مغذی مورداستفاده برای قوچ‌های گروه شاهد همانند گروه مکمل بود و فقط عناصر روی، مس و منگنز برای گروه شاهد حذف شدند.

جمع‌آوری و انجماد اسپرم: قوچ‌ها به‌مدت دو هفته برای استحصال اسپرم توسط مهبل مصنوعی (IMV, France) عادت‌دهی شدند. اسپرم تمامی قوچ‌ها بعد از استحصال زیر میکروسکوپ ارزیابی اولیه شد و اسپرم‌هایی که جنبایی بالای ۸۰ درصد داشتند به‌طور جداگانه با رقیق‌کننده انجماد بر پایه تریس-زرده تخم‌مرغ رقیق شد (اسمولاریتی: ۳۲۰ (mOsm/L) و pH: ۷/۲) (Zargari و همکاران، ۲۰۱۶) و در پایوت‌های نیم میلی‌لیتری که به‌طور جداگانه پلاک گوش قوچ‌ها روی آن‌ها برای تفکیک ثبت‌شده بود با ایجاد خلأ کشیده شد و سپس پایوت‌های حاوی اسپرم در داخل دستگاه بایو فریزر (Aragene, Iran) قرار داده شدند و طبق دستورالعمل، برنامه انجماد اسپرم اجرا شد. به‌طوری‌که ابتدا دما به ۵ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت و به مدت یک ساعت در این دما باقی ماند و سپس دما به منفی ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد کاهش پیدا کرد و درنهایت پایوت‌ها در تانک‌های ازت ذخیره شدند (طول مدت انجماد سه ساعت).

ارزیابی اسپرم: یک هفته بعد از انجماد، پایوت‌ها برای ارزیابی جنبایی، درصد اسپرم زنده و یکپارچگی غشای اسپرم ذوب شدند. ارزیابی منی بعد از انجماد هر ۱۴ روز یک‌بار (مجموع ۶ انزال برای هر رأس قوچ) روی تمامی قوچ‌ها به‌طور جداگانه صورت گرفت. جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده، سرعت واقعی اسپرم‌ها در مسیر طی شده[2]، سرعت مستقیم‌الخط اسپرم‌ها[3]، سرعت در مسیر منحنی میانگین[4]، خطی بودن[5] و حداکثر دامنه جنبایی جانبی[6] جانبی[6] توسط سیستم ارزیابی اسپرم (Sperm Class Analyzer (SCA),Version 5.1; Microptic, Barcelona, Spain)، ارزیابی و ثبت گردید. درصد اسپرم‌های زنده با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین و ارزیابی ۲۰۰ اسپرم در هر نمونه با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰× مورد ارزیابی قرار گرفت (Evans و Maxwell، ۱۹۸۷). یکپارچگی غشای اسپرم با استفاده از آزمون تورم هایپواسموتیک[7] اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۵۰۰ میلی‌لیتر از محلول هایپواسموتیک ۱۰۰ mOsm با ۵ میکرولیتر مایع منی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

1. National Research Council (NRC)

1. Track velocity (VCL)
2. Progressive velocity (VSL)
3. Path velocity (VAP)
4. Linearity (LIN)
5. Lateral amplitude (ALH)
6. Hypo osmotic swelling test (HOST)

به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. یک قطره از نمونه انکوبه شده روی یک لام از قبل گرم شده قرار داده شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰× ارزیابی شد. پنج میدان میکروسکوپی (مجموعاً ۲۰۰ اسپرم) برای تعیین درصد اسپرم سالم موردبررسی قرار گرفتند (Jeyendran، ۱۹۹۲).

جدول ۱- اجزای خوراکی و مواد مغذی جیره پایه برای همه قوچ‌ها

Table 1- Ingredients and nutrient composition of the basal diet fed to all rams

درصد در ماده خشک (Percent in dry matter)	اجزای خوراکی (Ingredient)
47.6	علف خشک یونجه (Alfalfa hay)
18.4	کاه گندم (Wheat straw)
10.71	دانه جو (آسیاب شده)((Barley grain (finely ground))
10.5	ذرت (آسیاب شده) ((Corn (finely ground))
3.0	کنجاله سویا (Soybean meal)
8.0	سبوس گندم (Wheat bran)
1.8	مکمل ویتامینه و معدنی[a] (Vitamin and mineral premix)
مقادیر (Amount)	محتوای مواد مغذی(Nutrient composition)
2.45	ماده خشک مصرفی (کیلوگرم/ روز) Dry matter intake (kg/day)
12.00	پروتئین خام (درصد) Crude protein (%)
2.97	انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری/ کیلوگرم) Metabolizable energy (Mcal/kg)
49.30	الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد) Neutral detergent fiber (%)
18.00	کلسیم (گرم/ روز) Calcium (g/day)
9.00	فسفر (گرم/ روز) Phosphorus (g/day)
19.50	روی (قسمت در میلیون) Zinc (ppm)
48.90	منگنز (قسمت در میلیون) Manganese (ppm)
5.00	مس (قسمت در میلیون) Copper (ppm)

[a] محتوا/ کیلوگرم: ویتامین آ: ۱۱۰۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین دی ۳: ۱۱۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین ای: ۷۵۰ میلی‌گرم، مس: ۵۰۰ میلی‌گرم، روی: ۱۶۵۰ میلی‌گرم، منگنز: ۱۰۰۰ میلی‌گرم، آهن: ۲۰۰۰ میلی‌گرم، سلنیوم: ۱۵ میلی‌گرم، کبالت: ۵ میلی‌گرم، ید: ۲۵ میلی‌گرم.

هر گروه روزانه ۴۹ گرم مکمل (در مکمل ویتامینه-معدنی استفاده شده در گروه شاهد عناصر روی، مس و منگنز حذف شده بود) دریافت می‌کرد که عناصر معدنی و ویتامین‌ها مطابق با جداول انجمن تحقیقات ملی (۲۰۰۷) استاندارد شده بود.

[a] Content/kg: vit. A, 110000 IU; vit. D3, 11000 IU; vit E, 750 mg; Cu, 500 mg; Zn, 1650 mg; Mn, 1000 mg; Fe, 2000 mg; Se, 15 mg; Co, 5 mg; I, 25 mg.

Each group received daily 49 grams of supplements (In the vitamin and mineral premix used in the control group, zinc, copper and manganese elements were removed), which were balanced with mineral elements and vitamins according to the NRC (2007) tables.

Dietary supplements: control group: supplement without Cu, Zn, and Mn; supplemented group: supplement with Cu, Zn, and Mn sulfate.

آزمایش مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول و گونه‌های فعال اکسیژن به روش فلوسایتومتری در ابتدا (روز ۰) و انتهای (روز ۷۰) پژوهش انجام شد. ارزیابی مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول در اسپرم با استفاده از کیت Annexin V (Roche) و توسط دستگاه فلوسایتومتر(Partec PAS, Germany) انجام شد (Oosterhuis و همکاران، ۲۰۰۰). برای ارزیابی غلظت گونه‌های فعال اکسیژن (پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی) در اسپرم منجمد از ماده‌ی DCFDA یا DCHF برای شناسایی این گونه‌های واکنش‌گر استفاده شد (Shehat و همکاران، ۲۰۱۹). این ماده به سلول‌های اسپرم نفوذ کرده و سپس توسط آنزیم‌های استراز داخل سلولی دی استریفاید[1] می‌شود و درون سلول به دام می‌افتد و پس از احیا شدن توسط گونه-های فعال اکسیژن از خود خاصیت فلورسانس نشان می‌دهد که توسط دستگاه فلوسایتومتری بررسی شد.

واکاوی آماری: داده‌ها با استفاده از رویه آماری Univariate نرم‌افزار SAS (۲۰۰۲) نسخه ۹/۱ و بر اساس نتایج آزمون کولموگروف اسمیرنوف و ارزیابی نمودار پراکندگی، کشیدگی و چولگی توزیع نرمال باقی‌مانده‌ها بررسی شد و در صورت نیاز داده‌های غیر نرمال تصحیح شدند. داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی به روش داده‌های تکرارپذیر و رویه MIXED تجزیه‌وتحلیل شدند. مدل آزمایشی و اجزای آن به-صورت زیر می‌باشد:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + S_j(T_i) + P_k + (T*P)_{ik} + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl}: متغیر وابسته، μ: میانگین کل، T_i: اثر تیمار اشکال مختلف مکمل)، $S_j(T_i)$: اثر حیوان (فرد)، P_k: اثر زمان، $(T*P)_{ik}$: اثر تیمار در زمان، e_{ijkl}: خطای باقیمانده.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

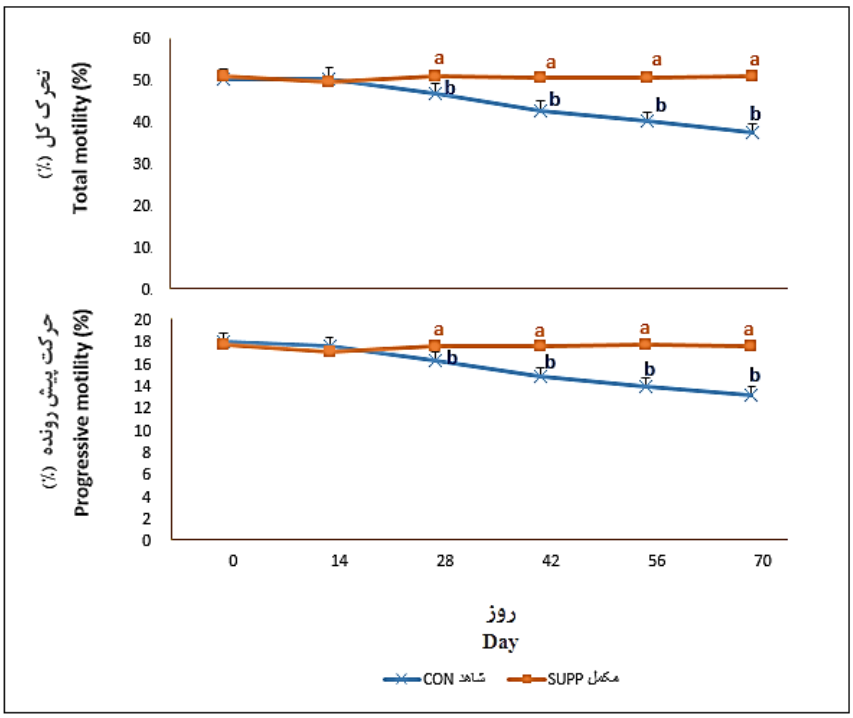
Y_{ij}: متغیر وابسته، μ: میانگین کل، T_i: اثر تیمار، e_{ij}: خطای باقیمانده. قابل‌ذکر است برای از بین بردن اثر نمونه‌گیری اول از تجزیه کوواریانس استفاده شد.

نتایج و بحث

میانگین تغییرات ویژگی‌های جنبایی اسپرم بعد از ذوب شامل درصد جنبایی کل، درصد جنبایی پیش‌رونده، سرعت واقعی اسپرم‌ها در مسیر طی شده (میکرومتر بر ثانیه)، سرعت مستقیم‌الخط اسپرم‌ها (میکرومتر بر ثانیه)، سرعت در مسیر منحنی میانگین (میکرومتر بر ثانیه)، درصد خطی بودن و حداکثر دامنه جنبایی جانبی (میکرومتر) در گروه مکمل تقریباً در طول دوره ثابت بود و از روز ۲۸ آزمایش با خارج شدن از فصل تولیدمثل نسبت به ابتدای آزمایش و گروه شاهد افت پیدا نکرد و از روز ۲۸ تا روز ۷۰ به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود. درحالی‌که میانگین تغییرات ویژگی‌های جنبایی اسپرم در گروه شاهد از روز ۲۸ تحت تأثیر تغییرات فصلی قرار گرفت و نسبت به گروه مکمل و روزهای گذشته شروع به کاهش کرد و از روز ۲۸ تا روز ۷۰ به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه مکمل بود و در روز ۷۰ به کمترین مقدار خود رسید ($P<۰/۰۵$) (شکل ۱ و ۲). درصد زنده‌مانی اسپرم و یکپارچگی غشای اسپرم نیز در گروه شاهد از روز ۲۸ (پایان فصل تولیدمثل) شروع به کاهش کرد و در پایان مطالعه به کمترین مقدار خود رسید ($P<۰/۰۵$). همچنین، درصد اسپرم زنده و یکپارچگی غشای اسپرم در گروه مکمل از روز ۲۸ تا روز ۷۰ به‌طور معنی‌داری بالاتر بود و حتی با خارج شدن از فصل تولیدمثل ثابت ماند ($P<۰/۰۵$) (شکل ۳). اگرچه انجماد و ذوب اسپرم مزایای زیادی برای تولیدمثل دارد، اما به‌طور گسترده‌ای گزارش‌شده است که فرآیند انجماد شامل خنک‌سازی، انجماد و

1. De-esterified

ذوب باعث تغییرات مخرب جدی در عملکرد اسپرم می‌شود (Colás و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین، به‌خوبی شناخته‌شده است که روند انجماد و ذوب شدن اسپرم نه تنها منجربه تغییرات نامطلوب در ترکیب لیپیدهای غشایی، وضعیت آکروزوم و جنبایی اسپرم می شود، بلکه باعث افزایش آسیب DNA اسپرم نیز می‌شود (Said و همکاران، ۲۰۱۰).



شکل ۱- میانگین (±SEM) تغییرات جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده بعد از ذوب در طول دوره در قوچ‌های گروه مکمل و شاهد.
[a,b] حروف متفاوت در نقاط پایانی نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد.

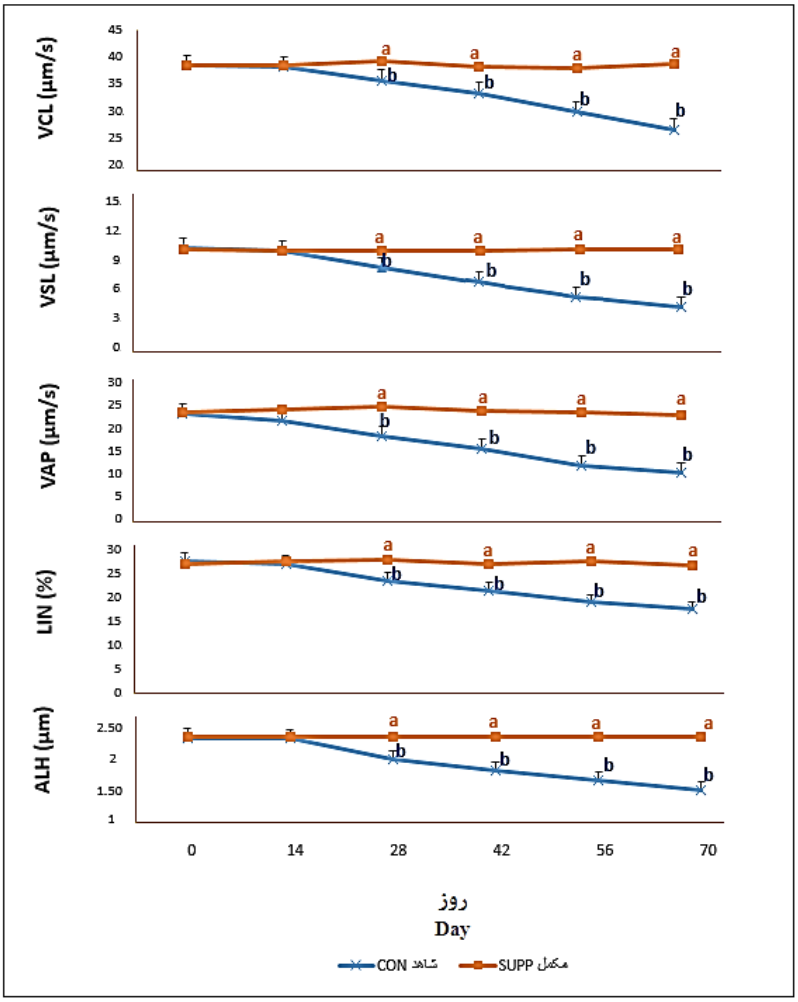
Figure 1- Mean (±SEM) total and progressive motility end points after thawing during the study for Control (Con) and Supplemented (Supp) rams.
[a,b]Within an end point and a day, means without a common superscript differ (P< 0/05).

در حقیقت، تقریباً ۵۰٪ از اسپرم‌های موجود در انزال پس از فرآیند انجماد و ذوب زنده می‌مانند (Bailey و همکاران، ۲۰۰۸). افزودن مواد معدنی و اسیدهای آمینه به رقیق‌کننده منی در طی انجماد، زنده‌مانی، جنبایی و مورفولوژی اسپرم را بعد از ذوب بهبود می‌بخشد (Sangeeta و همکاران، ۲۰۱۵).

مواد معدنی آلی به‌طور مؤثرتری در بدن برای عملکرد تولیدی بهینه مورداستفاده قرار می‌گیرند و برای بهبود تولید مایع منی، جنبایی اسپرم و باروری جنس نر پیشنهادشده‌اند (Rowe و همکاران، ۲۰۱۴). از میان مواد معدنی کمیاب، عناصر مس و روی در جیره خوراکی حیوانات تأثیر بیشتری در تولیدمثل دام دارند (MacDonald، ۲۰۰۰). ویژگی‌های جنبایی اسپرم به‌طور قابل‌توجهی تحت تأثیر مکمل‌های معدنی قرار می‌گیرند (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸). نتایج این پژوهش با نتایج مطالعات قبلی در مورد گوسفند، بز و گاو در یک راستا بود (Tharwat، ۱۹۹۸؛ Kendall و همکاران، ۲۰۰۰؛ Kumar و همکاران، ۲۰۰۶). جنبایی اسپرم به انرژی موجود از آدنوزین تری فسفات[1] بستگی دارد و عنصر روی فرآیند استفاده از انرژی را از طریق سیستم آدنوزین تری

1. Adenosine triphosphate (ATP)

فسفات کنترل می‌کند و همچنین سوربیتول دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز را تنظیم می‌کند که نقش اصلی را در جنبایی اسپرم دارند (El-Masry و Nasr، ۲۰۱۰). یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم، سالم بودن و زنده ماندن ویژگی‌هایی هستند که مستقیماً پتانسیل باروری یا نتیجه باروری نمونه‌های منی را پیش‌بینی می‌کنند (Kasimanickam و همکاران، ۲۰۱۲). Arangasamy و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه خود بیان کردند مواد معدنی کمیاب روی و مس از اسپرم بز در برابر سرما محافظت می‌کنند. همچنین، بیان کردند تغذیه اضافی مس و روی آلی در بز نقش محافظتی داشت و منجر به زنده ماندن اسپرم، یکپارچگی غشای پلاسمایی و آکروزوم، تحرک و کاهش استرس اکسیداتیو شد. همچنین، مصرف مکمل منگنز منجر به بهبود قابل توجهی در جنبایی پس از ذوب و تورم هایپواسموتیک اسپرم منجمد گاو می‌شود (Magnus و همکاران، ۱۹۹۰).

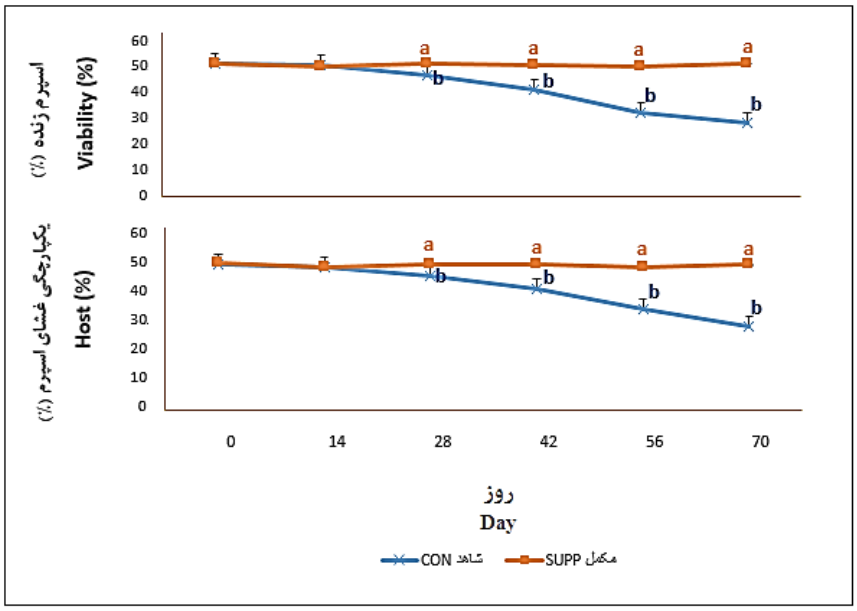


شکل ۲- میانگین (±SEM) سرعت واقعی اسپرم‌ها در مسیر طی شده (VCL)، سرعت مستقیم‌الخط اسپرم‌ها (VSL)، سرعت در مسیر منحنی میانگین (VAP)، خطی بودن (LIN) و حداکثر دامنه جنبایی جانبی (ALH) بعد از ذوب در طول دوره در قوچ‌های گروه مکمل و شاهد.
[a,b] حروف متفاوت در نقاط پایانی نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد.

Figure 2- Mean (±SEM) track velocity (VCL), progressive velocity (VSL), path velocity (VAP), linearity (LIN), and lateral amplitude (ALH) end points after thawing during the study for Control (Con) and Supplemented (Supp) rams.
[a,b]Within an end point and a day, means without a common superscript differ (P<0/05).

غلظت بالای روی در پلاسمای منی با افزایش جنبایی اسپرم (Fuse و همکاران، ۱۹۹۹) مرتبط است، درحالی‌که کاهش غلظت روی باعث از دست دادن یکپارچگی غشای اسپرم می‌شود (Marzec و همکاران، ۲۰۱۲). افزایش زنده ماندن اسپرم ممکن است به دلیل تثبیت غشاء توسط روی باشد که از نشت آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و سایر اجزای مهم اسپرم جلوگیری می‌کند و عمر عملکردی اسپرم را افزایش می‌دهد (Miloud و Karima، ۲۰۱۵). روی به‌عنوان جزئی از متالوآنزیم‌های متعدد، در واکنش‌های آنزیمی مرتبط با متابولیسم کربوهیدرات، پروتئین، لیپید و اسید نوکلئیک نیز نقش دارد و ممکن است زنده‌مانی اسپرم را بهبود بخشد (McCall و همکاران، ۲۰۰۰).

روی، مس و منگنز همگی بر باروری تأثیر می‌گذارند (Wilde، ۲۰۰۶). کیفیت مایع منی، جنبایی اسپرم و درصد اسپرم زنده با مکمل‌های روی و مس بهبود می‌یابد (Gooneratne و Christensen، ۱۹۹۷). در پایان این پژوهش تغییرات میانگین پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه مکمل بود (P<۰/۰۵) (جدول ۲). درحالی‌که در گروه مکمل در انتهای دوره (خارج از فصل تولیدمثل) به مقدار کمی کاهش پیدا کرد که نسبت به ابتدای دوره (اواخر فصل تولیدمثل) معنی‌دار نبود، ولی نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).



شکل ۳- میانگین (±SEM) تغییرات درصد اسپرم زنده و یکپارچگی غشای اسپرم بعد از ذوب در طول دوره در قوچ‌های گروه مکمل و شاهد.
[a,b] حروف متفاوت در نقاط پایانی نشان‌دهنده سطح معنی‌داری در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد.

Figure 3- Mean (±SEM) viability and Host end points after thawing during the study for Control (Con) and Supplemented (Supp) rams.
[a,b]Within an end point and a day, means without a common superscript differ (P<0/05).

تغییرات میانگین آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه و نکروز در روز ۷۰ در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه مکمل بود (P<۰/۰۵) (جدول ۳). درحالی‌که در گروه مکمل در انتهای دوره (خارج از فصل تولیدمثل) به مقدار کمی کاهش پیدا کرد که نسبت به ابتدای دوره (اواخر فصل تولیدمثل) معنی‌دار نبود، ولی نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). شمار اسپرم زنده در گروه مکمل در

انتهای دوره پژوهش در خارج از فصل تولیدمثل به مقدار کمی افزایش پیدا کرد، ولی نسبت به ابتدای دوره معنی‌دار نبود. ولی این مقدار در انتهای دوره به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵). میانگین شمار اسپرم زنده در گروه شاهد در خارج از فصل تولیدمثل نسبت به ابتدای دوره و گروه مکمل کاهش معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵).

جدول ۲- تغییرات میانگین (±SEM) پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی در اسپرم قوچ‌های گروه شاهد و مکمل بعد از انجماد

Table 2- LSM (±SEM) of apoptosis and Flow Cytometry in Control and Supplemented rams sperm after cryopreservation

	P-value			روز ۷۰ Day 70		روز ۰ Day 0	
	زمان× تیمار Treatment × time	زمان Time	تیمار Treatment	مکمل Supplemented	شاهد Control	مکمل Supplemented	شاهد Control
اکسیژن‌مولکولی (درصد) Molecular oxygen (%)	<0.05	<0.05	<0.05	94.44±0.98[b]	99.60±0.20[a]	96.76±0.89	96.60±0.61
پراکسیدهیدروژن (درصد) Hydrogen peroxide (%)	<0.05	<0.05	<0.05	66.80±1.34[b]	74.39±2.02[a]	68.18±1.17	68.02±1.94

[a,b] حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده سطح معنی‌داری در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد.

[a,b]Within each row, means without a common superscript differed (P<0.05).

جدول ۳- تغییرات میانگین (±SEM) مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول در اسپرم قوچ‌های گروه شاهد و مکمل بعد از انجماد

Table 3- LSM (±SEM) of apoptosis in Control and Supplemented rams sperm after cryopreservation

	P-value			روز ۷۰ Day 70		روز ۰ Day 0	
	زمان×تیمار Treatment × time	زمان Time	تیمار Treatment	مکمل Supplemented	شاهد Control	مکمل Supplemented	شاهد Control
آپوپتوز اولیه (درصد) Early apoptosis (%)	<0.05	<0.05	< 0.05	10.61±0.93[b]	12.22±0.50[a]	10.81±0.74	10.29±0.49
آپوپتوز ثانویه (درصد) Late apoptosis (%)	<0.05	<0.05	<0.05	18.15±0.46[b]	20.13±0.38[a]	17.72±0.50	18.25±0.40
نکروز (درصد) Necrosis (%)	<0.05	<0.05	<0.05	53.89±0.93[b]	57.24±1.05[a]	54.17±1.00	54.72±1.04
شمار اسپرم زنده (درصد) Live (%)	<0.05	<0.05	<0.05	17.45±0.46[a]	10.46±1.04[b]	17.30±0.46	16.74±1.01

[a,b] حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده سطح معنی‌داری در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد.

[a,b]Within each row, means without a common superscript differed (P<0/05).

اسپرم در طی انجماد و ذوب حساس به پراکسیداسیون لیپید است، که باعث ایجاد فشار مکانیکی قابل توجهی بر غشای سلول می شود (Tvrdá و همکاران، ۲۰۱۳). درواقع، شوک سرمایی با استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن ارتباط دارد. قرار گرفتن در معرض غلظت بالای گونه‌های فعال اکسیژن باعث اختلال در غشای میتوکندری، پلاسما، تکه‌تکه شدن کروموزوم و DNA می‌شود که منجر به کاهش جنبایی و زنده ماندن اسپرم خواهد شد (Gadea و همکاران، ۲۰۱۱). در شرایط عادی، برای خنثی‌سازی اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن، اسپرم و پلاسمای منی دارای تعدادی سیستم آنتی‌اکسیدانتی هستند که گونه‌های فعال اکسیژن را از بین می‌برند و از آسیب داخل سلولی جلوگیری می‌کنند (Gadea و همکاران، ۲۰۱۱). عدم تعادل بین حضور گونه‌های فعال اکسیژن و فعالیت آنتی اکسیدانتی اسپرم دلیل اصلی آسیب انجماد اسپرم است. ساختار سلولی خاص اسپرماتوزوئیدها، غشای پلاسمایی آن، تعداد زیاد میتوکندری، سیتوپلاسم کم و آنتی‌اکسیدانت کم در سیتوپلاسم اسپرم، آن‌ها را در برابر رادیکال‌های آزاد آسیب‌پذیر می‌کند (Bollwein و همکاران، ۲۰۰۸). خواص آنتی‌اکسیدانتی روی، غشاهای اسپرم را تثبیت می‌کند و بر سیالیت لیپید تأثیر می‌گذارد و در نتیجه از غشاهای اسپرم محافظت می‌کند (Sikka، ۲۰۰۱)؛ بنابراین، سیستم آنتی‌اکسیدانتی به آنتی‌اکسیدانت‌ها اجازه می‌دهد تا پیوندهای کووالانسی ایجادشده توسط گونه‌های فعال اکسیژن بین زنجیره‌های جانبی اسیدهای چرب لیپیدهای غشایی را بشکنند؛ بنابراین، می‌توان گفت که ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تأثیر بسزایی در حفظ یکپارچگی غشای اسپرم دارد (Towhidi و همکاران ۲۰۱۳). مکمل مس و روی با تثبیت غشاء از طریق توانایی آن‌ها در به تأخیر انداختن واکنش‌های رادیکال‌های آزاد، زنده‌مانی اسپرم را بهبود می‌بخشد (Cheah و Yang، ۲۰۱۱). با توجه به مطالعاتی که ویژگی‌های اسپرم را در داخل و خارج از فصل تولیدمثل ارزیابی کرده‌اند (Zargari و همکاران، ۲۰۱۶؛ Mahala و همکاران، ۲۰۲۲) بیان‌شده که خارج از فصل تولیدمثل ویژگی‌های تولیدمثلی و خصوصیات اسپرم تحت تأثیر قرار می‌گیرد و مطابق با گروه شاهد در این مطالعه کاهش می‌یابد. قابل‌ذکر است مطالعه حاضر هم‌زمان با پایان فصل تولیدمثل و شروع فصل غیر تولیدمثلی بود. اگرچه از ابتدا تا انتهای پژوهش هیچ تغییری در ویژگی‌های اسپرم و فلوسایتومتری در گروه مکمل مشاهده نشد، اما نکته قابل‌توجه این است که این ویژگی‌ها با خارج شدن از فصل تولیدمثل یعنی از روز ۲۸ تا روز۷۰ برخلاف گروه شاهد حفظ شد؛ بنابراین، می‌توان گفت مکمل معدنی حاوی روی، مس و منگنز ویژگی‌های کیفی اسپرم را خارج از فصل تولیدمثل حفظ و از افزایش مقادیر گونه‌های فعال اکسیژن و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول جلوگیری می‌کند.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی، نتایج این پژوهش نشان داد که مکمل-سازی هم‌زمان عناصر کم‌نیاز روی، مس و منگنز می-تواند بر انجمادپذیری اسپرم بعد از ذوب تأثیرات مفیدی بگذارد و مانع ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن و بروز مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول شود و همچنین، از افت کیفیت اسپرم بعد از انجماد در خارج از فصل تولیدمثل جلوگیری نماید.

سپاسگزاری

این مقاله جزئی از نتایج رساله دکتری دانشگاه تهران است که در قالب طرح نوع ششم به شماره ۷۱۰۸۰۱۷/۶/۴۹ موردحمایت واقع‌شده است. همچنین، این پژوهش موردحمایت مالی شرکت توسعه مکمل زیست فن‌آور آریانا در قالب طرح تحقیقاتی کاربردی به شماره ۸۱۵۲۶۹۶-۴۰۰ بوده است.

منابع

Alizadeh, K., Moslemipur, F., Bahri-Binabaj, F. & Mojtahedin, A. (2020). The effect of adding horsemint ethanol extract and cysteine into extender on fertility characteristic of frozen Baluchi ram semen after thawing. *Journal of Ruminant Research*, 8: 49-62. (In Persian).

Arangasamy, A., Krishnaiah, M.V., Manohar, N., Selvaraju, S., Rani, G.P., Soren, N.M., Reddy, I.J. & Ravindra, J.P. (2018). Cryoprotective role of organic Zn and Cu supplementation in goats (*Capra hircus*) diet. *Cryobiology*, 81: 117-124.

Bailey, J.L., Lessard, C., Jacques, J., Brèque, C., Dobrinski, I., Zeng, W. & Galantino-Homer, H.L. (2008). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*, 70: 1251-1259.

Bilodeau, J.F., Chatterjee, S., Sirard, M.A. & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Molecular Reproduction and Development: *Incorporating Gamete Research*, 55: 282-288.

Bollwein, H., Fuchs, I. & Koess, C. (2008). Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 43: 189-195.

. Cheah, Y. & Yang, W. (2011). Functions of essential nutrition for high quality spermatogenesis. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2: 182-197.

Chen, M.T., Cheng, G.W., Lin, C.C., Chen, B.H. & Huang, Y.L. (2006). Effects of acute manganese chloride exposure on lipid peroxidation and alteration of trace metals in rat brain. *Biological Trace Element Research*, 110: 163-177.

Colás, C., Junquera, C., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J.A. & Muiño-Blanco, T. (2009). Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microscopy Research and Technique*, 72: 566-572.

Dance, A., Thundathil, J., Blondin, P. & Kastelic, J. (2016). Enhanced early-life nutrition of Holstein bull's increases sperm production potential without decreasing postpubertal semen quality. *Theriogenology*, 86: e682.

Du Plessis, S. S., Makker, K., Desai, N. R. & Agarwal, A. (2008). Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Review of Obstetrics and Gynecology*, 3: 539-554.

El-Masry, K.A., Nasr, A.S. & Kamal, T.H. (1994). Influences of season and dietary supplementation with selenium and vitamin E or zinc on some blood constituents and semen quality of New Zealand White rabbit males. *World Rabbit Science*, 2: 79-86.

Evans, G. & Maxwell, W.C.1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. 2th Edition, Butterworths.

Fuse, H., Kazama, T., Ohta, S. & Fujiuchi, Y. (1999). Relationship between zinc concentrations in seminal plasma and various sperm parameters. *International Urology and Nephrology*, 31: 401-8.

Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M.A., Garcia-Vazquez, F.A. & Gardon, J.C. (2011). Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*, 62: 40-46.

Geary, T.W., Waterman, R.C., Van Emon, M.L., Ratzburg, C.R., Lake, S., Eik, B.A., Armstrong, D.R., Zezeski, A.L. & Heldt, J.S. (2021). Effect of supplemental trace minerals on standard and novel measures of bull fertility. *Theriogenology*, 172: 307-314.

Gooneratne, S.R. & Christensen, D.A. (1997). Effect of chelating agents on the excretion of copper, zinc and iron in the bile and urine of sheep. *The Veterinary Journal*, 153: 171-178.

Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H. & Zaneveld, L.J.D. (1992). The hypoosmotic swelling test: an update. *Archives of Andrology*, 29: 105-116.

Kasimanickam, V., Kasimanickam, R., Arangasamy, A., Saberivand, A., Stevenson, J.S. & Kastelic, J.P. (2012). Association between mRNA abundance of functional sperm function proteins and fertility of Holstein bulls. *Theriogenology*, 78: 2007-2019.

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

Kumar, N., Dorfman, A. & Hahm, J.I. (2006). Ultrasensitive DNA sequence detection using nanoscale ZnO sensor arrays. *Nanotechnology*, 17: 2875.

MacDonald, R.S. 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. *The Journal of Nutrition*, 130: 1500S-1508S.

Magnus, Ø., Brekke, I., Åbyholm, T. & Purvis, K. (1990). Effects of manganese and other divalent cations on progressive motility of human sperm. *Archives of Andrology*, 24: 159-166.

Mahala, S.K., Bhalothia, S.K., Kumar, T., Mehta, J.S. & Bajia, A.K. (2022). Impact of the breeding and non-breeding seasons on the semen quality parameters in Magra ram. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 11: 2377-2380.

Marzec-Wróblewska, U., Kamiński, P. & Łakota, P. (2012). Influence of chemical elements on mammalian spermatozoa. *Folia Biologica*, 58: 7-15.

McCall, K.A., Huang, C.C. & Fierke, C.A. (2000). Zinc and health: current status and future directions. *The Journal of Nutrition*, 22: 1437-1446.

Miloud, L. & Karima, B.R. 2015. Variations in semen characteristics rams of Ouled Djellal breed have received an important dietary supplement after regular and intensive collection. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4: 13-16.

National Research Council. (2007). Nutrient Requirements of Small Ruminants Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. 7th edition. National Academy Press,Washington, DC, USA.

Oosterhuis, G. J. E., Mulder, A. B., Kalsbeek-Batenburg, E., Lambalk, C. B., Schoemaker, J. & Vermes, I. (2000). Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertility and Sterility*, 74: 245-250.

Rowe, M.P., Powell, J.G., Kegley, E.B., Lester, T.D. & Rorie, R.W. (2014). Effect of supplemental tracemineral source on bull semen quality. *The Professional Animal Scientist*, 30: 68-73.

Said, T.M., Gaglani, A. & Agarwal, A. (2010). Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive Biomedicine Online*, 21: 456-462.

Sangeeta, S., Arangasamy, A., Kulkarni, S. & Selvaraju, S. (2015). Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, 161: 82–88.

SAS Institute Inc, (2002). SAS Users Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. SAS, Inc.,Cary, NC, USA.

Shehat, M.G. & Tigno-Aranjuez, J. (2019). Flow cytometric measurement of ROS production in macrophages in response to FcγR cross-linking. *Journal of Visualized Experiments*, 145: e59167.

Sikka, S.C. (2001). Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 851-862.

Tharwat, E.E. (1998). The use of zinc sulfate to improve semen characteristics and fertility of New Zealand white rabbit bucks during hot season. In Proceeding of the seventh conference of agricultural.

Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Ardebili, R., Dadashpour Davachi, N. & Nasiri, A.H. (2013). Combined n-3 Fatty Acids and Î±-Tocopherol Supplementation Improved the Ovine Sperm Cryosurvival. *Iranian Journal of Biotechnology*, 11: 238-243.

Tvrdá, E., Sikeli, P., Lukáčová, J., Massányi, P. & Lukáč, N. (2021). Mineral nutrients and male fertility. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021:1-14.

Wilde, D. (2006). Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, 96: 240-249.

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. *Reproductive Toxicology*, 15: 131-136.

Zargari, S., Masoumi, R., Rostami, B., Nejatbakhsh, R. & Eskandari-Nasab, M.P. (2016). Morphological and biochemical characteristics of Afshari and Afshari× Booroola Merino cross bred rams (cross-continental cross breeding) semen before and after cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 139: 26-29.