نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد هشتم، شماره اول، ۱۳۹۹
http://ejrr.gau.ac.ir
۴۹-۶۲

اثر افزودن عصاره اتانولی پونه و سیستئین به رقیق کننده بر ویژگی‌های باروری منی منجمد قوچ بلوچی پس از یخ‌گشایی

کاوه علی‌زاده[۱]، *فرید مسلمی‌پور[۲]، فاطمه بحری بیناباج[۲]، علی مجتهدین[۳]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و [۲]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس

[۳]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

تاریخ دریافت: ۹۸/۸/۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۵

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به تمایل فزاینده پرورش‌دهندگان گوسفند به استفاده از تلقیح مصنوعی، یافتن راهکارهایی برای حفظ باروری منی منجمد قوچ می‌تواند دارای اهمیت و کاربردی باشد. یکی از اثرات منفی انجماد منی دام‌ها، افزایش رادیکال‌های آزاد و در نتیجه افزایش پراکسیداسیون غشای سلولی اسپرم است که در نهایت باعث کاهش باروری منی پس از یخ‌گشایی می‌گردد. برخی گیاهان با داشتن سطوح بالای آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی می‌توانند به کاهش پراکسیداسیون منی کمک نمایند. از سوی دیگر، اسید آمینه سیستئین به عنوان پیش‌ساز گلوتاتیون، یکی از ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانتی منی به شمار می‌رود. بنابراین، هدف از این پژوهش بررسی اثر افزودن عصاره اتانولی گیاه پونه به عنوان منبع آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی و اسید آمینه سیستئین به منی قوچ بر ویژگی‌های باروری منی پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق نمونه‌های منی از چهار رأس قوچ بلوچی بالغ و بارور (میانگین سن بیش از دو سال) با استفاده از مهبل مصنوعی جمع آوری گردید و پس از ارزیابی اولیه با یکدیگر مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از رقیق کننده منی بر پایه تریس- زرده تخم مرغ رقیق‌سازی گردیدند. تیمارهای آزمایش به صورت فاکتوریل ۳×۳ در قالب طرح کاملا تصادفی با ۹ تیمار و ۶ تکرار بود که به هر گروه تیماری شش نی (پایوت) اختصاص یافت. پس از افزودن سطوح مختلف عصاره اتانولی پونه (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) و اسید آمینه سیستئین (صفر، ۵ و ۱۰ میلی‌مول)، نی‌های با منی پر شده و به مدت دو ساعت در دمای یخچال (چهار درجه سانتی‌گراد) خنک شدند و سپس در نیتروژون مایع، منجمد و به مخزن نیتروژن منتقل شدند. پس از گذشت ۱۰ روز، یخ‌گشایی نی‌ها در آب ولرم انجام شد و فراسنجه‌های حرکتی اسپرم توسط دستگاه ارزیابی کامپیوتری ارزیابی شد. درصد زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم‌ها به کمک میکروسکوپ ارزیابی شد. داده‌های این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS با رویه GLM مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی-کرامر درسطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که اثر افزودن عصاره گیاه پونه و سیستئین و همچنین برهم‌کنش آن‌ها بر همه فراسنجه‌های جنبایی و زنده‌مانی اسپرم منجمد قوچ پس از یخ‌گشایی معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) بجز درصد اسپرم‌ها با ریخت‌شناسی غیرطبیعی که صرفا اثر افزودن سیستئین معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین جنبایی کل، یکپارچگی غشای پلاسمایی، خطی بودن جنبایی و سرعت در مسیر منحنی اسپرم در تیمار سیستئین ۱۰ (بدون عصاره پونه) و بیشترین زنده‌مانی، سرعت اسپرم در

مسیر مستقیم و سرعت اسپرم در مسیر میانگین در تیمار سیستئین ۵ مشاهده شد. بیشترین درصد جنبایی پیش‌رونده اسپرم در تیمار عصاره پونه ۲۰۰ (بدون سیستئین) بود.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی با توجه به تاثیر مثبت افزودن اسیدآمینه سیستئین در رقیق کننده بر پایه تریس–زرده تخم مرغ بر بیشتر فراسنجه‌های باروری اسپرم منجمد پس از یخ‌گشایی، استفاده از سطوح ۵ و ۱۰ میلی‌مول سیستئین در هر میلی‌لیتر رقیق کننده برای حفظ باروری منی منجمد قوچ پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، باروری، سیستئین، عصاره پونه، قوچ

مقدمه

تلقیح مصنوعی نقش بسیار مهمی در اصلاح نژاد گوسفندان به خصوص در آزمون نتاج و ارزیابی قوچ ایفا می‌کند. ذخیره سازی طولانی مدت منی دام برای دستیابی به مزایای تلقیح مصنوعی، یک امر ضروری محسوب می‌شود. این امر به وسیله فرایند انجماد اسپرم تحقق پیدا می‌کند که موجب توقف فعالیت‌های متابولیکی اسپرم‌ها شده و در نهایت امکان ذخیره سازی طولانی مدت را در پی دارد (۳).

یون هیدروکسل، سوپراکسید، هیدروژن پراکسید، رادیکال هیدروکسیل و یون هیپوکلریت نمونه‌هایی از گونه‌های فعال اکسیژنی[1] (ROS) می‌باشند که به شدت واکنش پذیر بوده و سبب آسیب دیدگی سلول‌های اسپرم می‌شوند (۲۵). گونه‌های فعال اکسیژن، از طریق چندین بخش شامل غشای پلاسمایی، میتوکندری و DNA، می‌توانند به اسپرم آسیب وارد نمایند (۲ و ۱۳). سلول اسپرم دارای غلظت‌های زیاد اسیدهای چرب غیراشباع بوده که مستعد پراکسیداسیون لیپیدی (LPO)[2] و در نتیجه کاهش جنبایی، یکپارچگی غشایی، باروری و تغییرات متابولیکی اسپرم است. برای مقابله با این مشکل، استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها اهمیت زیادی پیدا می‌کند (۱۴). از سوی دیگر، اسپرم از مکانیسم آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی و غیرآنزیمی برخوردار بوده اما مقدار آن کافی نبوده و برای فرآوری اسپرم نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدانت‌هایی با منشأ خارجی می‌باشد (۴). عصاره بسیاری از گیاهان دارای ترکیب‌های زیستی فعال مانند اسیدهای فنولیک و فلاونوییدها هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانتی زیادی داشته و از آسیب رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کنند (۱۶). این ترکیبات به دلیل خواص اکسید و احیاکنندگی و دهنده گروه هیدروکسیل بودن دارای نقش مهمی در جذب و خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژن ROS به ویژه رادیکال‌های آزاد و تجزیه پراکسیدها هستند (۱۹). بر اساس گزارش‌های موجود، گیاه پونه به علت دارا بودن مقادیر بالای مونوترپن‌ها، تیمول، کارواکرول و ترکیبات فلاونوئیدی، از توانایی بالایی برای خنثی، کنترل و پاکسازی رادیکال‌های آزاد بدن برخوردار است (۷). در بررسی صورت پذیرفته عمدتاً خواص آنتی‌اکسیدانتی و تعیین ترکیبات فنولیک گیاه پونه در صنایع غذایی و داروسازی انجام شده و در سایر مطالعات از دیگر گیاهان هم‌خانواده پونه (نعناعیان) در انجماد اسپرم گاو نر و قوچ استفاده شده است. برای مثال، نتایج تحقیقات پژوهشگران نشان داده است که استفاده از عصاره رزماری در رقیق کننده منی موجب بهبود جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی آکروزوم شده و سطح مالون‌دی‌آلدهید به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (۱۶).

1. Reactive oxygen species
2. Lipid peroxidation

سیستئین یک اسیدآمینه حاوی گوگرد است که به طور طبیعی در پلاسمای سمینال اسپرم یافت می‌شود که سلامت DNA را حفظ می‌کند. سیستئین به عنوان یک ماده پیش‌ساز در بیوسنتز درون سلولی گلوتاتیون، سطح آن را افزایش می‌دهد (۱۸ و ۳۱). این آنتی‌اکسیدانت درون سلولی، اسپرم را از آسیب رادیکال‌های آزاد حفظ می‌نماید (۲۰ و ۲۷). سیستئین و گلوتامین، اثر مهمی بر کاهش اثر گونه‌های فعال اکسیژن طی فرایند انجماد-یخ گشایی دارند (۲۸ و ۳۱). در یک بررسی تاثیر سطوح مختلف سیستئین (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌مول بر میلی‌لیتر) و گلیسین بر منی قوچ نسبت به گروه شاهد، نتایج معنی‌داری را نشان داده است (۱۲). با توجه به مطالب ذکر شده، تاکنون پژوهشی در مورد افزودن عصاره پونه به رقیق کننده منی دام‌های نر صورت نگرفته است. بنابراین، هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر افزودن سطوح مختلف عصاره اتانولی پونه به عنوان آنتی‌اکسیدانت طبیعی و سیستئین به عنوان آنتی‌اکسیدانت درون‌سلولی به رقیق کننده پایه جهت بهبود فراسنجه‌های کیفیت اسپرم در فرآیند سردسازی و انجماد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تیمارهای آزمایشی: استخراج عصاره اتانولی گیاه پونه در آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس انجام شد. از گیاه پونه پودر شده به مقدار ۵۰ گرم وزن شده و با ۳۵۰ میلی‌لیتر الکل اتانول ۹۶ درصد به مدت ۲۴ساعت داخل بشر یک لیتری خیسانده شد و پس از صاف کردن با کمک کاغذ صافی عصاره آن حاصل شد. بعد از جداسازی کامل الکل، عصاره غلیظ در ته بشر باقی ماند (۳۰). در زمان شروع طرح، از عصاره گیاه مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم به وسیله ترازوی دقیق، وزن شده و در ۲۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد. محلول رقیق شده عصاره پونه در سه سطح صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر و در ترکیب با سه سطح سیستئین (صفر، ۵ و ۱۰ میلی‌مول بر میلی‌لیتر) در قالب آزمایش ۳×۳ با ۹ تیمار و ۶ تکرار آزمایشی، در همان روز استفاده شد. ترتیب تیمارهای آزمایشی و نام خلاصه شده آن‌ها در جدول ۱ بیان شده است.

جمع آوری مایع منی: در پژوهش حاضر برای جمع آوری مایع منی از چهار رأس قوچ بالغ نژاد بلوچی ۲ سال به بالا و وزن ۷۵-۶۵ کیلوگرم موجود در مرکز اصلاح نژاد دام شمال شرق کشور واقع در عباس آباد مشهد در تابستان و پاییز ۱۳۹۷ استفاده شد. قوچ‌ها با جیره کاملا مخلوط با یونجه، کاه گندم، دانه ذرت، دانه جو و سبوس گندم دارای ۲/۳ مگاکالری انرژی متابولیسمی و ۱۲/۵ درصد پروتئین خام در کیلوگرم ماده خشک تغذیه شدند. نمونه‌های منی دو بار در هفته از هر قوچ به وسیله مهبل مصنوعی با دمای درونی ۳۷ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری گردید.

ارزیابی اولیه نمونه منی: نمونه‌های منی به دست آمده به سرعت به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تعیین حجم و غلظت منی و تعیین کیفیت ظاهری منی از جمله ارزیابی‌های اولیه بود که حجم مایع منی بین ۲-۰/۷۵ میلی‌لیتر و غلظت اسپرم بیشتر از ۲/۵ میلیارد اسپرم در میلی‌لیتر بود. درصد جنبایی و زنده‌مانی نمونه اولیه نیز تعیین شد. جنبایی موجی یا توده‌ای اسپرم با درجه‌بندی ۴ و جنبایی پیش‌رونده بیش از ۸۰ درصد و زنده‌مانی بیش از ۷۵ درصد بود که با استفاده از میکروسکوپ نوری و دستگاه اسپکتروفتومتر (برای شمارش جمعیت اسپرم) ارزیابی شدند (۹ و ۱۵).

رقیق سازی مایع منی و افزودن تیمارهای آزمایشی: رقیق کننده پایه تریس-زرده تخم مرغ بر اساس جدول ۲ تهیه شد.

جدول ۱- ترکیب سطوح مختلف عصاره پونه و سیستئین و نام اختصاری تیمارها

ردیف No.	ترکیب تیمار Treatments combination	نام اختصاری تیمار Abbreviated name of the treatments
1	عصاره پونه صفر × سیستئین صفر Horsemint extract 0×cysteine 0	شاهد Control
2	عصاره پونه ۱۰۰ × سیستئین صفر Horsemint extract 100×cysteine 0	پونه۱۰۰ Horsemint100
3	عصاره پونه ۲۰۰ × سیستئین صفر Horsemint extract 200×cysteine 0	پونه۲۰۰ Horsemint200
4	عصاره پونه صفر × سیستئین ۵ Horsemint extract 0×cysteine 5	سیستئین۵ cysteine5
5	عصاره پونه صفر × سیستئین ۱۰ Horsemint extract 0×cysteine 10	سیستئین۱۰ Cysteine10
6	عصاره پونه ۱۰۰ × سیستئین ۵ Horsemint extract 100×cysteine 5	پونه۱۰۰×سیستئین۵ Horsemint100×cysteine5
7	عصاره پونه ۱۰۰ × سیستئین ۱۰ Horsemint extract 100×cysteine 10	پونه۱۰۰×سیستئین۱۰ Horsemint100×cysteine10
8	عصاره پونه ۲۰۰ × سیستئین ۵ Horsemint extract 200×cysteine 5	پونه۲۰۰×سیستئین۵ Horsemint200×cysteine5
9	عصاره پونه ۲۰۰ × سیستئین ۱۰ Horsemint extract 200×cysteine 10	پونه۲۰۰×سیستئین۱۰ Horsemint200×cysteine10

جدول ۲- ترکیب رقیق کننده پایه برای نگهداری منی قوچ در شرایط انجماد (برای ۱۰۰ میلی‌لیتر)

Table 2.The basic extender ingredients to store ram semen in frozen condition (per 100ml)

تریس (گرم) Tris (g)	3.876
فروکتوز (گرم) Fructose (g)	0.523
اسیدسیتریک (گرم) Citric acid (g)	2.123
زرده تخم مرغ (میلی لیتر) Egg yolk (mL)	16
گلیسرول (میلی لیتر) Glycerol (mL)	5.3
پنی‌سیلین (واحد بین‌المللی) Penicillin (IU)	100000
استرپتومایسین (میلی‌گرم) Streptomycin (mg)	100
آب مقطر (تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر) Distilled water	to 100mL

رقیق کننده پایه به تعداد تیمارهای آزمایشی در لوله‌های مشخص تقسیم شده و ترکیب سطوح مختلف عصاره اتانولی پونه و اسید آمینه سیستئین به صورت آزمایش فاکتوریل ۳×۳ به آن‌ها اضافه گردیدند. نمونه‌های منی پس از مخلوط شدن، تقسیم شده و در هر بخش با رقیق کننده پایه و افزودنی مشخص و با نسبت ۱ به ۱۰ (۱ حجم نمونه منی و ۱۰ حجم رقیق کننده با افزودنی مربوطه) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم رقیق‌سازی گردیدند. در مرحله بعد، لوله‌های حاوی منی رقیق شده در ظرف مدرج آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند تا ظرف مدت ۲ ساعت دوره تعادل خود را طی نموده و خنک سازی پیش از انجماد انجام پذیرد. پس

از سپری شدن دوره تعادل، منی رقیق شده پس از اعمال تیمارها در همان دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، توسط دستگاه اتوماتیک پرکننده و بسته کننده (سیلینگ- فیلینگ) به داخل نی‌های (پایوت‌ها) مخصوص با حجم نیم میلی‌لیتر کشیده شدند (۹). سپس نی‌ها در فاصله ۵ سانتی‌متری بالای سطح بخار نیتروژن قرار گرفته و پس از گذشت ۱۲ دقیقه در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند.

یخ‌گشایی: نی‌ها پس از ۱۰ روز انجماد در مخزن نیتروژن مایع، یخ‌گشایی شدند به طوری که پس از خروج از داخل مخزن در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه یخ‌گشایی شده و محتویات نی‌ها تخلیه و ارزیابی شد.

فراسنجه‌های مورد ارزیابی پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی: فراسنجه‌های جنبایی اسپرم توسط سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (CASA: Computer-Assisted Sperm Analysis) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳).

جدول ۳- فراسنجه‌های قابل ارزیابی با سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (CASA)

Table 3.The assayed parameters by computerized sperm analyzing system (CASA)

فراسنجه	تعریف
Total Number of Sperm (TNS)	تعداد کل اسپرم‌های مشاهده شده در فیلدهای مورد بررسی
Number of Motile Sperms (NMS)	تعداد کل اسپرم‌های جنبا در فیلدهای مورد بررسی
Straight Line Velocity (VSL)	سرعت در مسیر مستقیم بر حسب µm/s
Curvilinear Velocity (VCL)	سرعت در مسیر منحنی بر حسب µm/s
Average Path Velocity (VAP)	سرعت در مسیر میانگین بر حسب µm/s
Linearity (LIN)	نسبت VSL به VCL بر حسب درصد

جنبایی اسپرم: اولین فراسنجه‌ای که پس از فرآیند انجماد-یخ گشایی ارزیابی شد، جنبایی سلول‌های اسپرم بود. بدین منظور، چهار نی از هر گروه آزمایشی، یخ‌گشایی شده و داخل لوله با دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد ریخته شدند. سپس با استفاده از سمپلر متغیر و با برداشتن ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از محتوای لوله، قطره‌ای بر لام قرار داده شد و لامل بر روی آن قرار گرفت. لام آماده شده در زیر میکروسکوپی که به سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (CASA,Video Test Sperm 3.1 Russia) متصل بود، قرار داده شد و به کمک سیستم مذکور و به منظور ارزیابی وضعیت جنبایی اسپرم‌ها، سه میدان دید به صورت تصادفی انتخاب شد و در هر میدان نیز ۱۵ زمینه در نظر گرفته شد که در این نواحی درصد جنبایی پیش‌رونده، جنبایی کل، سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده، سرعت اسپرم در خط مستقیم، میانگین سرعت در مسیر مستقیم اسپرم‌ها معین و ثبت گردید.

یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم: برای بررسی سلامت غشاء اسپرم از آزمون هاست (آزمون هایپواسموتیک) مطابق با روش ریول و مرود (۱۹۹۴) استفاده شد. محلول هاست شامل ۰/۷۳۵ گرم سدیم سیترات آنیدرات و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در میلی‌لیتر آب مقطر بود. بعد از یخ‌گشایی نی‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول

هاست اضافه شد. پس از سپری شدن ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حداقل ۳ قطره از نمونه انکوبه شده بر روی سه نقطه از لام ریخته و لامل تمیز روی آن‌ها قرار داده شد. سپس با بزرگ‌نمایی ۴۰× میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به صورت تصادفی در ۱۰ میدان دید حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم با غشاء یکپارچه محاسبه شد. در این آزمون، اسپرم‌های با دم پیچ‌خورده و متورم به عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم در نظرگرفته می‌شوند (۱۷، ۲۱ و ۲۲).

ریخت‌شناسی اسپرم: برای ارزیابی اسپرم با ریخت‌شناسی طبیعی از محلول هانکوک استفاده شد. محیط هانکوک شامل ۶۲/۵ میلی‌لیتر فرمالین (۳۷ درصد)، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی سدیم، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر است. برای ارزیابی، چند قطره از هر نمونه منی موجود در نی‌ها به میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک اضافه شد. یک قطره از این محلول بر روی لام ریخته شد و لامل به آرامی روی آن قرار گرفت و با استفاده از بزرگ‌نمایی ۴۰۰× میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به صورت تصادفی در ۱۰ میدان دید حداقل ۲۰۰ سلول اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم طبیعی محاسبه شد. غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش‌های میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم به عنوان اسپرم غیرطبیعی در نظر گرفته شد (۹).

زنده‌مانی اسپرم: به منظور ارزیابی زنده‌مانی اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین استفاده شد. برای ساخت محلول رنگی، ۰/۸۵ گرم ائوزین، ۵ گرم نگروزین، ۱/۴۵ گرم سدیم سیترات آنیدرات را در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و محلول به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد. با توجه به سلامت غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها، درصد سلول‌های زنده و مرده قابل ارزیابی می‌باشند. در صورت مرگ اسپرم و آسیب‌پذیر بودن غشاء پلاسمایی، رنگ قرمز ائوزین به داخل اسپرم نفوذ کرده و قسمت تحتانی سر اسپرم که فاقد آکروزوم می‌باشد، قرمز رنگ دیده می‌شود (۲۶).

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل ۳×۳ در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از رویه GLM و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی (در سطح خطای ۵ درصد) به وسیله نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه آماری قرار گرفت. مدل آماری مورد استفاده به صورت زیر بود:

$$Y_{ijk}=\mu+P_i+C_j+PC_{ij}+e_{ijk}$$

در این مدل Y_{ijkl} متغیر وابسته، μ میانگین کل مشاهدات، P_i اثر پونه، C_j اثر سیستئین، PC_{ij} برهم‌کنش پونه و سیستئین و e_{ijk} اشتباه آزمایش بود.

نتایج

فراسنجه‌های جنبایی اسپرم پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی

جنبایی کل: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر افزودن پونه، سیستئین و برهم‌کنش پونه×سیستئین بر جنبایی کل اسپرم‌ها معنی‌دار بود ($p<۰/۰۰۰۱$). مقایسه میانگین‌های برهم‌کنش سطوح مختلف عصاره پونه×سیستئین (جدول ۴) نشان داد که بیشترین جنبایی کل اسپرم در گروه سیستئین۱۰ (۴۴/۴۷ درصد) و سپس سیستئین۵ (۴۴/۳۶ درصد) و کمترین آن با تفاوتی معنی‌دار در گروه پونه۱۰۰ (۳۷/۶۵ درصد) مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).

جنبـایی پـیش‌رونـده: نتـایج تجزیـه واریـانس اثـر تیمارهای آزمایشی بر جنبایی پیش رونده اسپرم‌ها پس از یخ‌گشایی نشان داد که اثرات مستقل عصاره پونه و سیسـتئین و بـرهم‌کـنش آن‌هـا بـر درصـد جنبـایی پـیش‌رونـده اسـپرم‌هـا معنـی‌دار بـود (P <۰/۰۰۰۱). مقایسـه بـرهم‌کـنش تیمارهـای آزمایشـی نشـان داد (جـدول ۴) کـه تیمـار پونـه۲۰۰ بیشـترین (۲۴/۶۷ درصد) و تیمار شاهد کمترین (۲۰/۴۹ درصد) جنبایی پیش‌رونده اسپرم را نسبت به سایر تیمارها داشتند.

سـرعت در مسـیر میـانگین (VAP): نتـایج تجزیـه واریـانس اثـر تیمارهـای آزمایشـی بـر VAP پـس از یخ‌گشایی نشان داد که اثرات مستقل افـزودن عصـاره پونـه و سیسـتئین و بـرهم‌کـنش آن‌هـا معنـی‌دار بـود (P <۰/۰۰۰۱). در برهم‌کـنش سـطوح مختلـف پونـه ×سیستئین بر VAP مشاهده شد (جدول ۴) که تیمـار سیستئین۵ بالاترین (۵۰/۶۵ میکرومتر بر ثانیه) و تیمار پونه۱۰۰ کمترین (۴۳/۰۵ میکرومتر بـر ثانیـه) میـزان VAP را نسبت به سایر تیمارها داشتند.

سرعت در مسیر منحنی (VCL): سرعت اسپرم‌ها در مسیر منحنی (VCL) به صورت کاملا معنی‌دار تحـت تاثیر افزودن عصاره پونه و سیستئین به صورت مستقل و همچنین برهم‌کنش آن‌ها بود (P <۰/۰۰۰۱). مقایسه میانگین برهم‌کنش سـطوح مختلـف پونـه×سیسـتئین نشـان داد (جـدول ۴) کـه تیمـار سیسـتئین۱۰ دارای بیشترین و تیمار پونه۱۰۰ دارای کمترین VCL بودنـد (۶۳/۰۱ در مقابل ۵۵/۱۴ میکرومتر بر ثانیه).

سـرعت در مسـیر مسـتقیم (VSL): نتـایج تجزیـه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر VSL اسپرم‌ها پس از یخ‌گشایی نشان داد که اثرات مستقل افزودن عصاره پونه و سیستئین و برهم‌کنش آن‌ها بـر ایـن فراسـنجه کاملا معنی‌دار بود (P <۰/۰۰۰۱). نتـایج بـرهم‌کـنش سطوح مختلف پونه×سیستئین نشان داد (جدول ۴) که بیشترین VSL در تیمار سیستئین۱۰ (۳۲/۷۲ میکرومتر برثانیـه) و کمتـرین آن در گـروه پونـه ۱۰۰ (۲۳/۱۵ میکرومتر برثانیه) بود.

خطـی بـودن جنبـایی (Lin): خطـی بـودن جنبـایی اسپرم‌ها (LIN) به صورت کاملا معنی‌دار تحـت تـاثیر افزودن عصاره پونه و سیستئین به صـورت مسـتقل و همچنین برهم‌کنش آن‌ها بـود (P <۰/۰۰۰۱). مقایسـه میانگین تیمارهای برهم‌کنش پونه×سیستئین نشـان داد (جـدول ۴) کـه میـزان LIN در تیمـار سیسـتئین ۱۰ بیشترین (۵۲/۹۲ درصد) و در تیمار پونه ۱۰۰ کمترین (۴۲/۰۵ درصد) بود.

زنده‌مانی اسپرم‌ها: نتایج تجزیه واریانس درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها پس از یخ‌گشایی و رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین نشان داد که اثرات مستقل افزودن عصاره پونه و سیستئین و برهم‌کنش آن‌ها بر درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها کاملا معنی‌دار بود (P <۰/۰۰۰۱). مقایسه میانگین تیمارهای برهم‌کنش سطوح مختلف پونه×سیستئین نشان داد (جدول ۵) که تیمار سیستئین۵ بیشترین (۴۷/۵۴ درصد) و پونه۱۰۰ کمترین (۴۳/۱۳ درصد) زنده‌مانی را دارا بودند.

یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم: تجزیه واریـانس نتایج آزمـون هایپواسـموتیک بـر یکپـارچگی غشـای پلاسمائی اسپرم‌ها نشان داد که تـاثیر عصـاره پونـه و سیستئین به صورت مستقل و برهم‌کـنش آن‌هـا تـاثیر کاملا معنی‌دار داشت (P <۰/۰۰۰۱). مقایسه میـانگین تیمارهای برهم‌کنش سطوح مختلـف عصـاره پونـه و سیستئین نشان داد (جدول ۵) که بیشترین و کمتـرین یکپارچگی غشای پلاسمائی اسـپرم‌هـا بـه ترتیـب در تیمار سیستئین۱۰ (۴۱/۸۶ درصد) و تیمـار پونـه۱۰۰ (۳۷/۲۳ درصد) بود.

جدول ٤- میانگین فراسنجه‌های جنبایی اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی در گروه‌های تیماری

Table 2- Means of sperm motility parameters after freezing and thawing in treatment groups

	تیمارها (Treatments)	خطی بودن جنبایی Linearity (%)	سرعت در مسیر مستقیم (میکرون بر ثانیه) Straight line Velocity (µm/se)	سرعت در مسیر منحنی (میکرون بر ثانیه) Curvilinear velocity (µm/se)	سرعت در مسیر میانگین(میکرون بر ثانیه) Average path velocity (µm/se)	جنبایی پیش‌رونده (درصد) Progressive motility (%)	جنبایی کل (درصد) Total motility (%)
عصاره پونه	صفر	52.35[a]	32.22[a]	62.13[a]	50.20[a]	22.31[b]	43.11[a]
	۱۰۰	45.69[c]	26.12[c]	57.53[c]	45.40[c]	22.51[b]	40.08[b]
	۲۰۰	49.50[b]	30.22[b]	51.24[b]	48.67[b]	24.19[a]	42.71[a]
	میانگین خطای استاندارد	0.1891	0.1825	0.1662	0.1472	0.1563	0.1951
	سطح معنی‌داری	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
سیستئین	صفر	47.16[b]	28.39[c]	59.09[c]	46.97[b]	22.43[b]	39.93[b]
	۵	50.15[a]	30.55[a]	60.49[b]	48.88[a]	22.81[b]	42.96[a]
	۱۰	50.24[a]	29.62[b]	61.31[c]	48.41[a]	23.76[a]	43.01[a]
	میانگین خطای استاندارد	0.1891	0.1825	0.1662	0.1472	0.1563	0.1951
	سطح معنی‌داری	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
برهم‌کنش پونه× سیستئین	شاهد Control	51.57[ab]	32.69[a]	61.49[b]	50.01[ab]	20.49[e]	40.23[e]
	سیستئین ۵ Cysteine 5	52.56[b]	32.72[a]	61.88[ab]	50.65[a]	22.53[cd]	44.36[ab]
	سیستئین ۱۰ Cysteine 10	52.92[a]	31.25[b]	63.01[a]	49.93[ab]	23.90[ab]	44.74[a]
	پونه ۱۰۰ Horsemint 100	42.05[d]	23.15[f]	55.14[d]	43.05[e]	22.13[d]	37.65[e]
	پونه ۲۰۰ Horsemint 200	47.86[c]	29.31[d]	60.63[b]	47.87[c]	24.67[a]	41.90[cd]
	پونه ۱۰۰×سیستئین ۵ Horsemint 100×Cysteine 5	47.62[c]	27.83[e]	58.35[c]	46.74[cd]	22.31[d]	41.40[de]
	پونه ۱۰۰×سیستئین ۱۰ Horsemint 100×Cysteine 10	47.41[c]	27.36[e]	59.09[c]	46.40[d]	23.08[bcd]	41.18[de]
	پونه ۲۰۰× سیستئین ۵ Horsemint 200×Cysteine 5	50.26[b]	31.11[c]	61.26[b]	49.25[b]	23.59[abc]	43.11[bc]
	پونه ۲۰۰× سیستئین ۱۰ Horsemint 200×Cystein 10	50.38[b]	30.26[cd]	61.83[ab]	48.89[b]	24.30[ab]	43.11[bc]
	میانگین خطای استاندارد	0.3275	0.3161	0.2878	0.2550	0.2707	0.3379
	سطح معنی‌داری	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

[a و b] در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت، اختلاف آماری معنی‌دار دارند (P<0.05).

[a, b] In each column, means with different letters have significant statistical differences (P<0.05).

ریخت‌شناسی اسپرم: نتایج آزمون محلول هانکوک برای ارزیابی ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم‌ها نشان داد که تاثیر اثرات مستقل عصاره اتانولی پونه و برهم‌کنش عصاره پونه×سیستئین بر درصد اسپرم‌های طبیعی معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵)، ولی اثر مستقل سطوح مختلف سیستئین بر درصد اسپرم‌های طبیعی معنی‌دار

بود (P<۰/۰۵). در مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف عصاره پونه بر درصد اسپرم‌های طبیعی (جدول ۵)، بیشترین آن در سطح صفر عصاره پونه (۲۵/۱۰ درصد) و کمترین آن در سطح ۲۰۰ عصاره (۲۴/۸۷ درصد) مشاهده شد. مقایسه تاثیر سطوح مختلف سیستئین نشان داد که سیستئین ۵ دارای بیشترین (۲۵/۵۲ درصد) و سیستئین صفر دارای کمترین (۲۴/۵۴ درصد) اسپرم‌های طبیعی بود. مقایسه میانگین برهم‌کنش پونه×سیستئین نشان داد که تیمار سیستئین۵ بیشترین (۲۵/۹۴ درصد) و تیمار شاهد کمترین (۲۴/۲۹ درصد) میزان اسپرم‌های طبیعی را داشتند.

جدول ۵- میانگین زنده‌مانی، سلامت غشاء و ریخت‌شناسی اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی در گروه‌های تیماری

Table 5- Means of viability, membrane integrity and morphology of sperm after freezing and thawing in treatment groups

	تیمارها Treatments	زنده‌مانی (درصد) Viability (%)	یکپارچگی غشا پلاسمایی (درصد) Plasma membrane integrity (%)	اسپرم غیرطبیعی(درصد) Sperm abnormality (%)
عصاره پونه	صفر	47.16[a]	40.67[a]	25.10
	۱۰۰	44.67[c]	38.65[b]	25.00
	۲۰۰	46.10[b]	40.29[a]	24.87
	میانگین خطای استاندارد	0.1677	0.1651	0.2362
	سطح معنی‌داری	<.0001	<.0001	0.7978
سیستئین	صفر	45.05[b]	38.74[c]	24.54[b]
	۵	46.54[a]	40.11[b]	25.52[a]
	۱۰	46.35[a]	40.76[a]	24.91[ab]
	میانگین خطای استاندارد	0.1677	0.1651	0.2362
	سطح معنی‌داری	<.0001	<.0001	0.0177
برهم‌کنش پونه× سیستئین	شاهد Control	46.55[ab]	39.22[c]	24.29
	سیستئین ۵ Cysteine 5	47.54[a]	40.91[ab]	25.94
	سیستئین ۱۰ Cysteine 10	47.40[a]	41.86[a]	25.06
	پونه ۱۰۰ Horsemint 100	43.13[c]	37.23[d]	24.78
	پونه ۲۰۰ Horsemint 200	45.46[b]	39.78[bc]	24.55
	پونه ۱۰۰×سیستئین ۵ Horsemint 100×Cysteine 5	45.64[b]	39.09[c]	25.36
	پونه ۱۰۰×سیستئین ۱۰ Horsemint 100×Cysteine 10	45.24[b]	39.62[bc]	24.87
	پونه ۲۰۰× سیستئین ۵ Horsemint 200×Cysteine 5	46.43[ab]	40.33[bc]	25.26
	پونه ۲۰۰× سیستئین ۱۰ Horsemint 200×Cystein 10	46.41[ab]	40.78[ab]	24.81
	میانگین خطای استاندارد	0.2905	0.2859	0.4091
	سطح معنی‌داری	0.0495	0.0395	0.7230

[a و b] در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت، اختلاف آماری معنی‌دار دارند (P<0.05).

[a, b] In each column, means with different letters have significant statistical differences (P<0.05).

بحث

در شرایط فیزیولوژیک یک تعادل بین تولید ROS و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی منی برقرار می‌باشد و تولید بیش از حد ROS موجب اختلال در عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی منی و در نهایت عملکرد اسپرم‌ها خواهد شد (۶). از طرف دیگر اسپرم پستانداران سرشار از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، فسفولیپیدها و استرول‌ها بوده، بنابراین، بسیار مستعد حمله انواع اکسیژن‌های فعال بوده و این امر سبب کاهش یافتن جنبایی اسپرم و همچنین کاهش سریع ATP داخل سلولی و بوجود آمدن آسیب‌های ساختمانی می‌شود (۱).

به‌طور کلی، مهم‌ترین اثر منفی پراکسیداسیون چربی در تمام سلول‌ها، اختلال در ساختار غشاء و عملکرد آن (فرایندهای انتقال یون‌ها و حفظ شیب متابولیت‌ها و پیامبرهای سلولی) را شامل می‌شود (۱۴). کاهش زنده‌مانی اسپرم، افزایش ناهنجاری‌ها در قطعه میانی، کاهش ظرفیت‌پذیری اسپرم و واکنش آکروزومی زودهنگام از دیگر عواقب تأثیر انواع اکسیژن فعال بر اسپرم می‌باشند (۱). مطالعات نشان داده‌اند که در پلاسمای منی رقیق شده یک منبع مهم آنتی‌اکسیدانتی وجود دارد که اسپرم‌ها را در فرایند انجماد، علیه تنش اکسیداتیو حفظ می‌نماید که البته ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی پلاسمای منی دام‌های نر به خاطر رقیق سازی، پایین آمده و به همین دلیل از آنتی‌اکسیدانت‌های خارجی علاوه بر آنتی‌اکسیدانت‌های موجود در پلاسمای منی در محیط رقیق کننده حاوی منی استفاده شده که توانایی آن‌ها در بهبود کیفیت و عملکرد اسپرم بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی گزارش شده است (۵).

به‌دلیل مشکلات ایمنی و ترکیبات سمی موجود در برخی آنتی‌اکسیدانت‌های مصنوعی و صرفه اقتصادی، امروزه استفاده از آنتی اکسیدانت‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است (۲۹). مطالعات فراوان در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که ترکیبات فنولیک می‌توانند به طور مستقیم رادیکال‌های آزاد را پاکسازی کنند، به طوری که حتی اثر آنتی‌اکسیدانتی این ترکیبات بیشتر از ویتامین‌های E و C و آنتی‌اکسیدانت‌های مصنوعی می‌باشد (۲۱). اثرات آنتی‌اکسیدانتی ترکیبات پلی‌فنولیک گیاهان به طور عمده به خاصیت دهندگی الکترون آن‌ها مربوط بوده و می‌توانند با انتقال گروه هیدروکسیل از ساختمان خود به ترکیب لیپیدها، آن‌ها را از فرآیند پراکسیداسیون لیپید حفظ نمایند. همچنین این ترکیبات با داشتن خصوصیت شلاته کنندگی یون‌های فلزی و مهار فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو و هیدرولیتیک می‌توانند فعالیت جذب یا مهار رادیکال‌های آزاد را از خود نشان دهد (۱۹).

نشان داده شده که عصاره گیاه پونه دارای مقادیر بالای مونوترپن، تیمول و کارواکرول است و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد (۷). اکثر مطالعات روی خواص آنتی‌اکسیدانتی و تعیین ترکیبات فنولیک این گیاه در صنایع غذایی و داروسازی انجام شده است و تاکنون در مورد افزودن عصاره پونه به رقیق کننده منی دام‌های نر صورت نگرفته است، اما از دیگر گیاهان هم‌خانواده پونه (نعناعیان) در انجماد اسپرم گاو نر و قوچ استفاده شده است. تحقیقات مالو و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که استفاده از عصاره رزماری در رقیق کننده منی موجب بهبود جنبایی کل و پیشرونده، زنده‌مانی و یکپارچگی آکروزوم شده و سطح مالون‌دی‌آلدئید به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد که موافق با نتایج آزمایش حاضر می‌باشد. رهبری و همکاران (۱۳۹۵)، در پژوهشی با عنوان تاثیر افزودن سیستئین (۷/۵ و ۱۵ میلی‌مول بر میلی‌لیتر) بر ویژگی‌های انجمادپذیری و باروری منی گاو بر پایه دو نوع رقیق کننده به این نتیجه رسیدند که افزودن

سیستئین در سطح ۷/۵ میل مول به منی گاو در شرایط انجماد و یخچال می‌تواند باعث بهبود انجمادپذیری و باروری منی شود کـه در نتـایج آزمـایش حاضـر نیـز افزودن دو سطح ۵ و ۱۰ میلی‌مول بر میلی‌لیتر باعـث بهبود پارامترهای جنبایی کل، جنبـایی پـیش‌رونـده و زنده‌مانی شد و موافق با پژوهش ذکر شده بود.

دقیـق کیـا و همکـاران (۱۳۹۵) گـزارش کردنـد افزودن عصاره مرزنجوش در رقیق کننـده منـی قـوچ، بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی در مقایسـه بـا گـروه شاهد، موجب بهبود صفت جنبایی پیش‌رونـده اسـپرم شد که نتایج پژوهش حاضر موافق با یافته‌هـای آن‌هـا بود. اثرات عصاره مرزنجوش نه تنها در خصوصـیات جنبایی اسپرم، بلکه در زنده‌مانی و یکپارچگی غشا نیز قابل مشاهده است، اما افزودن ۱۵۰ میکرولیتر عصـاره مرزنجـوش تـاثیر معنـی‌دار بـر یکپـارچگی غشـای پلاسمایی اسپرم‌ها نداشت. مقـادیر کمتـر و بیشـتر از ۱۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر سیر نزولی در پارامترهـای مورد ارزیابی داشته است. افزودن مقادیر بیشتر عصاره مرزنجوش، با مهار بـیش از حـد فعالیـت آنـزیم‌هـای دخیل در اکسیداسیون و احیاء و نیز بهـم زدن تعـادل بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی و تولید رادیکـال‌هـای آزاد در محیط اسپرم‌ها، موجب کاهش عملکردهای اسـپرم مـی‌شـوند (روکـا و همکـاران، ۲۰۰۴). در پـژوهش فرهادی و همکاران (۱۳۹۴) اثر عصاره اتـانولی مـریم گلـی سـهندی بـه عنـوان آنتـی‌اکسـیدان طبیعـی بـر پارامترهای کیفی اسپرم منجمد- یخ‌گشایی شـده گـاو هلشتاین را بررسی نموده و بیـان کردنـد کـه افـزودن سطح ۲ و ۴ میلی‌لیتر در دسی لیتر عصاره مریم گلـی سهندی باعث بهبود معنی‌دار کلیه صفات جنبایی شده و افزودن ۴ میلی‌لیتر در دسی لیتـر عصـاره ایـن گیـاه باعث بهبود معنی‌دار صفات زنده‌مـانی و یکپـارچگی غشایی پلاسمایی اسـپرم‌هـا بعـد از فراینـد انجمـاد- یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد و سایر تیمارها شد که این یافته‌ها موافق با یافته‌های پژوهش حاضر نبود. در مطالعات قبلی بیان شده است که افزودن سیسـتئین در مایع منی، باعث کاهش تنش اکسیداتیو شده و با مهار گونه‌های واکنش‌پذیر، باعث بهبود پارامترهـای مـورد ارزیابی اسپرم می‌شود (الوارز و استوری، ۱۹۸۳) که با نتایج پژوهش حاضر سازگار است.

دلتـی و همکـاران (۲۰۱۶) در بررسـی اثـرات سیستئین و ترهالوز در حفظ طولانی مدت منـی قـوچ نشان دادند که افزودن ترکیب سطوح مختلف ترهالوز و سیستئین به منی قوچ باعث بهبود انجمادپـذیری آن شده است. همچنین، خلیلـی و همکـاران (۲۰۱۰) در بررسی اثر غلظت‌های مختلف گلیسین و سیستئین بـر منی قوچ نژاد مغانی به این نتیجه رسیدند کـه افـزودن سطوح مختلف سیستئین (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌مـول بر میلی‌لیتر) نسبت به گروه شاهد و سـطوح مختلـف گلیسین اثرات بهتری داشت که بررسی‌های انجام شده در پژوهش حاضر نیز همسو با این نتایج می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از سیستئین به تنهایی می‌توانـد برخـی فراسـنجه‌هـای جنبـایی و زنده‌مانی اسپرم منجمد قوچ پس از یخ‌گشایی را بهبود بخشد، به طوری که بیشترین جنبایی کل، یکپـارچگی غشای پلاسمایی، خطی بـودن جنبـایی و سـرعت در مسیر منحنی در تیمار سیستئین ۱۰ میلـی‌مـول (بـدون عصاره پونه) و بیشترین زنده‌مانی، سـرعت اسـپرم در مسیر مستقیم و سرعت اسـپرم در مسـیر میـانگین در تیمار سیستئین ۵ مشاهده شد. هرچند بیشترین درصد جنبایی پیش‌رونده اسپرم در تیمـار عصـاره پونـه ۲۰۰ (بدون سیستئین) بـود. بنـابراین، مـی‌تـوان اسـتفاده از سطوح ۵ و ۱۰ میلی‌مول سیستئین در میلی‌لیتـر رقیـق کننده تریس-زرده تخـم مـرغ را بـرای باعـث بهبـود فراسنجه‌های باروری اسپرم منجمد قوچ پیشنهاد کرد.

منابع

1. Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L. and Storey, B.T. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. Journal of Andrology. 8: 338-348.
2. Armstrong, J.S., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W.J. and Sikka, S.C. 1999. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. Free Radical Biology and Medicine. 26(7): 869-880.
3. Bailey, J.L., Bilodeau, J.F. and Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. Journal of Andrology. 21: 1-7.
4. Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S. 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Veterinary Medicine International. Pp: 1-7.
5. Bilodeau, J.F., Chatterjee, S., Sirard, M.A. and Gagnon, C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Molecular Reproduction and Development. 55: 200–202.
6. Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V. and Davies-Morel M.C. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. Journal of Andrology. 21: 895-902.
7. Craig, J.W. 1999. Health – promoting properties of common herbs. American Journal of Clinical Nutrition. 70 (S3): 491-499.
8. Dolti, P., Moghaddam,Gh. and Ahmadian, H. 2016. Evaluation of the effects of cysteine and trehalose on longterm cryopreservation of ram semen. Journal of Agri-Food and Applied Sciences. 4 (1): 1-6.
9. Hancock, J. 1956. The morphology of boar spermatozoa. Journal of the Royal Microscopical Society. 76: 84-97.
10. DaghighKia, H., Sadeghi SadeghAbad, F., Mohamadzadeh, H., Vaseghi Dodran, H. and Ashrafi I. 2017. The effect of *Origanum Vulgare* extract as natural antioxidant on quality cryopreserved ram sperm. Journal of Animal Science Research. 26(4): 111-120.(In Persian)
11. Farhadi, R. DaghighKia, H. and Ashrafi I. 2016. The Effect of *Salvia Sahendica* Ethanolic Extract as Natural Antioxidant on Quality Parameters of Cryopreserved Holstein Bull Sperm. Research on Animal Production. 12: 79-86.
12. Khalili, B., Jafaroghli, M. Farshad, A. and Paresh- Khiavi, M. 2010. The Effects of Different concentrations of Glycine and cysteine on the Freezability of Moghani Ram spermatozoa. Asian-Australian Journal of Animal Sciences. 23(3): 318-325.
13. Krzyzosiak, J., Evenson, D., Pitt, C., Jost, L., Molan, P. and Vishwanath, R. 2001. Changes in susceptibility of bovine sperm to *in situ* DNA denaturation during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. Reproduction, Fertility and Development. 12(6): 251-261.
14. Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., Lombardo, F., Terminali, O., Passi, S. and Dondero, F. 1994.Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. Journal of Human Reproduction. 9: 2044-2050.
15. Linford, E., Glover, F.A., Bishop, C. and Stewart, D.L. 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bulls. Reproduction and Fertility. 47: 283-291.
16. Malo, C., Gil, L., Cano, R., Martínez, F. and Galé, I. 2011. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology. 75: 1735–1741.
17. Moreno, J.S., Coloma, M.A., Diaz, A.T., Brunet, A.G., Pastor, A.P., Soria,

A.Z., Carrizosa, J.A., Urritia, B. and Sebastian, A.L. 2008. A comparison of the protective action of chicken and quail egg yolk in the cryopreservation. Cryobiology. 57: 1.25-29.
18. Meister, A.M.E.A. and Anderson, M.E. (1983). Glutathione. Annual Review of Biochemistry. 52(1): 711-760.
19. Osawa, T. 1994. Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. In Postharvest Biochemistry of plant Food- Materials in the Tropics; Japan Scientific Societies Press: Tokyo, Japan; 241−251.
20. Perumal, P., Selvaraju, S., Selvakumar, S., Barik, A.K., Mohanty, D.N., Das, S., Das, R.K. and Mishra, P.C. 2011. Effect of pre-freeze addition of cysteine hydrochloride and reduced glutathione in semen of crossbred Jersey bulls on sperm parameters and conception rates. Reproduction in Domestic Animals. 46(4): 636-641.
21. Rice-Evans, C., Miller, N.J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plants Science. 2: 152-159.
22. Revell, S., and Mrode, R. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science. 36: 77-86.
23. Rahbari, F., Moslemipur, F., Mostafaloo, Y. and Rahchamani, R. 2017. Effect of cysteine addition and semen extender type on fertility of bovine semen stored at refrigerator temperature. The Third national conference on innovative achievements. Azadshahr, Iran, 1-12.
24. Roca J, Gil M.A., Parrilla I., Vazquez J.M. and Martinez E.A. 2004. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. Journal of Andrology. 25: 397-405.
25. Sikka, S.C. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Current Medicinal Chemistry. 8: 851-862.
26. Safdarian, M. 2007. Artificial insemination of sheep and goats. The first edition. Institute of Applied Science Agriculture. Pp: 232. (In Persian)
27. Topraggaleh, T.R., Shahverdi, A., Rastegarnia, A., Ebrahimi, B., Shafiepour, V., Sharbatoghli, M., Esmaeili, V. and Janzamin, E. 2014. Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of buffalo bull. Andrologia. 46(7): 777-783.
28. Uysal, O., Bucak, M.N., 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(2): 1362-1366.
29. Yanishlieva, N.V. and Marinova, E.M. 1996. Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in su nflower oil.Z Lebensm Unters Forsch; Pp: 220–223.
30. Zavatti, M., Zanoli, P., Benelli, A., Rivasi, M., Baraldi, C. and Baraldi, M. 2011. Experimental study on Satureja Montana as a treatment for premature ejaculation. Journal of Ethnopharmacology. 133: 629-633.
31. Zhandi, M. and Sharafi, M. 2015. Negative effect of combined cysteine and glutathione in soy lecithin-based extender on post-thawed ram spermatozoa. Cell and Tissue Banking. 16(3): 443-448.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 8(1), 2020
http://ejrr.gau.ac.ir

The effect of adding horsemint ethanol extract and cysteine into extender on fertility characteristic of frozen Baluchi ram semen after thawing

K. Alizadeh[1], *F. Moslemipur[2], F. Bahri-Binabaj[2] and A. Mojtahedin[3]
[1]M.Sc. Graduate and [2]Assistant Prof., Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavoos, Iran [3]Associate Prof., Dep. of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Iran
Received: 10/30/2019; Accepted: 02/25/2020

Abstract

Background and objectives: According to an increasing interest for using artificial insemination by sheep producers, finding methods to maintain frozen semen fertility would be important and applicable. One of the freezing semen disadvantages is increasing of free radicals leading to enhanced sperm membrane peroxidation then consequently causes lowered semen fertility after thawing. Some plants bearing high levels of natural antioxidants can help to decrease semen peroxidation. Cysteine, in addition, is a precursor of glutathione peroxidase being the most important antioxidant property in semen. Therefore, the aim of the study was to investigate the effect of adding different levels of ethanol extract of *Mentha Longifolia* (0, 100 and 200 µL/ml) and cysteine (0, 5 and 10 mmol/ml) into ram semen on fertility features after freezing and thawing processes.

Materials and methods: In this study, semen samples were collected from four mature, fertile Baluchi rams (> 2-year-old) by artificial vagina and after initial evaluation were pooled together. Then, samples were diluted in an extender based on Tris-egg yolk. Treatments were arranged as a 3 × 3 factorial experiment including nine treatments and six straws were assigned to each as replicate. After treating, the straws were filled by the equal amount of semen and after chilling in refrigerator (4 °C) for two hours were frozen in liquid nitrogen container. After thawing the straws at day 10, sperm motility parameters were assayed by CASA. Furthermore, the percentages of viability, plasma membrane integrity and normal morphology of sperms were evaluated by microscope. Data were analyzed by SAS software using GLM procedure and the means comparison was performed by Tukey-Kramer test at 5% error.

Results: Results of the study showed that the effects of adding horsemint extract and cysteine into the extender and the interaction between them on the all motility and viability parameters of frozen ram sperm after thawing were significant ($P < 0.05$), exempt for sperm morphology where only the effect of adding cysteine was significant. Means comparison showed that the greatest sperm total motility, plasma membrane integrity, linearity and curvilinear velocity were observed in cysteine10 treatment (without horsemint extract), while the greatest sperm viability, straight line velocity and average path velocity were seen in cysteine5 treatment (without horsemint extract). The greatest sperm progressive motility percentage was observed in horsemint200 group (without cysteine).

Conclusion: In general, considering to the beneficial effects of adding cysteine into the extender based on tris-egg yolk on the most of fertility parameters of ram frozen semen after thawing, using levels of 5 and 10 mmol cysteine per ml extender in order to maintain fertility of frozen ram semen is recommended.

Keywords: Cysteine, Fertility, Horsemint extract, Ram, Sperm

*Corresponding author; farid.moslemipur@gmail.com