

## اثر تره‌هالوز و سیستئین بر کیفیت اسپرم گاو بعد از انجماد

مهدی ژندی<sup>۱\*</sup>، الهه نجاتی امیری<sup>۱</sup>، اردشیر نجاتی جوارمی<sup>۱</sup>، محسن شرفی<sup>۲</sup>، افشین سیفی‌جمادی<sup>۱</sup>، حسین واثقی دودران<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی

<sup>۲</sup> تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم طیور

<sup>۳</sup> تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی

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

### چکیده

هدف از این پژوهش مطالعه اثر مقادیر مختلف تره‌هالوز و سیستئین بر کیفیت اسپرم گاو بعد از انجماد-یخ‌گشایی بود. در این مطالعه، نمونه‌های منی از سه رأس گاو نر جمع‌آوری و پس مخلوط شدن به شش بخش مساوی تقسیم‌شده و هریک یک از رقیق‌کننده‌های زیر رقیق و منجمد شد. ۱- فاقد سیستئین و تره‌هالوز ( $T_0C_0$ )، ۲- دارای ۵ میلی‌مول سیستئین و فاقد تره‌هالوز ( $T_0C_5$ )، ۳- دارای ۱۰ میلی‌مول سیستئین و فاقد تره‌هالوز ( $T_{10}C_0$ )، ۴- فاقد سیستئین و دارای ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز ( $T_{100}C_0$ )، ۵- دارای ۵ میلی‌مول سیستئین و ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز ( $T_{100}C_5$ ) و ۶- دارای ۱۰ میلی‌مول سیستئین و ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز ( $T_{100}C_{10}$ ). پس از یخ‌گشایی، جنبایی، وضعیت آپوتوزیس، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و آکروزوم مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های بدست آمده در قالب آزمایش فاکتوریل  $3 \times 2$  مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که سیستئین اثری بر فراسنجه‌های حرکتی، وضعیت آپوتوزیس، یکپارچگی غشای آکروزومی و زنده‌مانی اسپرم گاو پس از یخ‌گشایی نداشته ( $P \geq 0.05$ ) و در همه فراسنجه‌های فوق در گروه فاقد تره‌هالوز به‌طور معنی‌داری بهتر از گروه دارای تره‌هالوز بود ( $P \leq 0.05$ ). همچنین، بررسی اثرات متقابل تره‌هالوز و سیستئین در این آزمایش نشان می‌دهد که تیمار  $T_{10}C_{10}$  بیشترین زنده‌مانی ( $P \leq 0.05$ ) و کمترین میزان اسپرم‌های آپوتوزیس شده را داشت. براساس این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که سیستئین اثری بر اسپرم گاو نداشته و تره‌هالوز اثر منفی بر کیفیت اسپرم گاو دارد.

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

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

### مقدمه

استحکام غشا و باروری اسپرم اختلال ایجاد می‌کند و باعث واکنش زود هنگام آکروزومی، از دست دادن محتویات سلولی، کاهش جنبایی و باروری اسپرم می‌شود (۷). تنش اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها رخ می‌دهد و می‌تواند منجر به تخریب، بدشکل شدن و احتمالاً ناباروری اسپرم شود. گزارش شده است که از یک سو تولید رادیکال‌های آزاد به‌وسیله اسپرم، یک فرایند طبیعی فیزیولوژیک است و

بی‌گمان تلقیح مصنوعی یکی از موفق‌ترین فناوری‌های تولید مثلی در صنعت گاو شیری است که به‌عنوان یک ابزار ارزشمند در برنامه‌های ژنتیکی به شمار می‌رود (۱۶). موفقیت در یک برنامه تلقیح مصنوعی به مدیریت صحیح جمع‌آوری، انجماد و یخ‌گشایی بهینه منی و ذخیره‌سازی مناسب آن بستگی دارد (۲). گزارش‌های بسیاری وجود دارد که نشان می‌دهند، فرایند انجماد-یخ‌گشایی منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود که در تحرک،

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

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

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

قرارگرفتند و بررسی‌های ابتدایی نظیر ارزیابی جنبایی به روش چشمی و به وسیله میکروسکوپ نوری و تعیین غلظت به وسیله لام هموسایتومتر روی آن‌ها انجام شد. نمونه‌هایی با غلظت بیشتر از  $1.09 \times 2$  اسپرم در میلی‌لیتر، جنبایی پیش‌رونده بیش‌تر از ۷۵ درصد در هر انزال به‌عنوان منی بهینه در نظر گرفته شد (۱۴). پس از اطمینان از بهینه بودن کیفیت نمونه‌ها، برای از میان برداشتن اثرات فردی، نمونه‌ها با یکدیگر آمیخته شدند و به شش قسمت مساوی (به تعداد تیمارهای آزمایش) تقسیم شدند. رقیق‌سازی تیمارها تا رسیدن به غلظت پایانی اسپرم به میزان  $1.06 \times 100$  اسپرم در هر میلی‌لیتر انجام شد. پس‌ازاین مرحله، لوله‌های آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد قرار داده‌شده و سپس به مدت ۱۵۰ دقیقه داخل کابینت سرد (IMV، فرانسه) در  $4^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد قرارداد شدند. پس از گذشت این زمان، نمونه‌های داخل کابینت سرد به درون پایوت‌های  $0.25$  میلی‌لیتری (IMV، فرانسه) کشیده شدند. در گامه بعد، پایوت‌های پرشده برای انجاماد در داخل دستگاه قابل‌برنامه‌ریزی انجاماد اسپرم (IMV، فرانسه) گذاشته شدند. سپس دما تا رسیدن به  $-10^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد با سرعت منفی  $3^\circ\text{C}$  درجه در هر دقیقه کاهش یافت تا از رسیدن هرگونه شوک دمایی در این مرحله حساس جلوگیری شود و پس‌ازاین دما که مرحله کریستال شدن شروع می‌شود دما با سرعت منفی  $40^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه به  $-110^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد رسید. سپس دما با سرعت منفی  $20^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه به  $-140^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد رسید. پس از رسیدن دما به  $-140^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها به‌سرعت برداشته شدند و بی‌درنگ در درون لیوان‌های پر از ازت قرارگرفته و درنهایت در تانک ازت برای مدت یک ماه ذخیره شدند.

#### ارزیابی اسپرم پس از یخ‌گشایی:

جنبایی: در این پژوهش، یخ‌گشایی در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفته و فراسنجه-

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

#### مواد و روشها

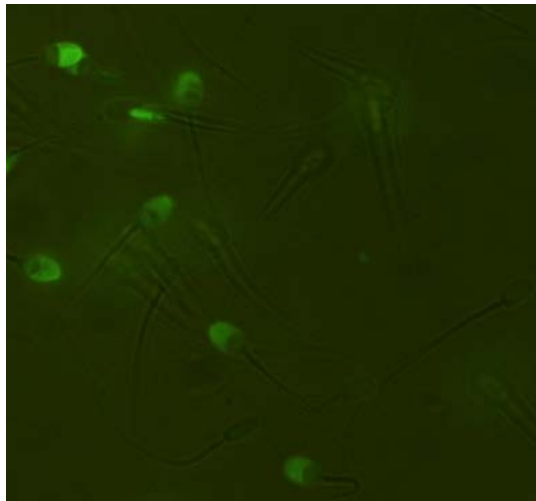
**جمع‌آوری منی:** در این پژوهش از منی سه راس گاو نر هلشتاین با میانگین سنی ۲/۵-۲ سال استفاده شد. گاوهای نر در مرکز تولید و انجاماد اسپرم در فیروزکوه (شرکت زرژن) نگهداری می‌شدند. جمع‌آوری منی با استفاده از واژن مصنوعی از گاوهای نر آموزش‌دیده، به مدت سه هفته و به‌صورت دو بار در هفته (در مجموع ۶ تکرار)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

**محیط انجاماد:** در پژوهش حاضر از رقیق‌کننده تجاری اپتیدیل (IMV، فرانسه) استفاده گردید. طبق راهنمای موجود برای رقیق‌کننده اپتیدیل، میزان  $500$  میلی‌لیتر مایع رقیق‌کننده در داخل  $750$  میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر ریخته شده و سپس به مدت ۵ دقیقه روی شیکر (IMV، فرانسه) با دمای  $50^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد هم زده شد. پس‌ازآن، رقیق‌کننده پایه داخل حمام آب  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. تیمارهای آزمایش به‌صورت ترکیب دو سطح از تره-هالوز (شامل سطوح صفر و  $100$  میلی‌مول) و سه سطح سیستین (شامل سطوح صفر،  $5$  و  $10$  میلی‌مول) در قالب طرح فاکتوریل  $2 \times 3$  [۶ تیمار شامل: ۱- رقیق‌کننده فاقد سیستین و تره‌هالوز (TOC0)، ۲- رقیق‌کننده دارای  $5$  میلی‌مول سیستین و فاقد تره‌هالوز (TOC5)، ۳- رقیق‌کننده کننده دارای  $10$  میلی‌مول سیستین و فاقد تره‌هالوز (TOC10)، ۴- رقیق‌کننده فاقد سیستین و دارای  $100$  میلی‌مول تره‌هالوز (T100C0)، ۵- رقیق‌کننده دارای  $5$  میلی‌مول سیستین و  $100$  میلی‌مول تره‌هالوز (T100C5) و ۶- رقیق‌کننده دارای  $10$  میلی‌مول سیستین و  $100$  میلی‌مول تره‌هالوز (T100C10)] آماده شدند.

**فرآوری و انجاماد منی:** پس از جمع‌آوری منی، نمونه‌ها به‌طور هم‌زمان در حمام خشک  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد

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

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



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

**ارزیابی وضعیت آپوتوزیس (جابجایی فسفاتیدیل**

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

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

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

(SEM) نشان داده شده‌اند. داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS 9.1 (۲۴) و به رویه‌ی Mixed با استفاده از مدل آماری زیر تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین‌های بدست آمده از آزمون توکی استفاده شد.

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

$Y_{ijkl}$ : مشاهدات،  $\mu$ : میانگین جامعه،  $C_i$ : اثر سیستمین ( $i=1, 2, 3$ )، اثر تره‌الوز ( $j=1, 2$ )،  $R_k$ : اثر تکرار ( $k=1, 2, 3, 4, 5, 6$ )،  $CT_{ij}$ : برهمکنش تره‌الوز و سیستمین،  $e_{ijkl}$ : اثرات باقیمانده.

### نتایج

نتایج حاصل از این آزمایش نشان می‌دهد که سیستمین اثری بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم گاو پس از یخ‌گشایی ندارد ( $P \geq 0.05$ ). همچنین، میزان جنبایی پیش‌رونده، سایر فراسنجه‌های حرکتی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و یکپارچگی آکروزوم و زنده‌مانی گروه T0 بیشتر از گروه T100 بودند ( $P \leq 0.01$ ). نتایج گزارش شده حاکی از آن است که اثر متقابل تره‌الوز و سیستمین بر فراسنجه‌های جنبایی، یکپارچگی غشای پلاسمایی یکپارچگی آکروزوم و زنده‌مانی از نظر آماری معنی‌دار نبودند (جدول ۱ و ۲).

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

آنالیز آماری: این آزمایش در قالب طرح آماری فاکتوریل  $2 \times 3$  با شش تکرار انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین حداقل مربعات  $\pm$  انحراف معیار میانگین ( $LS_{mean} \pm$ )

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

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

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

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

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

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

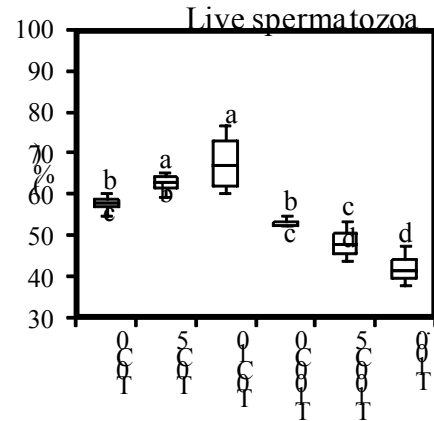
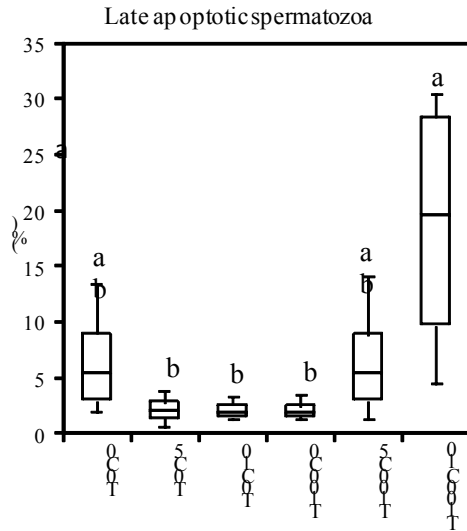
نتایج ارائه‌شده در جدول ۳ نشان می‌دهد که سطوح مختلف سیستین هیچ اثری بر میزان اسپرم‌های زنده (آپوتوز نشده) نداشته است ( $P \geq 0.05$ ). همچنین، افزودن تره‌هالوز باعث کاهش میزان اسپرم‌های زنده و افزایش میزان اسپرم‌ها در مرحله نهایی آپوتوزیس نسبت به گروه فاقد تره‌هالوز شده است ( $P \leq 0.05$ ).

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

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

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

نتایج گزارش‌شده در نمودارهای ۱ و ۲ اثرات متقابل سطوح مختلف تره‌هالوز و سیستین در مورد اسپرم‌های زنده و اسپرم‌های در مرحله نهایی آپوتوزیس را نشان می‌دهد. تیماری که حاوی ۱۰ میلی‌مول سیستین و بدون تره‌هالوز بود (T0C10) بیشترین زنده‌مانی ( $P \leq 0.05$ ) و کمترین میزان اسپرم‌های آپوتوز شده را نشان داده است. براساس این نتایج، نامطلوب‌ترین ترکیب، گروه تیماری



نمودار ۱- اثر متقابل سطوح مختلف تره‌هالوز و سیستین بر میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها. T<sub>0</sub>C<sub>0</sub>: رقیق‌کننده بدون تره‌هالوز و بدون سیستین، T<sub>0</sub>C<sub>5</sub>: رقیق‌کننده بدون تره‌هالوز و حاوی ۵ میلی‌مول سیستین، T<sub>0</sub>C<sub>10</sub>: رقیق‌کننده بدون تره‌هالوز و حاوی ۱۰ میلی‌مول سیستین، T<sub>100</sub>C<sub>0</sub>: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز و بدون سیستین، T<sub>100</sub>C<sub>5</sub>: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز و بدون سیستین، T<sub>100</sub>C<sub>5</sub>: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز و بدون سیستین، T<sub>100</sub>C<sub>10</sub>: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز و ۵ میلی‌مول سیستین و T<sub>100</sub>C<sub>10</sub>: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز و ۱۰ میلی‌مول سیستین.

نمودار ۲- اثر متقابل سطوح مختلف تره‌هالوز و سیستین بر میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها. T<sub>0</sub>C<sub>0</sub>: رقیق‌کننده بدون تره‌هالوز و بدون سیستین، T<sub>0</sub>C<sub>5</sub>: رقیق‌کننده بدون تره‌هالوز و حاوی ۵ میلی‌مول سیستین، T<sub>0</sub>C<sub>10</sub>: رقیق‌کننده بدون تره‌هالوز و حاوی ۱۰ میلی‌مول سیستین، T<sub>100</sub>C<sub>0</sub>: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز و بدون سیستین، T<sub>100</sub>C<sub>5</sub>: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز و ۵ میلی‌مول سیستین، T<sub>100</sub>C<sub>10</sub>: رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز و ۱۰ میلی‌مول سیستین.

مطالعه‌ی اسکواپرز و همکاران (۲۰۰۴) که اثر سرما محافظ-های مختلف را در بهبود ویژگی‌های اسپرم اسب بررسی کردند، مطابقت داشت. آن‌ها گزارش کردند که تره‌هالوز نتوانست تفاوت معنی‌داری در جنبایی کل و پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم اسب، نسبت به گلوکز و رافینوز ایجاد نماید (۲۹). همچنین مدودو و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که تره‌هالوز هیچ اثر مثبتی بر زنده‌مانی، یکپارچگی DNA و سطح ATP اسپرم‌های یخ‌گشایی شده خروس و کبک بربری نداشت (۱۷). به نظر می‌رسد نتایج متفاوت در پژوهش‌های مختلف به دلیل تأثیرگذاری متفاوت تره‌هالوز در گونه‌ها و شرایط مختلف آزمایشی باشد، به گونه‌ای که حتی در دو مطالعه متفاوت که روی قوچ صورت گرفته

## بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز به رقیق‌کننده باعث کاهش شدید فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم می‌شود. این نتایج برخلاف نتایج نجفی و همکاران (۲۰۱۳) در ارتباط با اثر این دی‌ساکارید بر ویژگی‌های اسپرم قوچ بود. آن‌ها گزارش کردند که افزودن ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز به همراه ۵ درصد گلیسرول باعث افزایش معنی‌دار جنبایی کل و پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم‌ها می‌شود (۲۱). همچنین، در مطالعه‌ی دیگر، پژوهشگران میزان بهینه تره‌هالوز در محافظت از اسپرم قوچ را ۵۰ میلی‌مول برآورد کردند (۸). در مقابل، نتایج پژوهش حاضر با

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

تنش اکسیداتیو فرایندی تحت تأثیر رادیکال‌های آزاد است که مهم‌ترین دلیل کاهش باروری اسپرم است. طی فرایند انجماد-یخ‌گشایی مهم‌ترین عواملی که با افزایش میزان رادیکال‌های آزاد در اسپرم باعث القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) و کاهش جنبایی و به دنبال آن کاهش باروری در گاو (۲۷)، گوسفند و بز (۱۹) و اسب (۲۶) می‌شوند عبارتند از: شوک سرمایی ناشی از تشکیل کریستال‌های یخ، ترکیبات رقیق‌کننده، نرخ سردسازی و تنش اسمزی. در این راستا و بر اساس مطالعات صورت گرفته اولین و شناخته‌شده‌ترین راهکار برای مقابله با اثرات منفی رادیکال‌های آزاد، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در رقیق‌کننده است. سیستمین اسیدآمینه‌ای حاوی گوگرد (گروه تیول) است که اثر آنتی‌اکسیدانی آن در اسپرم گاو (۲۳)، خروس (۲۲) و قوچ (۸) بررسی و به اثبات رسیده است. سیستمین می‌تواند با حذف رادیکال‌های آزاد میزان آسیب وارده به سلول اسپرم توسط این رادیکال‌ها را کاهش دهد. سازوکار اصلی این فرایند در گزارش مگنس و همکاران (۱۹۸۰) آورده شده است. ان استیل-ال-سیستئین به‌عنوان پیش‌ساز بیوسنتز سیستمین و گلوپروتئین داخل سلولی است که این ترکیبات نقش اساسی در متابولیسم گلوپروتئین دارند. از طرف دیگر، گلوپروتئین نیز نقش اساسی در فعالیت سوپر اکسید دیسمیوتاز دارد که ترکیب اخیر اصلی‌ترین عامل پاکسازی رادیکال‌های آزاد در اسپرم است (۱۸). در این راستا در پژوهشی، اویسال و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که افزودن سیستمین به رقیق‌کننده اسپرم قوچ باعث افزایش میزان زنده‌مانی آن‌ها شده است (۳۳). در مطالعه‌ای دیگر، پارتیکا و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که افزودن سیستمین به رقیق‌کننده اسپرم خروس باعث بهبود جنبایی کل و پیش‌رونده و زنده‌مانی شده است (۲۲). همچنین، فوناهاشی و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که افزودن ۵ میلی‌مول سیستمین به رقیق‌کننده باعث بهبود میزان زنده-

مانی اسپرم خوک می‌شود. اما برخلاف این مطالعات، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن سیستمین در حضور و یا عدم حضور تره‌هالوز تأثیری بر میزان فراسنجه‌های جنبایی و زنده‌مانی اسپرم گاو نداشت (۱۱). همچنین، در پژوهش حاضر مطالعه اثرات متقابل سیستمین و تره‌هالوز بر فراسنجه‌های اسپرم نشان می‌دهد که ترکیب تیماری که حاوی ۱۰ میلی‌مول سیستمین و بدون تره‌هالوز بود (T0C10) بیشترین زنده‌مانی و کمترین میزان اسپرم‌های آپوپتوز شده را داشته است. براساس نتایج بدست آمده از این پژوهش به نظر می‌رسد افزایش سطوح تره‌هالوز و سیستمین (T100C10) اثر هم‌افزایی نداشته و نسبت به همی تیمارهای دیگر بدترین پاسخ را نشان دادند. در این راستا، آتسهاین و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که افزایش دوز تره‌هالوز از ۲۵ به ۷۵ میلی‌مول باعث کاهش جنبایی اسپرم بز شده در حالی که میزان مالون‌دی‌آلدهاید (MDA) کاهش یافته است. کاهش میزان MDA با افزایش توانایی آنتی‌اکسیدانی اسپرم‌های تیمار شده همراه بود. همچنین، آن‌ها اشاره کردند که افزایش دوزهای سیستمین از صفر به ۱۵ میلی‌مول باعث بهبود جنبایی و توانایی آنتی‌اکسیدانی اسپرم‌های می‌شود (۴). با توجه به این یافته‌ها، به نظر می‌رسد افزایش میزان تره‌هالوز صرف‌نظر از ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی که دارد، باعث بروز اثرات سمی در اسپرم شده و جنبایی و زنده‌مانی آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برخلاف این نتایج، بدر و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که ترکیب تره‌هالوز (۵ میلی‌مول)، سیستمین (۱۰۰ میلی‌مول) و هایپوتائورین (۲۰ میلی‌مول) باعث بهبود جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی آکروزومی و ظرفیت آنتی-اکسیدانی اسپرم گاو میش پس از یخ‌گشایی می‌شود (۵). بنابراین، به نظر می‌رسد برای اثبات برهمکنش دقیق تره-هالوز و سیستمین بر ویژگی‌های اسپرم و با توجه به نتایج کاملاً متفاوت در پژوهش‌های مختلف، مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است.

#### نتیجه‌گیری کلی



اثر منفی بر جنبایی و زنده‌مانی اسپرم گاو دارد. باتوجه به نتایج ضدونقیض در پژوهش‌های گذشته به نظر می‌رسد برای روشن شدن همه زوایا، به مطالعات تکمیلی و بیشتر نیاز باشد.

بر اساس نتایج این پژوهش افزودن سیستئین و تره‌هالوز به رقیق‌کننده اسپرم گاو تأثیر مثبتی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از فرایند انجماد یخ‌گشایی ندارد. همچنین، مشخص شد که افزودن ۱۰۰ میلی‌مول تره‌هالوز می‌تواند

## منابع

- 1- Aboagla, E. M. E., and Terada, T., 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*. 69, PP: 1245-1250.
- 2- Ahmad, E., and Aksoy, M., 2012. Trehalose as a cryoprotective agent for the sperm cells: A Mini Review. *Animal Health, Production and Hygiene*. 1, PP: 123-129.
- 3- Aisen, E., Alvarez, H., Venturino, A., and Garde, J., 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 53, PP: 1053-1061.
- 4- Atessahin, A., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., and Kızıl, M., 2008. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*. 77, PP: 38-44.
- 5- Badr, M., Azab, A., and Rawash, Z., 2014. Effect of trehalose, cysteine and hypotaurine on buffalo bull sperm freezability, ultrastructure changes and fertilizing potentials. *Assiut Veterinary Medicine Journal*. 60, PP: 38-45.
- 6- Bansal, A. K., and Bilaspuri, G., 2010. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*. 2011, PP: 1-8.
- 7- Beconi, M., Francia, C., Mora, N., and Affranchino, M., 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*. 40, PP: 841-851.
- 8- Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varışlı, Ö., Yüce, A., Tekin, N., and Akçay, A., 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*. 67, PP: 1060-1067.
- 9- Emamverdi, M., Zhandi, M., Zare Shahneh, A., Sharafi, M., and Akbari-Sharif, A., 2013. Optimization of Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically Defined Soybean Lecithin-Based Extender. *Reproduction in Domestic Animals*. 48(6), PP: 899-904.
- 10- Fukuhara, R., and Nishikawa, Y., 1973. Effects of pH, sperm concentration, washing and substrate concentration on respiration and motility of goat spermatozoa. *Japanes Journal of Zootechnology Science*. 44, PP: 266-270.
- 11- Funahashi, H., and Sano, T., 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 C. *Theriogenology*. 63, PP: 1605-1616.
- 12- Gonçalves, F., Barretto, L., Arruda, R., Perri, S., and Mingoti, G., 2010. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*. 45, PP: 129-135.
- 13- Gungor, S., Ozturk, C., and Omur, A., 2017. Positive effects of trehalose and cysteine on ram sperm parameters. *Veterinarni Medicina*. 62, PP: 245-252.
- 14- Hu, J. H., Zan, L. S., Zhao, X. L., Li, Q. W., Jiang, Z. L., Li, Y. K., and Li, X., 2010. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. *Journal of Animal Science*. 88, PP: 1657-1662.
- 15- Leboeuf, B., Restall, B., and Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 62, PP: 113-141.
- 16- Liu, Z., Foote, R. H., and Brockett, C. C., 1998. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology*. 37, PP: 219-230.
- 17- Madeddu, M., Berlinguer, F., Pasciu, V., Succu, S., Satta, V., Leoni, G. G., Zinellu, A., Muzzeddu, M., Carru, C., and Naitana, S., 2010. Differences in semen freezability and intracellular ATP content between the rooster (*Gallus gallus domesticus*) and the Barbary partridge (*Alectoris barbara*). *Theriogenology*. 74, PP: 1010-1018.
- 18- Magnes, L., and Li, T., 1980. Isolation and properties of superoxide dismutase from bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 22, PP:

- 965-969.
- 19- Najjian, H. R., Kohram, H., Shahneh, A. Z., Sharafi, M., and Bucak, M. N., 2013. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process. *Cryobiology*. 66, PP: 151-155.
  - 20- Naing, S., Wahid, H., Mohd Azam, K., Rosnina, Y., Zuki, A., Kazhal, S., Bukar, M., Thein, M., Kyaw, T., and San, M., 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 122, PP: 23-28.
  - 21- Najafi, A., Zhandi, M., Towhidi, A., Sharafi, M., Sharif, A. A., Motlagh, M. K., and Martinez-Pastor, F., 2013. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*. 66, PP: 275-282.
  - 22- Partyka, A., Nizański, W., Bajzert, J., Łukaszewicz, E., and Ochota, M., 2013. The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. *Cryobiology*. 67, PP: 132-136.
  - 23- Sariözkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Ulutaş, P. A., and Bilgen, A., 2009. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*. 58, PP: 134-138.
  - 24- SAS Institute (2002). 'SAS proprietary software release 9.0' (SAS Inst. Inc.: Cary, NC).
  - 25- Schulz, M., Risopatrón, J., Matus, G., Pineda, E., Rojas, C., Isachenko, V., Isachenko, E., and Sánchez, R., 2017. Trehalose sustains a higher post-thaw sperm motility than sucrose in vitrified human sperm. *Andrologia*. 2016, PP: 1-3.
  - 26- Seifi-Jamadi, A., Kohram, H., Zareh-Shahne, A., Dehghanizadeh, P., and Ahmad, E., 2016. Effect of various concentrations of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on freezing capacity of Turkman stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. 170, PP: 108-113.
  - 27- Shah, N., Singh, V., Yadav, H. P., Verma, M., Chauhan, D. S., Saxena, A., Yadav, S., and Swain, D. K., 2017. Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Haryana bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 182, PP: 111-122.
  - 28- Sikka, S. C., Rajasekaran, M., and Hellstrom, W. J., 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology*. 16, PP: 464-468.
  - 29- Squires, E. L., Keith, S. L., and Graham, J. K., 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 62, PP: 1056-1065.
  - 30- Storey, B. T., Noiles, E. E., and Thompson, K. A., 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 37, PP: 46-58.
  - 31- Thomas, A., Meyers, S., and Ball, B., 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*. 65, PP: 1531-1550.
  - 32- Thys, M., Nauwynck, H., Maes, D., Hoogewijs, M., Vercauteren, D., Rijsselaere, T., Favoreel, H., and Van Soom, A., 2009. Expression and putative function of fibronectin and its receptor (integrin  $\alpha 5 \beta 1$ ) in male and female gametes during bovine fertilization in vitro. *Reproduction*. 138, PP: 471-482.
  - 33- Uysal, O., and Bucak, M., 2007. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brunensis*. 76, PP: 383-390.
  - 34- Uysal, O., Bucak, M., Yavas, I., and Varisli, O., 2007. Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6, PP: 1362-1366.
  - 35- Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneh, A., Najafi, A., Mahdi Nabi, M., Mohammadi- and Sangcheshmeh, A., 2013. Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? *Small Ruminant Research*. 114, PP: 120-125.
  - 36- Zhu, Z., Fan, X., Pan, Y., Lu, Y., and Zeng, W., 2017. Trehalose improves rabbit sperm quality during cryopreservation. *Cryobiology*. 75, PP: 45-51.

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

Zhandi M.<sup>1</sup>, Nejati-Amiri E.<sup>1</sup>, Nejati-Javaremi A.<sup>1</sup>, Sharafi M.<sup>2</sup>, Seifi-Jamadi A.<sup>1</sup> and Veseghi Dodaran H.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Animal Science Dept., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Poultry Science Dept., Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, I.R. of Iran

<sup>3</sup> Animal science Dept., Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran

### Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of different doses of trehalose and cysteine on bull frozen-thawed sperm quality. In this study, semen samples were collected from three healthy mature Holstein bulls by an artificial vagina. After primary evaluations, the samples were pooled to eliminate individual effects. Then, semen samples were divided into six equal parts and each part was extended and frozen with one of the following extenders. 1) without cysteine and trehalose (T<sub>0</sub>C<sub>0</sub>), 2) Five mM cysteine without trehalose (T<sub>0</sub>C<sub>5</sub>), 3) Ten mM cysteine without trehalose (T<sub>0</sub>C<sub>10</sub>), 4) A hundred mM trehalose without cysteine (T<sub>100</sub>C<sub>0</sub>), 5) Five mM cysteine with 100 mM trehalose (T<sub>100</sub>C<sub>5</sub>), 6) Ten mM cysteine with 100 mM trehalose (T<sub>100</sub>C<sub>10</sub>). Motility parameters, acrosome and membrane integrity and phosphatidylserine translocation assay were evaluated after thawing. All data were analyzed using a 2×3 factorial trail following data collection. The results of this study showed that cysteine had no effect on motion characteristics, apoptotic status, acrosome integrity and viability ( $P \geq 0.05$ ). Also motion parameters, viability, acrosome and membrane integrity, in group without trehalose was higher than group containing that ( $P \leq 0.05$ ). Regarding to interactive effects, the T<sub>0</sub>C<sub>10</sub> group had higher amount of viability ( $P \leq 0.05$ ) and lower necrotic sperms compared to rest of the groups. Based on the results, it can be concluded that cysteine had no remarkable effect and addition of Trehalose could negatively affects post-thawed bull sperm quality.

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