DOI: 10.22092/vj.2020.351807.1762
شماره ۱۲۹ زمستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تاثیر آنتی اکسیدان سیستیامین بر فراسنجه‌های سلولی و کیفیت اسپرم منجمد در قوچ

• **زهرا عبدالهی**
گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
• **رضا مسعودی**
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **نوید داداش‌پور دواچی (نویسنده مسئول)**
بخش تحقیق، پرورش و تولید حیوانات آزمایشگاهی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۸-۰۱-۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: ۲۰-۰۶-۱۳۹۹
Email: navid.d.davachi@gmail.com

چکیده

هدف از اجرای این طرح بهبود بازده باروری اسپرم در گوسفند با افزودن آنتی‌اکسیدان سیستیامین به محیط انجماد بوده است. در این آزمایش اسپرم از ۵ رأس قوچ نژاد زندی جمع‌آوری به رقیق‌کننده‌های حاوی صفر، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌مولار سیستیامین اضافه و سپس منجمد شدند. در مرحله ارزیابی آزمایشگاهی کیفیت اسپرم، اسپرم‌های منجمد مورد ارزیابی آزمایشگاهی قرار گرفتند و فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی، سلامت غشا، مورفولوژی، سلامت آکروزوم، فعالیت میتوکندری و میزان لیپید پراکسیداسیون مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استفاده از ۲ میلی مولار سیستیامین منجر به بهبود جنبایی کل، جنبایی پیشرونده، سلامت غشا، فعالیت میتوکندری، سلامت آکروزوم، زنده مانی و کاهش آپوپتوزیس و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در اسپرم منجمد قوچ پس از یخگشایی شد. استفاده از تیمار ۸ میلی مولار سیستیامین منجر به کاهش کیفیت اسپرم پس از یخگشایی شد و استفاده از آنتی اکسیدان سیستیامین تاثیری بر مورفولوژی اسپرم پس از فرایند انجماد-یخگشایی نداشت. در نتیجه استفاده از تیمار ۲ میلی مولار آنتی اکسیدان سیستیامین می‌تواند راهکاری مناسب برای بهبود بازده اسپرم قوچ پس از فرایند انجماد-یخگشایی باشد.

کلمات کلیدی: انجماد اسپرم، ارزیابی اسپرم، سیستیامین، قوچ

Veterinary Researches & Biological Products No 129 pp: 83-88

Effect of cysteamine antioxidant on cellular parameters and frozen sperm quality in ram

By: Abdollahi, Z., Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Masoudi, R., Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Dadashpour Davachi, N., (Corresponding Author) Department of Research, Breeding and Production of Laboratory Animals, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2020-04-06 Accepted: 2020-09-10

Email: navid.d.davachi@gmail.com

The aim of this study was improvement of ram frozen semen efficiency using addition of cysteamine antioxidant to freezing medium. In this experiment, semen samples were collected from five Zandi rams and add to the extender containing 0, 1, 2, 4 and 8 mM cysteamine. In sperm quality evaluation, sperm samples were evaluated and motion parameters, membrane integrity, morphology, acrosome integrity, mitochondria activity, viability and lipid peroxidation were assessed. The results showed using 2 mM cysteamine resulted in improving of sperm total and progressive motility, membrane integrity, mitochondria activity, acrosome integrity, and viability as well as reduction of apoptosis rate and lipid peroxidation. Using the treatment of 8 mM cysteamine caused to reduction of sperm quality after thawing and the antioxidant did not have any effect on sperm morphology. In conclusion, using 2 mM cysteamine in freezing extender could be a helpful strategy for improvement of ram sperm quality after cryopreservation.

Key words: Sperm freezing, Sperm evaluation, Cysteamine, Ram

مقدمه

علاوه بر قدمت تاریخی پرورش گوسفند به علت عدم بازده تولید مثلی و عدم استفاده بهینه از تلقیح مصنوعی و بازده پایین اسپرم منجمد در صنعت پرورش گوسفند، صرفه اقتصادی خوبی از این صنعت به دست نیامده است. تلقیح مصنوعی تکنیکی برای اصلاح ژنتیکی حیوانات است زیرا در آن، تنها با چند رأس حیوان نر انتخابی، می‌توان اسپرم مورد نیاز برای تلقیح هزاران ماده را در سال فراهم نمود. از مزایای سرد کردن و منجمد کردن اسپرم می‌توان به بارور نمودن هم‌زمان تعداد زیادی ماده با استفاده از اسپرم نرهای با نژاد برتر، از میان رفتن هزینه‌های مربوط به نگه‌داری نرها، افزایش مخزن ژنی، انتقال آسان مایع منی از مراکز تولید و جمع‌آوری به دورترین مکان‌ها اشاره نمود (۱۶). هم‌چنین می‌توان به ذخیره‌ی ژن‌ها برای استفاده‌ی آینده و تضمین در مقابل از دست دادن نرهای منحصر به فرد و جلوگیری از انقراض نسل نژادهای خاص اشاره نمود. افزون بر این تلقیح مصنوعی جایگزین اقتصادی و مقرون به صرفه‌ای برای تلقیح طبیعی است بدون این که خطرات و آسیب‌های نگه‌داری دام نر را به همراه داشته باشد. انجماد اسپرم با مشکلاتی از جمله کاهش زنده‌مانی و تحرک اسپرم‌ها بعد از فرایند انجماد- یخ گشایی مواجه است. زنده مانی و جنبایی اسپرم پس از انجماد- یخ‌گشایی تحت تاثیر عوامل متعددی از قبیل کیفیت منی، نوع و غلظت اجزای موجود در محیط انجماد می‌باشد (۲۱). بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان در محیط انجماد مناسب منی که بتواند از اسپرم‌ها در برابر آسیب‌های انجماد- یخ‌گشایی محافظت کند و زنده‌مانی و جنبایی اسپرم را بعد از انجماد- یخ‌گشایی حفظ کند، گام مهمی در جهت استفاده از تلقیح مصنوعی است. همچنین استفاده از منبع آنتی‌اکسیدانی در رقیق‌کننده انجماد از راهکارهای بهبود کیفیت اسپرم پیش از انجماد می باشد.

تیول‌ها مانند سیستئامین و گلوتاتیون گروه بزرگی از آنتی اکسیدان‌ها هستند. سیستئامین در پاکسازی رادیکال‌های هیدرکسیل بسیار موثر است و همچنین موجب افزایش تولید گلوتاتیون می‌گردد که می‌تواند اثرات مثبت خود را از راه گلوتاتیون اعمال کند. سیستئامین سبب کاهش سیستین به سیستئین می شود و سنتز گلوتاتیون را افزایش می‌دهد. با توجه به اهمیت حضور سیستئامین در مقابله با رادیکال‌های آزاد و اثر نامطلوب رادیکال‌های آزاد بر غشای اسپرم که منجر به کاهش باروری اسپرم می‌شود، به نظر می رسد که با افزودن میزان مطلوب سیستئامین به رقیق کننده انجماد اسپرم بتوان گامی در جهت بهبود کیفیت و باروری اسپرم قوچ برداشت (۲۵).

هدف از این مطالعه بهبود بازده اسپرم منجمد قوچ با استفاده از افزودن منبع آنتی‌اکسیدانی سیستیامین به رقیق کننده انجماد اسپرم می‌باشد تا بدین طریق بتوان کیفیت اسپرم قوچ را پس از فرآیند انجماد-یخگشایی حفظ نمود.

مواد و روش‌کار

پنج رأس قوچ نژاد زندی سه تا چهار ساله با میانگین وزنی ۲/۵ ± ۷۰ کیلوگرم برای این مطالعه انتخاب شدند. جیره پایه شامل ۸۰۰ گرم جو، ۵۰۰ گرم یونجه، ۶۰۰ گرم کاه، ۲۵۰ گرم سبوس و ویتامین E بود. سپس قوچها برای اسپرم دهی عادت دهی شده و جمع آوری منی دوبار در هفته با استفاده از واژن مصنوعی انجام شد. اسپرم از قوچها جمع‌آوری و به رقیق کننده حاوی صفر،۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌مولار سیستیامین اضافه و سپس منجمد شدند. رقیق کننده بر پایه‌ی تریس حاوی (۲/۷ گرم تریس، ۱ گرم فروکتوز، ۱/۴ گرم سیتریک اسید در ۱۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر)، هفت درصد گلیسرول و با PH=۷ و اسمولاریته ۳۲۰ میلی اسمول، به عنوان رقیق‌کننده پایه منی استفاده شد. سپس به رقیق کننده ۱ درصد (وزن/حجم) لسیتین سویا اضافه شد.

بلافاصله پس از جمع‌آوری منی، نمونه‌ها داخل بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌های منی گرفته شده در هر نوبت با هدف از میان برداشتن اثرات فردی با یکدیگر آمیخته شدند. قبل از مخلوط شدن نمونه‌های اسپرم، ارزیابی‌های اولیه روی آن‌ها صورت گرفت و فقط از نمونه‌هایی برای انجماد استفاده شد که دارای اسپرم‌های با جنبایی بیش از ۷۰ درصد بودند. رقیق‌سازی به نسبت یک حجم منی و ۱۰ حجم محیط انجمادی در دمای اتاق انجام شد طوری که غلظت نهایی اسپرم ۴۰۰ میلیون در هر میلی لیتر باشد (۱۰۰ میلیون اسپرم در هر استرا ۰/۲۵). تعداد اسپرم در انزال با استفاده از لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری شمارش شد.

پس از فرآیند انجماد-ذوب فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل پارامترهای حرکتی، زنده مانی، سلامت غشا، مورفولوژی طبیعی، یکپارچگی آکروزوم، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم و نیز درصد میتوکندری‌های فعال اسپرم ارزیابی شد.

به منظور بررسی ویژگی‌های جنبایی اسپرم پس از انجماد-ذوب در گروه‌های مختلف تیماری، نرم افزار کامپیوتری آنالیز جنبایی اسپرم مورد استفاده قرار گرفت. فراسنجه‌ها شامل موارد زیر است:

جنبایی کل (TM): درصد اسپرم‌های جنبا؛ جنبایی پیش‌رونده (PM): درصد اسپرم‌های دارای جنبایی رو به جلو؛ VCL: سرعت در مسیر منحنی؛ ALH: دامنه جابه‌جایی سر اسپرم؛ VAP: میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر؛ VSL: سرعت در مسیر مستقیم.

در این مطالعه برای بررسی فعالیت و یکپارچگی غشاء از تست تورم هیپواسموتیک HOST استفاده شد. تست هاست که مطابق با روش Revell و همکاران (۱۹۹۴) می‌باشد، بر اساس اسمولاریتی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. در این روش اسپرم با دم گره خورده به عنوان اسپرم دارای غشای سالم و اسپرم با دم گره نخورده به عنوان اسپرم با غشای آسیب دیده دسته بندی می‌شود (۱۹). تعداد ۳۰۰ اسپرم شمارش‌شده و سپس درصد اسپرم‌های با غشاء سالم و آسیب‌دیده محاسبه شد.

برای بررسی مورفولوژی اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد (۲۰). برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی، حداقل ۳ قطره از هر نمونه (۳۰ میکرولیتر) به میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک اضافه شد. یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط لامل پوشانده شد. توسط میکروسکوپ معکوس فازکنتراست و با بزرگنمایی ۴۰۰× تعداد ۳۰۰ اسپرم شمارش و به صورت درصد کل اسپرم‌های غیر طبیعی (آکروزوم غیرطبیعی، سر جدا شده، نقص‌های دم و قطعه میانی اسپرم) به کل اسپرم شمارش و گزارش شد.

برای اندازه‌گیری یکپارچگی آکروزم از رنگ فلورسنت PSA استفاده شد (۱۵). تعداد ۱۰۰ اسپرم در هر اسلاید با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus ; ۵۱BX) با بزرگنمایی ۴۰۰ ارزیابی شد. اسپرم‌های با سر سبز به عنوان آکروزوم دست نخورده و سالم و اسپرم‌های با کمربند سبز به عنوان آکروزم تخریب شده در نظر گرفته شد.

در این تحقیق فعالیت میتوکندریایی به وسیله رودامین-۱۲۳ اندازه‌گیری شد (۱۵) رودامین-۱۲۳ یک پروب فلورسنت کاتیونی است که با غشای داخلی میتوکندری باند می‌شود. پس از آن میزان فعالیت میتوکندریایی نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شدند. در نمودار دستگاه فلوسایتومتر نمونه رودامین مثبت و PI منفی (PI /+R۱۲۳-) باشد، به عنوان نمونه دارای میتوکندری فعال و نمونه رودامین مثبت و PI مثبت (PI/+R۱۲۳+) باشد به عنوان میتوکندری غیر فعال در نظر گرفته شد.

در این آزمایش از فسفاتیدیل سرین، به عنوان یک نشانگر برای تشخیص زنده بودن یا آپوپتوزیس اسپرم استفاده شد. حضور این نشانگر در سطح غشای پلاسمایی اسپرم، از نشانه اولیه آپوپتوزیس است که در حالت طبیعی یا حالت زنده اسپرم در داخل سیتوپلاسم اسپرم یافت می‌شود (۹). پس از آن میزان جابه‌جایی فسفاتیدیل‌سرین غشای اسپرم در نمونه‌ها به وسیله فلوسایتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. در نمودار دستگاه فلوسایتومتر نمونه‌های آنکسین منفی و PI منفی (PI/ -A-) به عنوان اسپرم زنده تلقی شدند. نمونه‌های آنکسین مثبت و PI منفی (PI/+A-) زنده ولی دچار آپوپتوزیس اولیه بودند. نمونه‌های آنکسین مثبت و PI مثبت (PI/+A+) به عنوان اسپرم مرده و دچار آپوپتوزیس ثانویه شده تلقی شدند و آنکسین منفی و PI مثبت (PI/-A+) به عنوان اسپرم نکروز شده تلقی در نظر گرفته شدند.

اندازه‌گیری غلظت MDA با تیوباربیوتوریک اسید (TBA) یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدها است (۱۷). یک مولکول MDA با دو مولکول TBA واکنش می‌دهد و فرآورده این واکنش، مولکولی صورتی رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد. جذب نوری نمونه‌های مختلف یادداشت شدند و در پایان، نتایج حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتری در فرمول منحنی استاندارد گذاشته و غلظت MDA (نانو مول در میلی‌لیتر منی) محاسبه شد.

ارزیابی کیفیت اسپرم در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد.

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

Y: متغیر وابسته (مشاهدات)، T: اثر غلظت تیمار سیستیامین، e: اثر عوامل باقیمانده

نتایج و بحث

جنبایی و فراسنجه‌های حرکتی اسپرم پس از انجماد-یخگشایی در رقیق کننده که حاوی دوزهای مختلف آنتی اکسیدان سیستیامین بوده‌اند در

جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج جنبایی و فراسنجه‌های حرکتی نشان داد که گروه دریافت کننده ۲ میلی‌مولار سیستیامین بیشترین میزان (P<۰,۰۵) جنبایی و جنبایی پیشرونده را نشان داده است. در مورد سایر فراسنجه‌های حرکتی اختلافی میان گروه‌های تیماری وجود نداشت. در این مطالعه استفاده از سیستیامین منجر به بهبود جنبایی کل و جنبایی پیشرونده شده که این بهبود می‌تواند در اثر افزایش تولید گلوتاتیون در اثر این تیمار و در نتیجه‌ی اثرات مثبت گلوتاتیون تولیدی باشد که منجر به همخوانی این نتایج با نتایج مطالعات انجام شده در انسان (۱۱)، گاو (۵) و خوک (۱۰) می‌گردد. شاید بازده بالاتر اسپرم در گروه‌های دریافت کننده سیستیامین به دلیل حضور گروه‌های تیول سطحی باشد که نقش مهمی را در تحرک اسپرم دارا می‌باشند (۶).

نتایج مربوط به سلامت غشا، مورفولوژی اسپرم، فعالیت میتوکندری، سلامت آکروزوم، زنده مانی، آپوپتوزیس و میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم قوچ پس از یخگشایی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج تست هاست نشان داد که در مورد سلامت غشا پس از یخگشایی بیشترین درصد اسپرم با غشا سالم مربوط به گروه دریافت کننده ۲ میلی‌مولار سیستیامین بوده و استفاده از ۸ میلی مولار سیستیامین کمترین میزان سلامت غشا را نشان داده است.(P<۰,۰۵) نتایج این قسمت با نتایج مطالعات انجام شده در گاو (۲۶) همخوانی داشت ولی این نتایج مغایر با نتایج انجام شده در بز (۲۰) بوده است.

نتایج حاصل از تست هانکوک نشان داد که استفاده از دوزهای مختلف سیستیامین تأثیری بر میزان اسپرم با مورفولوژی غیر نرمال نداشته است. مورفولوژی اسپرم و تغییرات آن بیشتر در سطح اسپرماتوژنز انجام می‌شود و و کمتر دیده شده که تکنیک‌های فراوری روی آن تاثیرگذار باشند (۷). یافته‌های این قسمت با نتایج ارایه شده در گاو (۲۵)، بز (۲۰) و خروس (۱۳) همخوانی داشته است که بر طبق گزارش این محققین فرایند انجماد تاثیری بر مورفولوژی اسپرم طی فرایند انجماد-یخگشایی ندارد.

نتایج فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی با رودامین-۱۲۳ نشان داد که در مورد فعالیت میتوکندری پس از یخگشایی بیشترین درصد اسپرم با میتوکندری فعال مربوط به گروه دریافت کننده ۲ میلی‌مولار سیستیامین بوده و استفاده از ۸ میلی‌مولار سیستیامین کمترین میزان میتوکندری فعال را نشان داده است.(P<۰,۰۵) میتوکندری ارگان اصلی برای تولید انرژی است که تولید آن برای حرکت اسپرم ضروری است پس فعالیت صحیح میتوکندری برای حرکت اسپرم و رسیدن آن به محل لقاح ضروری است (۴). بنابراین ارزیابی فعالیت میتوکندری شاخص مناسبی برای تخمین باروری اسپرم است. نرخ اسپرم با میتوکندری سالم دارای همبستگی مثبتی با زنده مانی (۱۲) و باروری (۴) می‌باشد.

نتایج تست سلامت آکروزوم نشان داد که پس از یخگشایی بیشترین درصد اسپرم با آکروزوم سالم مربوط به گروه دریافت کننده ۲ میلی‌مولار سیستیامین بوده و استفاده از ۸ میلی‌مولار سیستیامین کمترین میزان سلامت آکروزوم را نشان داده است.(P<۰,۰۵) کاپاسیته شدن اسپرم و ظرفیت پذیری دو مرحله کلیدی در باروری اسپرم می‌باشد. وجود آکروزوم سالم برای انجام واکنش آکروزوم ضروری می‌باشد (۳) بنابراین ارزیابی آکروزوم در راستای ارزیابی قدرت باروری بسیار مهم می‌باشد. استفاده از سیستیامین سلامت آکروزوم بیشتری را نسبت به سایر تیمارها نشان داد که این پدیده نشان می دهد استفاده از این آنتی اکسیدان می‌تواند در راستای حفظ فعالیت و سلامت آکروزوم مفید باشد. افزایش گلوتاتیون تولیدی در اثر تیمار سیستیامین سبب این بهبود بوده است که در مطالعات دیگر نیز به آن اشاره شده است. نتایج این مطالعه تایید کننده نتایج قبلی در اسپرم بز (۲۳) است که در آن استفاده از گلوتاتیون منجر به کاهش نرخ خسارت به آکروزوم شد. نتایج مشابهی نیز در گونه‌های دیگر نظیر گاو (۲۴)، گاومیش (۱) و خوک (۸) گزارش شده است. با بررسی نتایج فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی آنکسین-۵ در مورد زنده‌مانی

جدول ۱- اثر تیمارهای سیستیامین بر فراسنجه های حرکتی اسپرم قوچ پس از فرایند انجماد-یخگشایی

تیمارها	Cys۰	Cys ۱	Cys ۲	Cys ۴	Cys ۸	SEM
TM (٪)	۳۸/۷^{b}	۳۹/۳^{b}	۴۲/۲^{a}	۳۷/۵^{b}	۳۲/۰^{c}	۱/۳
PM (٪)	۱۹/۱^{b}	۱۹/۸^{b}	۲۲/۰^{a}	۱۸/۵^{b}	۱۴/۴^{c}	۱/۰
VAP (µm/s)	۸۸/۸	۸۷/۶	۹۰/۵	۸۶/۲	۸۵/۸	۲/۵
VSL (µm/s)	۷۲/۹	۷۳/۷	۷۵/۲	۷۲/۵	۷۲/۰	۱/۵
VCL (µm/s)	۱۴۲/۴	۱۴۱/۱	۱۴۵/۶	۱۴۳/۸	۱۴۱/۱	۲/۰
ALH (µm)	۷/۸	۷/۹	۸/۸	۷/۵	۷/۰	۱/۰

حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ردیف است (P<۰/۰۵).

و میزان پیشرفت آپوپتوزیس گروه دریافت‌کننده ۲ میلی‌مولار سیستیامین بیشترین درصد اسپرم زنده و کمترین درصد اسپرم مرده را نشان دادندکه این اختلاف نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار بوده و گروه دریافت‌کننده ۸ میلی‌مولار سیستیامین کمترین مقدار اسپرم زنده و بیشترین مقدار اسپرم مرده را نشان داد (P<۰,۰۵). استفاده از دوز مناسب سیستیامین در رقیق کننده انجماد اسپرم منجر به بهبود زنده مانی و کاهش نرخ آپوپتوزیس و نکروزیس می‌شود (۲۴). در فرایند ذخیره انجمادی افزایشی در سطوح رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود که تولید آنیون های سوپراکسید را افزایش می‌دهد که این فرایند منجر به کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاهش مقدار گلوتاتیون می‌گردد که نتیجه این فرآیند ها کاهش قدرت باروری است. سیستیامین با افزایش تولید گلوتاتیون سبب حفظ قدرت باروری از طریق پاکسازی رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۱۴) که بصورت مانعی در برابر پراکسیداسیون لیپیدهاست. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعات دیگر در این زمینه همخوانی داشته است (۲).

در هنگام استفاده از سیستیامین در رقیق کننده انجماد اسپرم کمترین میزان تولید مالون دی آلدهاید که شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی می‌باشد مربوط به گروه‌های دریافت کننده ۲ میلی مولار سیستیامین بوده است که اختلاف آن‌ها نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار بوده است (P<۰,۰۵) و در گروه دریافت‌کننده ۸ میلی مولار سیستیامین بیشترین مقدار تولید مالون دی آلدهاید دیده شد که بیانگر اثر منفی دوز بالای این آنتی‌اکسیدان می‌باشد. به نظر می رسد غلظت بالای سیستیامین می‌تواند سبب افزایش نامطلوب سیالیت غشا شود که این امر اسپرم را نسبت به پراکسیداسیون لیپیدها حساس می‌کند و دارای اثرات زیان بار بر روی اسپرم است. همچنین ممکن است سطوح بالای سیستیامین با افزایش نامطلوب گلوتاتیون هومئوستازی کلسیم را تغییر دهد (۲۲) مضاف بر اینکه غلظت بالای کلسیم اسپرم را نسبت به آسیب‌های انجمادی حساس می‌کند (۱۸).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که آنتی اکسیدان سیستیامین دارای اثرات محافظتی مناسبی برای انجماد اسپرم می‌باشد. این ترکیب به واسطه تولید گلوتاتیون دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی در سطوح مناسب است به طوری‌که پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم کاهش پیدا کرد و همزمان شاخص‌ها و فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از انجماد بهبود یافت. محیط انجماد حاوی دو میلی‌مولار سیستیامین باعث افزایش جنبایی کل، جنبایی پیش رونده، یکپارچگی غشای پلاسمایی، زنده مانی و سایر فراسنجه‌های سلولی اسپرم قوچ پس فرایند از انجماد-یخگشایی شد.

منابع مورد استفاده

1- Ansari, M.S., B.A. Rakha, N. Ullah, S.M.H. Andrabi and et al. 2010. Effect of exogenous glutathione in extender on the freezability of Nili-Ravi buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa. *Animal Science Reports*. 28: 235–244.

2- Armstrong, J.S., M. Rajasekaran, W. Chamulitrat, P. Gatti and et al. 1999. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 869–880.

3- Bailey, J.L., J.F. Bilodeau and N. Cormier. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*. 21: 1–7.

4- Bartoov, B., F. Eltes, R. Weissenberg and B. Lunenfeld. 1980. Morphological characterization of abnormal human spermatozoa

جدول ۲- اثر تیمارهای سیستیامین بر فراسنجه های کیفی اسپرم قوچ پس از فرایند انجماد-یخگشایی

تیمارها	Cys۰	Cys ۱	Cys ۲	Cys ۴	Cys ۸	SEM
سلامت غشا	۳۶/۵ b	۳۷/۰ b	۴۰/۸ a	۳۶/۵ b	۳۰/۵ c	۱/۶
مورفولوژی غیرنرمال	۱۵/۵	۱۴/۸	۱۴/۰	۱۴/۸	۱۵/۹	۱/۱
فعالیت میتوکندری	۴۹/۲ b	۵۱/۰ b	۵۵/۵ a	۵۰/۶ b	۴۰/۶ c	۲/۲
سلامت آکروزوم	۵۸/۵ b	۶۰/۶ b	۶۴/۲ a	۵۷/۹ b	۵۴/۰ c	۱/۴
زنده مانی	۴۶/۳ b	۴۷/۵ b	۵۲/۰ a	۴۵/۵ b	۴۰/۲ c	۱/۵
آپوپتوزیس	۵۳/۷ b	۵۲/۵ b	۴۸/۰ a	۵۴/۵ b	۵۹/۸ c	۱/۵
پراکسیداسیون لیپیدی	۴/۵ b	۴/۴ b	۴/۰ a	۴/۶ b	۴/۹ c	۰/۱

حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ردیف است (P<۰/۰۵).

using transmission electron microscopy. *Archives of Andrology*. 5: 305–322.

5- Bilodeau, J.F., S. Blanchette, C. Gagnon and M.A. Sirard. 2001. Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*. 56: 275–286.

6- Bucak, M.N. and N. Tekin. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*. 73: 103–108.

7- Chenoweth P.J. 2005. Genetic sperm defects. *Theriogenology*. 457–468.

8- Estrada, E., J.E. Rodríguez-Gil, L.G. Rocha, S. Balasch and et al. 2014. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*. 2: 88–99.

9- Fattah, A., M. Sharafi, R. Masoudi, A. Shahverdi and et al. 2017. L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*. 74: 148–153.

10- Gadea, J., D. Gumbao, C. Matás and R. Romar. 2005. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation, *Journal of Andrology*. 26: 749–756.

11- Gadea, J., M. Molla, E. Selles, M.A. Marco and et al. 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.

12- Gravance, C.G., D.L. Garner, M.G. Miller and T. Berger. 2000. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reproductive Toxicology*. 15: 5–10.

13- Lotfi, S., M. Mehri, M. Sharafi and R. Masoudi. 2017. Hyaluronic acid improves frozen-thawed sperm quality and fertility potential in rooster. *Animal Reproduction Science*. 184: 204–210.

14- Lu, S.C. 2013. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1830: 3143–53.

15- Masoudi, R., M. Sharafi, A. Zareh Shahneh, A. Towhidi and et al. 2016. Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin. *Cryobiology*. 73: 69–72.

16- Masoudi, R., M. Sharafi, A. Zareh Shahneh, A. Towhidi and et al. 2016. Effect of dietary fish oil supplementation on ram semen freeze ability and fertility using soybean lecithin– and egg yolk–based extenders. *Theriogenology*. 86: 1583–1588.

17- Masoudi, R., A. Zare Shahneh, A. Towhidi and et al. 2017. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen *Cryobiology*. 74: 77–80.

18- Meseguer, M., N. Garrido, J.A. Martínez-Conejero, C. Simón and et al. 2004. Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing, *Fertility and Sterility*. 81: 588–594.

19- Revell, S.G. and R.A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*. 36: 77–86.

20- Salmani, H., M.M. Nabi, H. Vaseghi-Dodaran, M.B. Rahman and et al. 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Research*. 112: 123–127.

21- Sharafi, M., M. Forouzanfar, S.M. Hosseini, M. Hajian and et al. 2009. In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation. *International Journal of Fertility and Sterility*. 3: 149–152.

22- Lector, C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*. 1: 78-86.

23- Sinha, M.P. 1996. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen, *Animal Reproduction Science*. 41: 237–243.

24- radaioli, G., T. Noro, L. Sylla and M. Monaci. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology*. 67: 1249–1255.

25- Swami, D.S., Kumar, P., Malik, R.K., Saini, M., Kumar, D. and Jan, M.H., 2017. Cysteamine supplementation revealed detrimental effect on cryosurvival of buffalo sperm based on computer-assisted semen analysis and oxidative parameters. *Animal reproduction science*. 177: 56–64.

26- Tuncer, P.B., M.N. Bucak, S. Büyükleblebici, S. Sariözkan and et al. 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*. 61: 303–307.