DOI: 10.22092/VJ.2023.362454.2072
شماره ۱۴۲ بهار ۱۴۰۳
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

مقاله کامل

ارزیابی استفاده از مکمل روتین در مایع منی گاو سیمنتال: بررسی شاخص های تحرک، کیفیت اسپرم

• **امیر فرجامی**
گروه مامایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• **علی سلیمان زاده(نویسنده مسئول)**
گروه مامایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• **اسماعیل آین**
گروه مامایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۰-۰۳-۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۵-۰۶-۱۴۰۲
تاریخ بازنگری : ۱۴-۰۶-۱۴۰۲ تاریخ انتشار: ۱۹-۰۱-۱۴۰۳
Emali: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

چکیده

این مطالعه به بررسی اثرات انجماد و افزودن روتین به رقیق کننده مایع منی گاو سمینتال انجام پذیرفته است. هدف از این مطالعه بررسی پارامترهای جنبایی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، قدرت زنده ماندن و آسیب DNA اسپرم و میزان مالون دی آلدئید و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی اسپرم، جهت تشخیص غلظت موثر روتین برای انجماد مایع منی گاو سمینتال می‌باشد. روتین در پنج غلظت ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌مولار، به ترتیب به رقیق کننده انجماد اسپرم گاو سمینتال اضافه شد. نتایج بدست آمده نشان داد که افزودن ۰/۴ و ۰/۶ میلی مولار روتین به طور معنی‌داری باعث بهبود شاخص‌های جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم، قدرت زنده‌مانی اسپرم، یکپارچگی غشای پلاسمایی، ظرفیت تام آنتی اکسیدانی و کاهش آسیب DNA اسپرم نسبت به گروه کنترل شد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزودن ۰/۴ و ۰/۶ میلی مولار روتین به محیط انجماد اسپرم گاو سیمنتال با افزایش بهبود کیفیت اسپرم بعد از فرایند انجماد، احتمالا ممکن است باعث بالارفتن نرخ باروری بعد از تلقیح مصنوعی با اسپرم منجمد شود.

کلمات کلیدی: روتین، شاخص های تحرک، کیفیت اسپرم، گاو سیمنتال

Veterinary Research & Biological Products No 142 pp: 79-88

Evaluation of co-supplementation of Rutin in Simmental bull semen extender: Evaluation of kinetic parameters, sperm quality

By: Farjami, A., Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Soleimanzadeh, A., (Corresponding Author) Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. and Ayen, E., Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: 2023-05-31 **Accepted: 2023-09-06**

Revised:2023-09-05 **Published: 2024-04-07**

Emali: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

This study investigates the effects of cryopreservation and supplementation of Simmental bull's semen with Rutin. Therefore, this study aimed to assess motility parameters, sperm viability, oxidative stress parameters, and DNA damage to detect the optimum concentrations of Rutin for Simmental bull semen cryopreservation. Five concentrations of Rutin with 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0 mM were added to the freezing extender of Simmental bull sperm, respectively. The obtained results showed that the addition of 0.4 and 0.6 mM of rutin significantly improves total motility, progressive motility, plasma membrane integrity, total antioxidant capacity, reducing damage to sperm DNA, sperm viability and motility characteristics, except STR, compared to the control group. In conclusion, supplementation with Rutin in cryopreservation medium protects Simmental bull sperm against ROS attack by enhancing the antioxidative defense. Therefore, we conclude that the addition of 0.4 and 0.6 mM rutin to the Simmental bovine sperm cryopreservation extender can improve post-freezing sperm quality and may improve conception rates after artificial insemination with frozen sperm.

Keywords: *Rutin, kinetic parameters, sperm quality, Simmental bull*

مقدمه

سیستم تولیدمثل، از آنجایی‌که منجر به حفظ بقای نسل بشر و گونه‌های مختلف جانوران و سایر جانداران می‌شود، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد و نارسایی در هر یک از بخش‌های آن، به نحوی در تولید، تکامل و عملکرد اسپرم‌ها موثر می‌باشند و رسیدن به این هدف را غیرممکن می‌سازد. با توجه به گسترش تلقیح مصنوعی اسپرم در گونه‌های مختلف دامی، شناسایی روش‌ها و موادی که بتوانند اسپرم‌ها را با بهترین کیفیت حفظ نمایند مورد مطالعه بسیاری از محققین قرار گرفته است (۱۸). تلقیح مصنوعی، ابزاری ارزشمند برای گسترش ژن‌های مطلوبِ گاوهای نر منتخب در جمعیت‌های گاوهای ماده است (۳۸).

تولید و نگهداری اسپرم بصورت منجمد شامل مجموعه‌ای از فرایندهای مختلف شامل رقیق‌سازی اسپرم در رقیق‌کننده مناسب، فرایند انجماد و ارزیابی‌های بعد از یخزدایی می‌باشد. حین فرایندهای انجماد و خنک کردن، اسپرم نسبت به فشار اسمزی نامتعادل، دناتوراسیون پروتئینی، اسیدوز سلولی، از دست رفتن انرژی، تخریب غشایی، کریستالیزاسیون بدنه سلولی، از بین رفتن ثبات اسکلت سلولی و ایجاد رادیکال‌های آزاد یا گونه‌های فعال اکسیژن حساس هستند (۸).

مشکل اسپرم منجمد، کیفیت پایین اسپرماتوزوآ بعد از فرایند یخزدایی است و این مشکل با تغییرات کیفیت عملکردی و فراساختاری اسپرماتوزوآ مشخص می‌شود و عدم باروری تخمک را به همراه دارد (۱). این مسئله به خاطر حساسیت اسیدهای چرب غیراشباع غشای پلاسمایی به دماهای پایین حین انجماد رخ می‌دهد (۴۱). همچنین می‌توان گفت که یکی از علل کاهش باروری ناشی از تلقیح مصنوعی اسپرم‌های منجمد، استرس اکسیداتیوی است که در نتیجه عدم توازن بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و دفاع آنتی اکسیدانی ایجاد می‌شود (۱۹). در مطالعات مختلف نشان داده شده است که سرد کردن و انجماد سبب اثرات اکسیداتیو قوی در اسپرم می‌شود و با تولید گونه‌های اکسیژن فعال، باعث پراکسیداسیون لیپیدی در غشاء اسپرم و انواع تغییرات فیزیکی و شیمیایی سلول‌های اسپرم می‌شود و در نتیجه کاهش کیفیت اسپرم‌ها بعد از فرایند انجماد-یخ گشایی می‌شود (۳۶).

استفاده از آنتی‌اکسیدانی که در محیط رقیق کننده منی بتواند از اسپرم در برابر آسیب‌های انجماد-یخ‌گشایی محافظت کند بسیار حائز اهمیت است. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که افزودن آنتی اکسیدان‌های مختلف به رقیق کننده مایع منی گاو در طول نگهداری می‌تواند سبب بهبود قدرت زنده‌مانی و جنبایی اسپرم بعد از فرایند نگهداری شود، که بسته به نوع و غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند متفاوت باشد (۳۴، ۴۲). آنتی‌اکسیدان‌هایی که به رقیق کننده اضافه می‌شوند، می‌توانند عملکرد اسپرماتوزوآ را تقویت کنند و اثرات مضر استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد حین انجماد را کاهش دهند آنتی اکسیدان‌های طبیعی محافظ‌های خوبی برای اسپرم منجمد و ذوب شده هستند. یکی از آنتی اکسیدان‌هایی که می‌توان نام برد روتین است که یک فلاونوئید گیاهی است. روتین، به عنوان ویتامین P نیز شناخته می‌شود. این

ماده به وفور در مرکبات یافت شده و دارای چندین ویژگی دارویی، از جمله محافظت از قلب (۴۴)، ضد التهاب (۲۸)، ضد سرطان (۳۷) و فعالیت آنتی اکسیدانی (۱۰، ۳۰) می‌باشد. مطالعات قبلی نشان داده است که روتین می‌تواند مستقیماً ROS را از طریق اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد پاک کند (۱۶). تحقیقات اخیر نقش محافظتی روتین را بر عملکرد تولیدمثلی نرها در شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهد (۲۴). بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی تأثیرات روتین بر روی منی گاو بعد از فرایند انجماد-یخ گشایی است.

مواد و روش‌ها

نحوه جمع‌آوری منی

در این بررسی از سه راس گاو سیمنتال، با استفاده از واژن مصنوعی نمونه منی گرفته خواهد شد. تمامی گاوها از نظر رژیم غذایی، رژیم درمانی، شرایط نگهداری و مانکن مورد استفاده برای نمونه‌گیری (که یک گاو ماده بود) در شرایط کاملا یکسانی قرار خواهند داشت. در هر نوبت آزمایش از هر گاو یک نمونه اخذ شده و حجم نمونه ثبت می‌گردد و جهت عدم تفاوت گونه‌ای نمونه‌ها با هم ادغام می‌گردد.

در این مطالعه نمونه‌هایی که حجم حدود ۶-۲ میلی لیتر مایع منی و غلظت بالای $۱۰^{۹} \times ۱$ اسپرم و تحرک حداقل ۵۰ درصدی داشته باشند، اخذ شده و با هم ادغام می‌گردند. برای شمارش تعداد اسپرماتوزوئیدها در هر میلی لیتر توسط لام هموسایتومتر ارزیابی خواهد شد و تعداد اسپرم‌ها مشخص می‌گردد. همچنین براساس اطلاعات حجم نمونه منی جمع‌آوری شده و نیز تعداد اسپرماتوزوئیدهای در نظر گرفته شده برای هر پایوت که به سیستم داده خواهد شد (۱۵ میلیون اسپرماتوزوئید)، حجم رقیق‌کننده و تعداد پایوت‌های مورد نیاز برای بسته‌بندی محاسبه خواهد شد.

حجم مایع منی اخذ شده- (تعداد دوز اسپرم × حجم پایوت اسپرم {۰/۵ سی سی})= حجم مورد نیاز رقیق کننده

به دنبال اخذ منی از گاو، نمونه‌های به دست آمده در رقیق کننده تریس – اسید سیتریک (شامل تریس ۲/۶۶ گرم، اسید سیتریك ۱/۴۷ گرم، گلوکز ۰/۶۳ گرم، سیستئین ۰/۱۳ گرم،۲۰٪ زرده تخم‌مرغ و پنی سیلین ۱ میلی گرم و استرپتومایسین ۱ میلی‌گرم محلول در آب مقطر دوبار تقطیر تا رساندن حجم به ۱۰۰ میلی‌لیتر) (۳۵) به نسبت ۱ به ۱۰ تا ۱ به ۱۵ (بسته به غلظت و شمارش اسپرم) رقیق خواهند شد (غلظت نهایی اسپرم در هر پایوت ۱۵ میلیون) و سپس نمونه‌ها، در دستگاه بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده خواهند شد. قابل ذکر است که برای هر گروه ۳ بار تکرار انجام خواهد پذیرفت.

در این مرحله هر نمونه منی به گروه‌های زیر تقسیم می‌شود:

۱- گروه اول (کنترل): اسپرم + رقیق کننده استاندارد + ۷٪ گلیسرول (۳۵)

۲- گروه دوم: اسپرم + رقیق کننده استاندارد + ۷٪ گلیسرول + روتین ۰/۲ میلی مول

۳- گروه سوم: اسپرم + رقیق کننده استاندارد + ۷٪ گلیسرول + روتین ۰/۴ میلی مول

۴- گروه چهارم: اسپرم + رقیق کننده استاندارد + ۷٪ گلیسرول + روتین ۰/۶ میلی مول

۵- گروه پنجم: اسپرم + رقیق کننده استاندارد + ۷٪ گلیسرول + روتین ۰/۸ میلی مول

۶- گروه ششم: اسپرم + رقیق کننده استاندارد + ۷٪ گلیسرول + روتین ۱ میلی مول (۴۶).

بررسی حجم منی

بلافاصله پس از نمونه‌گیری، حجم منی با استفاده از لوله‌های مدرج اندازه‌گیری می‌شد. نمونه‌هایی برای مطالعه مورد استفاده قرار می‌گرفتند که حجم آنها بیشتر از ۰/۷۵ میلی‌لیتر بود.

بررسی جنبایی اسپرم

جهت بررسی جنبایی و شاخص‌های جنبایی، از سیستم رایانه‌ای آنالیز اسپرم یا کاسا استفاده شد (Test Sperm ۳/۲; Videotest, St. Petersburg, Russia). تنظیمات کاسا مورداستفاده در مطالعه حاضر در جدول ۱ ارائه‌شده است. در این بررسی ۵ میکرولیتر از هر گروه بر روی لام قرارگرفته بر روی صفحه گرم میکروسکوپ نوری (Olympus, BX۴۱, Tokyo, Japan) ریخته و در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از نگهداری در دمای یخچال، جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده و شاخصه‌های حرکتی اسپرم شامل: شاخص سرعت واقعی اسپرم در مسیر پیموده شده (VCL)، سرعت اسپرم در خط مستقیم (VCL)، بسامد (فرکانس) حرکت‌های جانبی (BCF)، معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم (STR) و میانگین سرعت در مسیر مستقیم (VAP) مورد ارزیابی (۳) قرار گرفتند (تعداد ۵۰۰ اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت).

بررسی قابلیت زنده‌مانی اسپرم

جهت بررسی میزان قابلیت زنده‌مانی اسپرم‌ها، رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین مورداستفاده قرار گرفت. در این روش رنگ‌آمیزی مبنای تشخیص اسپرم‌های زنده از اسپرم‌های مرده آسیب به غشای پلاسمایی است به‌طوری‌که غشای اسپرم‌های مرده در برابر رنگ مذکور نفوذپذیر می‌گردند. بنابراین آن دسته از اسپرم‌هایی که رنگ گرفته بودند به‌عنوان اسپرم‌هاي مرده در نظر گرفته شدند. در این مطالعه از هر نمونه، تعداد ۲۰۰ اسپرم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل در قالب درصد بیان شدند (۴۵).

بررسي يكپارچگي غشاى پلاسمايى اسپرم تست (HOST)

ارزيابي يكپارچگي غشاء پلاسماي اسپرماتوزوئيدهاي نمونه‌هاي مني جمع‌آوري شده با استفاده از روش آزمايش HOS انجام گرفت. براي اين منظور محلول HOS با حل كردن ۰/۷۳۵ گرم سيترات سديم و ۱/۳۵۱ گرم فروكتوز در ۱۰۰ ميلي‌ليتر آب مقطر انجام گرفت گزارش گرديد.

ارزیابی آسیب DNA اسپرم

برای ارزیابی هرگونه شکستگی در دو رشته DNA اسپرم، از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج استفاده شد. پس از تهیه اسمیر از نمونه‌ها و خشک شدن آن‌ها، لام‌ها به مدت ۲۴ ساعت توسط محلول کارنوی فیکس گردیدند و بعد به مدت ۱۰ دقیقه توسط رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج رنگ‌آمیزی

شدند.

ارزیابی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی

جهت ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی، از کیت سنجش ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (Total Antioxidant Capacity ;۱۵۰۱۲-Naxifer™ -Cat# NS) شرکت نوند سلامت مورد استفاده قرار گرفت. واحد ظرفیت تام آنتی اکسیدانی بصورت mmol/L بیان گردید.

ارزیابی میزان مالون دی آلدئید (MDA)

جهت ارزیابی از کیت MDA (Nalondi™-Lipid Peroxidation Assay (Kit (NID); Navand Salamat Company; Urmia; Iran) شرکت نوند سلامت مورد استفاده قرار گرفت و میزان MDA بصورت mmol/L بیان گردید.

روش ارزیابی آماری

داده‌ها با استفاده نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ با استفاده از تست‌های Tukey و One-way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

جنبایی کل اسپرم

بررسی جنبایی کل اسپرم‌ها نشان داد که گروه‌هایی که ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌مولار روتین دریافت کرده بودند بطور معنی‌داری (p<۰/۰۵) بالاتر از گروه کنترل بودند (جدول ۱). در این بررسی مشخص گردید که بین گروه‌های حاوی ۰/۸ و ۱ میلی مولار روتین و همچنین بین گروه‌های ۰/۲ میلی‌مولار و کنترل اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۱). در این بررسی مشخص گردید که گروه‌های حاوی ۰/۴ و ۰/۶ میلی مولار روتین دارای بالاترین (p<۰/۰۵) درصد جنبایی کل اسپرم‌ها در بین سایر گروه‌ها می‌باشد (جدول ۱).

جنبایی پیش‌رونده

بررسی درصد جنبایی پیش‌رونده نشان داد که گروه‌های ۰/۲ میلی‌مولار روتین و کنترل بطور معنی‌داری (p<۰/۰۵) کمترین درصد جنبایی پیش‌رونده را به خود اختصاص داده بودند (جدول ۱). همچنین در این بررسی مشخص گردید که درصد جنبایی پیش‌رونده گروه‌هایی که ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌مولار روتین دریافت کرده بودند بطور معنی‌داری (p<۰/۰۵) بالاتر از گروه کنترل بودند، این در حالی بود که گروه‌های حاوی ۰/۴ و ۰/۶ میلی مولار روتین بالاترین (p<۰/۰۵) میزان درصد

جدول۱- اثر افزودن غلظت‌های مختلف روتین در رقیق‌کننده منی بر جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم گاو پس از افزودن غلظت‌های مختلف روتین در رقیق‌کننده منی.

شاخص	کنترل	۰/۲ * روتین	۰/۴* روتین	۰/۶* روتین	۰/۸* روتین	۱* روتین
(٪) جنبایی کلی	۶۱/۳۰±۱/۴۷ d	۶۳/۵۰±۱/۳۴ cd	۷۴/۲۹±۱/۷۸ a	۷۱/۱۹±۱/۲۵ a	۶۶/۹۲±۱/۵۳ b	۶۵/۳۱±۱/۴۵ bc
(٪) جنبایی پیش‌رونده	۱۹/۲۱±۱/۳۹ c	۲۱/۷۵±۱/۲۲ c	۳۵/۴۴±۱/۵۶ a	۳۴/۱۱±۱/۳۰ a	۲۸/۴۵±۱/۲۹ b	۲۶/۲۰±۱/۵۳ b

- حروف مختلف (a-d) در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار p <۰/۰۵ است.

- * واحد ها بصورت میلی مولار می باشد

جدول۲- میانگین (± خطای استاندارد) تغییرات شاخص‌های جنبایی اسپرم گاو پس از افزودن غلظت‌های مختلف روتین در رقیق‌کننده.

شاخص	کنترل	۰/۲ * روتین	۰/۴* روتین	۰/۶* روتین	۰/۸* روتین	۱* روتین
VCL (µm/S)	۳۷/۴۹±۱/۷۵ d	۳۸/۷۰±۱/۲۸ d	۴۷/۲۵±۱/۷۰ a	۴۵/۳۵±۱/۲۲ ab	۴۲/۲۷±۱/۴۵ bc	۴۰/۴۵±۱/۷۰ cd
VSL (µm/S)	۲۱/۶۰±۱/۳۳ c	۲۳/۰۹±۱/۴۵ c	۳۳/۴۱±۱/۳۹ a	۳۲/۴۰±۱/۸۳ a	۲۸/۳۹±۱/۴۸ b	۲۷/۴۷±۱/۱۹ b
VAP (µm/S)	۲۸/۲۴±۱/۶۱ d	۳۰/۶۵±۱/۵۸ c	۴۲/۷۶±۱/۸۱ a	۳۹/۲۲±۱/۵۶ a	۳۵/۸۳±۱/۰۵ b	۳۵/۷۰±۱/۲۴ b
STR (٪)	۶۴/۳۹±۱/۴۷ a	۶۴/۴۲±۱/۷۵ a	۶۵/۱۱±۱/۶۳ a	۶۴/۸۵±۱/۵۹ a	۶۴/۶۹±۱/۴۰ a	۶۴/۴۷±۱/۶۳ a
BCF (Hz)	۲/۷۳±۰/۱۵ a	۲/۷۵±۰/۱۱ a	۲/۷۹±۰/۱۳ a	۲/۷۹±۰/۱۵ a	۲/۷۸±۰/۱۳ a	۲/۷۷±۰/۱۹ a

- VCL: سرعت در مسیر میانگین؛ VSL: سرعت در مسیر مستقیم؛ VAP: سرعت در مسیر منحنی؛ STR: راستی مسیر طی شده؛ BCF: تناوب عرضی زنش. حروف مختلف (a-d) در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار p <۰/۰۵ است.

- * واحد ها بصورت میلی مولار می باشد

جنبایی پیش‌رونده را به خود اختصاص داده بودند (جدول ۱).

شاخص‌های جنبایی اسپرم

شاخص سرعت واقعی اسپرم در مسیر پیموده شده (VCL)

بررسی شاخص VCL نشان داد که گروه‌های ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ میلی مولار روتین بطور معنی‌داری ($p<0/05$) میزان شاخص VCL بالاتر از گروه کنترل بود (جدول ۲). در این مطالعه همچنین مشخص گردید که افزودن ۰/۲، ۰/۸ و ۱ میلی مولار روتین نتوانست بهبودی در این شاخص نسبت به گروه کنترل ایجاد نمایند (جدول ۲).

شاخص سرعت اسپرم در خط مستقیم (VSL) و میانگین سرعت در مسیر مستقیم (VAP)

در بررسی شاخص‌های VSL و VAP، نتایج نشان می‌دهند که افزودن روتین با غلظت‌های ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی مولار به طور معنی‌دار ($p<0/05$) میزان این دو شاخص را نسبت به سایر گروه‌های درمانی افزایش داده‌اند (جدول ۱). علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهند که میزان این دو شاخص بین گروه کنترل و گروه ۰/۲ میلی مولار روتین، بین گروه‌های ۰/۴ و ۰/۶ میلی مولار روتین، و بین گروه‌های ۰/۸ و ۱ میلی مولار روتین، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۲).

شاخص معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم (STR)

بررسی درصد شاخص STR نشان می‌دهد که در بین هیچکدام از گروه‌های درمانی اختلاف معنی‌داری ($p>0/05$) وجود ندارد (جدول ۲).

شاخص بسامد (فرکانس) حرکت‌های جانبی (BCF)

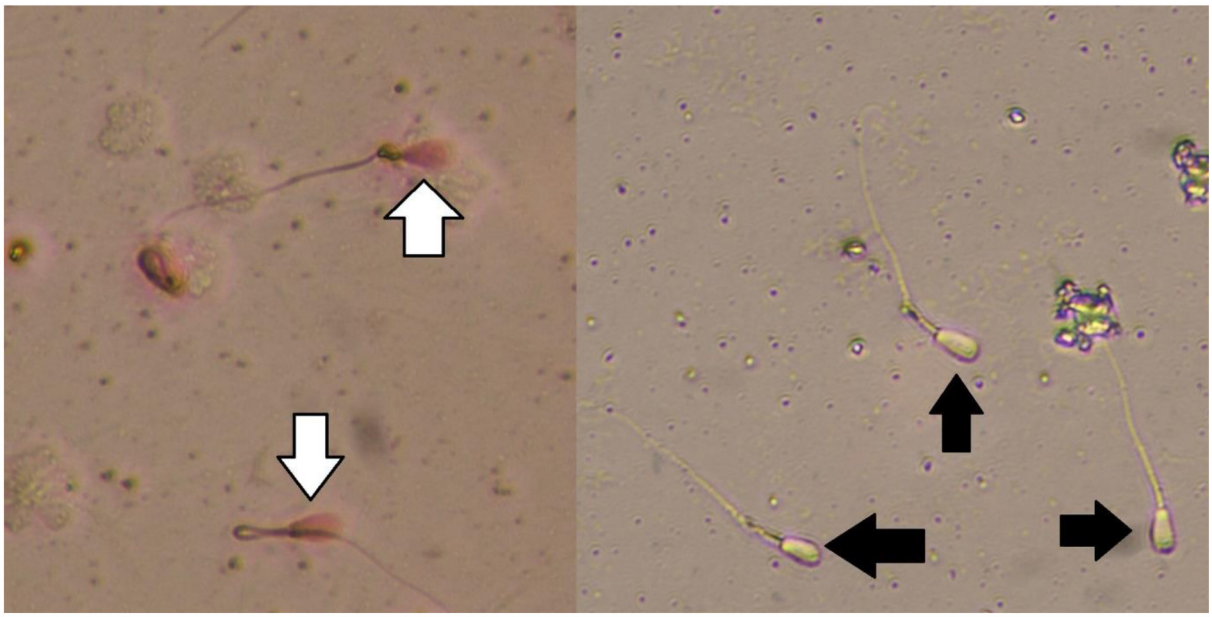
بررسی شاخص BCF نشان داد که با افزودن دوزهای روتین هیچگونه اختلاف معنی‌داری بر میزان این شاخص ایجاد نکرده و اختلاف معنی‌داری ($p>0/05$) وجود ندارد (جدول ۲).

زنده‌مانی اسپرم

بررسی درصد زنده‌مانی اسپرم نشان داد که افزودن ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی مولار روتین به رقیق کننده مایع منی گاو سیمنتال باعث افزایش معنی‌دار ($p<0/05$) درصد اسپرم‌های زنده نسبت به گروه کنترل می‌شود. در این بررسی همچنین نشان داده شد گروه‌های ۰/۴ و ۰/۶ میلی مولار روتین، دارای بالاترین ($p<0/05$) درصد اسپرم‌های زنده نسبت به سایر گروه‌های درمانی را به خود اختصاص داده‌اند (جدول ۳). علاوه بر این مشخص گردید بین گروه‌های کنترل و ۰/۲ میلی مولار روتین اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۳، شکل ۱).

بررسی درصد یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم

بررسی درصد پیوستگی غشاء پلاسمایی اسپرم با استفاده از روش HOS نشان داد که گروه‌های حاوی ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی مولار روتین، بطور معنی‌داری ($p<0/05$) باعث بهبود پیوستگی غشاء پلاسمایی اسپرم بعد از فرایند انجماد-یخ‌گشایی نسبت به سایر گروه‌های درمانی می‌گردد (جدول ۳). علاوه براین مشخص شد که بین گروه‌های ۰/۴ و ۰/۶ میلی مولار، بین گروه‌های ۰/۸ و ۱ میلی مولار، بین گروه‌های ۱ و ۰/۲ میلی مولار و بین گروه‌های ۰/۲ میلی مولار روتین و کنترل اختلاف معنی‌داری



شکل ۱- زنده‌مانی اسپرم گاو سیمنتال بعد از فرایند انجماد-یخ گشایی با استفاده از روش ائوزین-نگروزین. فلش سفید نشانگر اسپرم‌های مرده (رنگ گرفته) و فلش سیاه نشانگر اسپرم‌های زنده (رنگ نگرفته). بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر.

وجود ندارد (جدول ۳، شکل ۲).

بررسی درصد آسیب DNA اسپرم

بررسی آسیب DNA اسپرم‌ها نشان داد که افزودن ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی مولار روتین توانستند آسیب DNA اسپرم را بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی بطور معنی‌داری (p<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل کاهش دهند (جدول ۳).

بررسی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی

بررسی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی نشان داد که گروه‌های حاوی ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی مولار روتین توانستند میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی را بطور معنی‌داری (p<۰/۰۵) نسبت به گروه ۰/۲ میلی مولار روتین و کنترل افزایش دهد (جدول ۴). علاوه براین مشخص گردید بین گروه‌های ۰/۴ و ۰/۶ میلی مولار روتین، بین گروه‌های ۰/۸ و ۱ میلی مولار، بین گروه‌های ۱ و ۰/۲ میلی مولار و بین گروه های ۰/۲ میلی مولار روتین و کنترل اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۴).

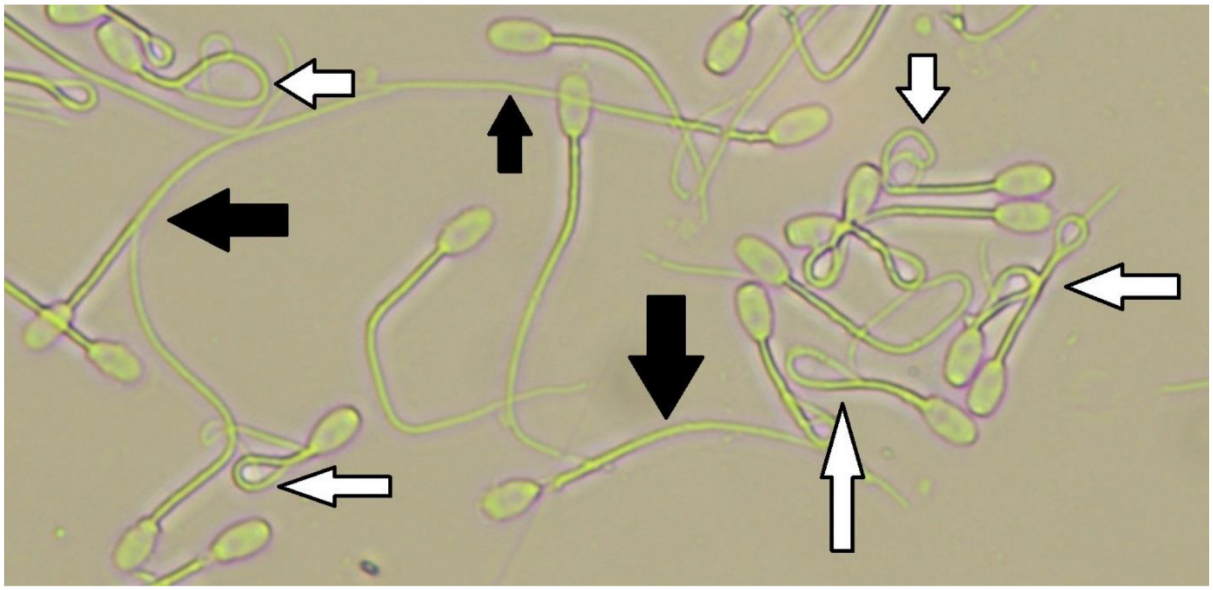
بررسی میزان مالون دی آلدئید

بررسی میزان مالون دی آلدئید نشان می‌دهد که تمامی گروه‌هایی که به آن‌ها روتین افزوده گردیده بود (۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی مولار روتین) به استثناء گروهی که ۰/۲ میلی مولار افزوده شده بود توانستند بطور معنی‌داری (p<۰/۰۵) باعث کاهش میزان مالون دی آلدئید نسبت به گروه کنترل شوند (جدول ۴).

بحث

در این مطالعه، اثرات افزودن روتین در رقیق‌کننده اسپرم گاو طی مراحل انجماد-یخ گشایی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاضر نشان داد که نمونه‌های اسپرم حاوی روتین به‌طور قابل‌توجهی فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاو را بعد از انجماد- یخ گشایی بهبود می‌بخشد.

آنتی اکسیدان‌های زیادی برای افزایش کیفیت اسپرم منجمد به کار می‌روند. اما با وجود برخی اطلاعات امیدوارکننده، اثرات محافظتی این آنتی‌اکسیدان‌ها در زمان انجماد همواره اندک و محدود است. به عنوان مثال افزودن رسوراترول (۱۵) یا نانوذرات اکسید روی (۲۱) در محیط انجماد باعث کاهش آسیب پراکسیداسیون لیپیدی یا آسیب DNA اسپرم می‌شود. اما به طرز محسوسی فاکتورهای مربوط به جنبایی اسپرم را بهبود نمی‌دهد. گرچه باید توجه داشت که جنبایی و باروری دو فراسنجه مجزا هستند و جنبایی به معنای بارور بودن نیست ولی همچنان جنبایی یکی از ضروری‌ترین ویژگی‌های یک اسپرم بارور است (۲۹). جنبایی اسپرم یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مربوط به کیفیت اسپرم است و ضعیف بودن جنبایی اسپرم باعث ناباروری می‌گردد (۲۷). در بررسی که توسط ورستگان و همکاران ۲۰۰۲ انجام گرفته است مشخص کرده‌اند که شاخص‌های جنبایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (۴۳). در مطالعه حاضر نشان داده شد که افزودن روتین در بعضی دوزها می‌تواند باعث بهبود عملکرد اسپرم گاو سیمنتال بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی گردد.



شکل۲- یکپارچگیغشاء پالسماییاسپرم گاو سیمنتالبعد از فرایندانجماد-یخ گشاییبا استفاده از روشHOS. فلش سفید ۱۶۸ نشانگر اسپرم‌هایدم خمیدهدارایغشاء پالسماییسالم؛ فلش سیاهنشانگر اسپرمهایبا دم صاف دارایغشاء پالسماییناسالم ۱۶۹ بزرگ‌نمایی۴۰۰برابر.

گزارش اینانچ و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۲۰) بر روی شاخص‌های جنبایی اسپرم نشان داد که بین سرعت انحنای خطی، سرعت خط مستقیم، دامنه‌ی جابجایی و فرکانس ضربان متقاطع با نرخ لقاح پس از تلقیح مصنوعی همبستگی مثبت وجود دارد. مقالات مختلف بیان کرده‌اند که ویتامین‌هایی مانند ویتامین E (۴۷)، ویتامین C (۴) و ویتامین B۱۲ (۱۷) تأثیر قابل توجهی بر افزایش جنبایی اسپرم پس از یخ‌گشایی دارند. در نتیجه استفاده از آنتی اکسیدان‌ها در رقیق کننده‌ها می‌تواند مانع از افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی شود (۱۱). بنابراین، کاهش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن ممکن است باعث بهبود جنبایی و قدرت زنده مانی اسپرم شود (۷).

بر اساس تحقیقات، اسپرم می‌تواند در طول انجماد تحت تغییرات نکروز حاد قرار گیرد که در درجه اول به دلیل عدم تعادل اسمزی است. پس از یخ‌گشایی، مقدار زیادی از اسپرم باقیمانده می‌تواند در معرض آسیب کشنده قرار گیرد که ممکن است منجر به مرگ سلولی مشابه آپوپتوز شود و در نتیجه طول عمر آن‌ها را کوتاه کند. یافته‌ها بر اهمیت افزایش روش‌های انجماد برای ذخیره‌سازی مایع منی و نیاز به مطالعات بیشتر برای ارائه تکنیک‌های مؤثرتر برای حفظ کیفیت اسپرم تأکید می‌کنند (۳۳) علت اصلی آسیب سلول‌های اسپرم در حین انجماد، اختلالی است که به پلاسمای غشاء اسپرم وارد می‌شود (۴۱). در طول فرآیند انجماد، محدودیت‌های حرکت جانبی فسفولیپید باعث تغییر فاز مایع به ژل می‌شود و غشاء پلاسمایی را سفت و شکننده می‌کند. این تغییرات منجر به جداسازی فاز لیپیدی می‌شود و بنابراین، پروتئین‌ها به‌طور برگشت‌ناپذیر خوشه‌بندی می‌شوند (۱۲). به منظور بهبود زنده ماندن اسپرم و حفظ عملکرد غشای پلاسمایی، استفاده از رقیق کننده مناسب و حفظ دمای ایده‌آل در طول نگهداری ضروری است. انصاری و همکاران دریافتند که کاهش درصد آکروزوم‌های سالم دست‌نخورده و کل فعالیت آکروزین حداقل تا حدی مسئول آسیب عملکردی غیرقابل برگشتی است که انجماد می‌تواند بر زنده‌مانی اسپرم وارد کند (۶). برای جلوگیری از اثرات مضر ذخیره‌سازی بر کیفیت مایع منی، مانند کاهش زنده ماندن و عملکرد غشای پلاسمایی، رقیق کننده‌هایی حاوی آنتی اکسیدان‌ها و مواد شیمیایی محافظ تکمیل می‌شوند (۲۲، ۲۳). در مطالعه‌ای خو و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که، افزودن روتین به رقیق‌کننده منی نه تنها باعث افزایش جنبایی اسپرم می‌شود بلکه خصوصیات فیزیولوژیک اسپرم را نیز بهبود داد. در این مطالعه همچنین مشخص شد استفاده از روتین در مقایسه با GLP، در عملکرد میتوکندری و پیوستگی آکروزوم نقش بهتری ایفا می‌کند؛ ولی تفاوت معنی‌داری میان روتین و ویتامین C در مورد پارامترهای فیزیولوژیک مربوط به اسپرم وجود نداشت. در این مطالعه نشان داده شد که روتین به طرز محسوسی باعث افزایش نرخ تسهیم و نرخ بلاستوسیست می‌شود (۴۶). در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که روتین می‌تواند باعث بهبود قدرت زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء اسپرم بعد از فرایند انجماد و یخ‌گشایی گردید.

تحقیقات نشان داده است که فرآیند انجماد اسپرم، که به عنوان یک

جدول ۳- درصد قابلیت زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء و آسیب DNA اسپرم گاو پس از افزودن غلظت‌های مختلف روتین در رقیق‌کننده.

شاخص	کنترل	۰/۲ * روتین	۰/۴* روتین	۰/۶* روتین	۰/۸* روتین	۱* روتین
(٪) زنده مانی اسپرم	۵۹/۳۱±۱/۴۰ d	۶۱/۷۹±۱/۴۳ cd	۷۲/۶۵±۱/۳۹ a	۶۹/۳۰±۱/۵۷ a	۶۵/۷۶±۱/۳۰ b	۶۴/۲۲±۱/۲۵ bc
(٪) یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم	۵۳/۶۳±۱/۴۲ c	۵۵/۷۱±۱/۷۰ bc	۶۵/۳۹±۱/۴۵ a	۶۳/۷۸±۱/۶۷ a	۵۸/۴۱±۱/۲۲ b	۵۷/۷۰±۱/۳۴ b
(٪) DNA آسیب	۹/۲۴±۰/۳۵ a	۸/۸۳±۰/۱۹ b	۵/۱۰±۰/۱۴ d	۵/۸۳±۰/۱۱ d	۷/۰۵±۰/۱۹ c	۷/۸۳±۰/۱۲ c

- حروف مختلف (a-d) در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار $p < ۰/۰۵$ است.

- * واحد ها بصورت میلی مولار می باشد

جدول ۴- میانگین میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی و مالون دی آلدئید در گروه های درمانی مختلف طی فرایند انجماد- یخ‌گشایی اسپرم گاو سیمنتال.

شاخص	کنترل	۰/۲ * روتین	۰/۴* روتین	۰/۶* روتین	۰/۸* روتین	۱* روتین
(mmol/L) ظرفیت تام آنتی اکسیدانی	۱/۲۰±۰/۱۲ c	۱/۲۳±۰/۱۵ c	۳/۳۵±۰/۱۴ a	۳/۰۴±۰/۱۴ a	۲/۵۶±۰/۱۸ b	۲/۴۰±۰/۱۱ b
(mmol/L) مالون دی آلدئید	۲/۶۳±۰/۱۵ a	۲/۳۵±۰/۱۱ a	۰/۴۴±۰/۱۴ d	۰/۶۱±۰/۱۱ c	۱/۵۳±۰/۱۵ b	۱/۶۰±۰/۱۱ b

- حروف مختلف (a-d) در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار $p<۰/۰۵$ است.

- * واحد ها بصورت میلی مولار می‌باشد.

فرآیند غیرمطلوب در نظر گرفته می‌شود، منجر به ناپایداری کروماتین و شکستگی تکه‌های DNA در اسپرم گرازها و پرندگان می‌شود (۱۴). آسیب DNA احتمالاً ناشی از مکانیسم‌های مختلفی است که در طول فرآیند انجماد رخ می‌دهد و بر اثر کاهش غلظت آنتی‌اکسیدان‌های داخلی، ویژگی‌های ساختاری و عملکردی اسپرم به خطر می‌افتد (۲). شکستگی دو رشته‌ای DNA به دلیل تولید بالای ROS، اختلال در آنزیم‌های ترمیم DNA و تنش مکانیکی در نواحی ژنومی مولکول DNA اسپرم را ایاد می‌نماید، زیرا در این نواحی، تراکم کروماتین به دلیل انقباض سلولی افزایش می‌یابد (۹). تحقیقات نشان داده‌اند که آسیب DNA می‌تواند یکی از علل ناباروری در دام‌های نر باشد و روتین توانسته است باعث کاهش آسیب DNA اسپرم در گوسفند شود (۳۱، ۳۲، ۴۰). احتمالاً روتین از طریق ورود به فضای داخلی سلول به طرقی مانند انتشار غیرفعال یا اندوسیتوز، با غشاهای بیولوژیکی تعامل داشته باشد و بتواند از آسیب ناشی از یخزدگی جلوگیری کنند و فرآیند بازسازی سلولی را تقویت کنند (۲۶). در مطالعه حاضر نشان داده شد که افزودن روتین به رقیق کننده منی گاو می‌تواند باعث بهبود یکپارچگی غشاء و آسیب DNA اسپرم بعد از فرایند انجماد و یخ‌گشایی گردد. این نتایج موید پژوهشی بود که نشان دادند که افزودن روتین به محیط سرمایش باعث بهود قابل توجه یکپارچگی غشاء، عملکرد میتوکندری و یکپارچگی آکروزوم و DNA اسپرم می‌شود (۴۶). مطالعات دیگر نیز تأیید کرد که روتین از طریق فعالیت آنتی اکسیدانی خود، می‌توانند باعث بهبود پارامترها در موش سوری شود (۱۳، ۳۹).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که افزودن روتین به رقیق‌کننده مایع منی گاو سیمنتال می‌تواند میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی و میزان مالون دی آلدئید را بهبود بخشد. در مطالعه‌ای خان و همکاران (۲۵) گزارش کردند که اضافه کردن روتین، اثرات آسیب‌زای رادیکال‌های آزاد و یا پراکسیداسیون لیپیدی بر اسپرم را با بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در مدل موش تضعیف می‌کند. مطابق با نتایج به‌دست آمده، آناپورنا و همکاران (۵) نیز گزارش داده‌اند که روتین، ظرفیت آنتی اکسیدانی را توسط افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی SOD، CAT و GSH-Px در موش افزایش می‌دهد. تفسیر احتمالی برای مکانیسم آنتی اکسیدانی با استفاده از روتین این است که روتین قادر است الکترون‌هایی را اهدا کند که مستقیماً هدف رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید هستند (۱۶).

نتیجه‌گیری

این یافته‌ها نشان می‌دهد که افزودن روتین در دوزهای بین ۰/۴ تا ۰/۸ میلی مولار به رقیق کننده منی می‌تواند پارامترهای اسپرم، ظرفیت تام آنتی اکسیدانی و میزان مالون دی آلدئید اسپرم را بهبود بخشد. همچنین از این نتایج می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری نمود که دوزهای کم مانند ۰/۲ میلی مولار نمی‌تواند خاصیت آنتی اکسیدانی کافی برای بهبود پارامترهای اسپرم بعد از یخ‌گشایی گردد. همچنین با توجه به نتایج مختلف در دوزهای بالاتر از ۰/۸ میلی مولار در پارامترهای مختلف اسپرم، می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری نمود که ممکن است دوزهای بالاتر روتین اثرات توکسیک بر روی اسپرم داشته باشد و بایستی با احتیاط مصرف گردند.

بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کلی کرد که روتین در دوزهای متوسط می‌تواند کیفیت منی منجمد- یخ‌گشایی شده در گاو سیمنتال را بهبود بخشد، اما مطالعات بیشتر برای تعیین اثرات افزودن روتین در رقیق کننده بر باروری گاو ضروری است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که با تصویب و حمایت مالی امکان انجام مطالعه را فراهم آوردند تشکر به عمل می‌آید.

پاورقی‌ها

1-Computer-assisted sperm analysis.

2-Curvilinear Velocity.

3-Straight – line Velocity.

4-Beat Cross Frequency.

5-Sperm Track Straightness.

6-Average Path Velocity.

7-Ganoderma Lucidum Polysaccharide.

منابع مورد استفاده

1. Adiputra, K.D.D., Sukandi, S., Farida, S., Sonjaya, H. and Hasbi, H., 2022. Progressive Motility, DNA Fragmentation, Intact Plasma Membrane, and Acrosome Status of Frozen Semen Bali and Simmental Bulls. Hasanuddin Journal of Animal Science (HAJAS), 4(2), pp.109-118.

2. Ahmed, H., Jahan, S., Salman, M.M. and Ullah, F., 2019. Stimulating effects of Quercetin (QUE) in tris citric acid extender on post thaw quality and in vivo fertility of buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa. Theriogenology, 134, pp.18-23.

3. Akbari Kalesar, A., Seifi-Jamadi, A., Yadi, J. and Kohram, H., 2017. Effect of Butylated Hydroxy Anisole (BHA) and Butylated Hydroxy Toluene (BHT) on semen quality of Ram semen after freeze thawing Process. Iranian Journal of Animal Science, 48(2), pp.287-295.

4. Amini, M.R., Kohram, H., Zare Shahaneh, A., Zhandi, M., Sharideh, H. and Nabi, M.M., 2015. The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. Cell and tissue banking, 16, pp.587-592.

5. Annapurna, A., Ansari, M.A. and Manjunath, P.M., 2013. Partial role of multiple pathways in infarct size limiting effect of quercetin and rutin against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 17(4), pp.491-500.

6. Ansari, M.S., Rakha, B.A., Ejaz, R., Ullah, N. and Akhter, S., 2017. Melatonin supplementation in extender enhances the post

thaw quality of buffalo bull spermatozoa. Pakistan Journal of Zoology, 49(1), pp.163-163.
7. Asadmobini, A., Bakhtiari, M., Khaleghi, S., Esmaeili, F. and Mostafaei, A., 2017. The effect of Tribulus terrestris extract on motility and viability of human sperms after cryopreservation. Cryobiology, 75, pp.154-159.
8. Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S., 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Veterinary medicine international, 2011.
9. Bogle, O.A., Kumar, K., Attardo-Parrinello, C., Lewis, S.E.M., Estanyol, J.M., Ballescà, J.L. and Oliva, R., 2017. Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. Andrology, 5(1), pp.10-22
10. Cândido, T.M., De Oliveira, C.A., Ariede, M.B., Velasco, M.V.R., Rosado, C. and Baby, A.R., 2018. Safety and antioxidant efficacy profiles of rutin-loaded ethosomes for topical application. Aaps Pharmscitech, 19, pp.1773-1780.
11. Cassani, P., Beconi, M.T. and O'Flaherty, C., 2005. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. Animal reproduction science, 86(1-2), pp.163-173.
12. De Leeuw, F.E., Chen, H.C., Colenbrander, B. and Verkleij, A.J., 1990. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. Cryobiology, 27(2), pp.171-183.
13. Dudylina, A.L., Ivanova, M.V., Shumaev, K.B. and Ruuge, E.K., 2019. Superoxide formation in cardiac mitochondria and effect of phenolic antioxidants. Cell biochemistry and biophysics, 77, pp.99-107.
14. Fraser, L. and Strzeżek, J., 2007. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing–thawing?. Theriogenology, 68(2), pp.248-257.
15. Garcez, M.E., dos Santos Branco, C., Lara, L.V., Pasqualotto, F.F. and Salvador, M., 2010. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. Fertility and sterility, 94(6), pp.2118-2121.
16. Ghiasi, M., Azadnia, A., Arabieh, M. and Zahedi, M., 2012. Protective effect of rutin (vitamin p) against heme oxidation: a quantum mechanical approach. Computational and Theoretical Chemistry, 996, pp.28-36.
17. Hu, J.H., Tian, W.Q., Zhao, X.L., Zan, L.S., Xin, Y.P. and Li, Q.W., 2011. The cryoprotective effects of vitamin B12 supplementation on bovine semen quality. Reproduction in domestic animals, 46(1), pp.66-73.
18. Ijab, R., Ayen, E., Khaki, A. and Soleimanzadeh, A., 2022, March. Evaluation of dietary betaine on post-thawed semen quality in mature bulls during summer heat stress. In Veterinary Research Forum (Vol. 13, No. 1, p. 61).
19. Inaba, Y., Abe, R., Geshi, M., Matoba, S., Nagai, T. and Somfai, T., 2016. Sex-sorting of spermatozoa affects developmental competence of in vitro fertilized oocytes in a bull-dependent manner. Journal of Reproduction and Development, 62(5), pp.451-456.
20. İnanç, M.E., Cil, B., Tekin, K., Alemdar, H. and DAŞKIN, A., 2018. The combination of CASA kinetic parameters and fluorescein staining as a fertility tool in cryopreserved bull semen. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 42(5), pp.452-458.
21. Isaac, A.V., Kumari, S., Nair, R., Urs, D.R., Salian, S.R., Kalthur, G., Adiga, S.K., Manikkath, J., Mutalik, S., Sachdev, D. and Pasricha, R., 2017. Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. Biochemical and biophysical research communications, 494(3-4), pp.656-662.
22. Izanloo, H., Soleimanzadeh, A., Bucak, M.N., Imani, M. and Zhandi, M., 2021. The effects of varying concentrations of glutathione and trehalose in improving microscopic and oxidative stress parameters in Turkey semen during liquid storage at 5 C. Cryobiology, 101, pp.12-19.
23. Izanloo, H., Soleimanzadeh, A., Bucak, M.N., Imani, M. and Zhandi, M., 2022. The effects of glutathione supplementation on post-thawed Turkey semen quality and oxidative stress parameters and fertilization, and hatching potential. Theriogenology, 179, pp.32-38.
24. Jamalan, M., Ghaffari, M.A., Hoseinzadeh, P., Hashemitabar, M. and Zeinali, M., 2016. Human sperm quality and metal toxicants: protective effects of some flavonoids on male reproductive function. International journal of fertility & sterility, 10(2), p.215.
25. Khan, R.A., Khan, M.R., Ahmed, M., Shah, M.S., Rehman, S.U., Khan, J. and Shifa, M.S., 2017. Effects of rutin on testicular antioxidant enzymes and lipid peroxidation in rats. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 51, pp.412-417.
26. Kolarevic, A., Pavlovic, A., Djordjevic, A., Lazarevic, J., Savic, S., Kocic, G., Anderluh, M. and Smelcerovic, A., 2019. Rutin as deoxyribonuclease I inhibitor. Chemistry & biodiversity, 16(5), p.e1900069.
27. Kumar, P., Saini, M., Kumar, D., Balhara, A.K., Yadav, S.P., Singh, P. and Yadav, P.S., 2015. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (Bubalus bubalis) semen. Animal reproduction science, 159, pp.38-45.
28. Liu, Q., Zhou, Y.F., Duan, R.J., Wei, H.K., Jiang, S.W. and Peng, J., 2015. Effects of dietary n-6: n-3 fatty acid ratio and vi-

tamin E on semen quality, fatty acid composition and antioxidant status in boars. Animal reproduction science, 162, pp.11-19.
29. Martínez, A.P., 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. Animal reproduction science, 82, pp.209-224.
30. Mehfooz, A., Wei, Q., Zheng, K., Fadlalla, M.B., Maltasic, G. and Shi, F., 2018. Protective roles of Rutin against restraint stress on spermatogenesis in testes of adult mice. Tissue and Cell, 50, pp.133-143.
31. Najafi, A., Mohammadi, H. and Sharifi, S.D., 2023. Enhancing post-thaw quality of ram epididymal sperm by supplementation of rutin in cryopreservation extender. Scientific Reports, 13(1), p.10873.
32. Narayana, K., D'Souza, U.J. and Rao, K.S., 2002. Ribavirin-induced sperm shape abnormalities in Wistar rat. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 513(1-2), pp.193-196.
33. Ortega-Ferrusola, C., García, B.M., Gallardo-Bolanos, J.M., Gonzalez-Fernandez, L., Rodríguez-Martinez, H., Tapia, J.A. and Peña, F.J., 2009. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. Animal reproduction science, 114(4), pp.393-403.
34. Ramazani, N., Gharebagh, F.M., Soleimanzadeh, A., Arslan, H.O., Keles, E., Gradinarska-Yanakieva, D.G., Arslan-Acaröz, D., Zhandi, M., Baran, A., Ayen, E. and Dinç, D.A., 2023. Reducing oxidative stress by κ-carrageenan and C60HyFn: The post-thaw quality and antioxidant status of Azari water buffalo bull semen. Cryobiology.
35. Ramazani, N., Mahd Gharebagh, F., Soleimanzadeh, A., Arslan, H.O., Keles, E., Gradinarska-Yanakieva, D.G., Arslan-Acaröz, D., Zhandi, M., Baran, A., Ayen, E. and Dinç, D.A., 2023. The influence of L-proline and fulvic acid on oxidative stress and semen quality of buffalo bull semen following cryopreservation. Veterinary Medicine and Science, 00, 1– 12.
36. Rodriguez-Martinez, H., 2012. Cryopreservation of porcine gametes, embryos and genital tissues: state of the art. Current Frontiers in Cryobiology, InTech, pp.231-260.
37. Sheu, J.R., Hsiao, G., Chou, P.H., Shen, M.Y. and Chou, D.S., 2004. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of rutin, a glycoside of the flavonol quercetin, in human platelets. Journal of agricultural and food chemistry, 52(14), pp.4414-4418.
38. Soleimanzadeh, A., Talavi, N., Yourdshahi, V.S. and Bucak, M.N., 2020. Caffeic acid improves microscopic sperm parameters and antioxidant status of buffalo (Bubalus bubalis) bull semen following freeze-thawing process. Cryobiology, 95, pp.29-35.
39. Suganya, S.N. and Sumathi, T., 2017. Effect of rutin against a mitochondrial toxin, 3-nitropropionicacid induced biochemical, behavioral and histological alterations-a pilot study on Huntington's disease model in rats. Metabolic brain disease, 32, pp.471-481.
40. Talebi, A.R., Sarcheshmeh, A.A., Khalili, M.A. and Tabibnejad, N., 2011. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. Alcohol, 45(4), pp.403-409.
41. Ugur, M.R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H.C., Gilmore, A.A., Hitit, M., Arifiantini, R.I., Purwantara, B., Kaya, A. and Memili, E., 2019. Advances in cryopreservation of bull sperm. Frontiers in veterinary science. 2019; 6: 268.
42. Varasofiari, L.N., Setiatin, E.T. and Sutopo, S., 2013. Evaluasi kualitas semen segar sapi Jawa Brebes berdasarkan lama waktu penyimpanan. Animal Agriculture Journal, 2(1), pp.201-208.
43. Verstegen, J., Iguer-Ouada, M. and Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology, 57(1), pp.149-179.
44. Wang, Y.D., Zhang, Y., Sun, B., Leng, X.W., Li, Y.J. and Ren, L.Q., 2018. Cardioprotective effects of rutin in rats exposed to pirarubicin toxicity. Journal of Asian Natural Products Research, 20(4), pp.361-373.
45. Wyrobek, A.J., Gordon, L.A., Burkhart, J.G., Francis, M.W., Kapp Jr, R.W., Letz, G., Malling, H.V., Topham, J.C. and Whorton, M.D., 1983. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 115(1), pp.1-72.
46. Xu, D., Wu, L., Yang, L., Liu, D., Chen, H., Geng, G. and Li, Q., 2020. Rutin protects boar sperm from cryodamage via enhancing the antioxidative defense. Animal Science Journal, 91(1), p.e13328.
47. Zhu, Z., Fan, X., Lv, Y., Zhang, N., Fan, C., Zhang, P. and Zeng, W., 2015. Vitamin E analogue improves rabbit sperm quality during the process of cryopreservation through its antioxidative action. PloS one, 10(12), p.e0145383.