

علوم دامی ایران

دوره ۴۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳ (ص ۳۴۲-۳۳۵)

## اثر افزودن سطوح متفاوت سولفات روی به رقیق کننده منی بر کیفیت اسپرم گاو پس از انجماد-ذوب

فردین فرهادی<sup>۱</sup>، آرمین توحیدی<sup>۲\*</sup> و ملک شاکری<sup>۳</sup>

۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۶/۱۱)

### چکیده

هدف از این پژوهش، مقایسه اثر افزودن سطوح متفاوت روی به رقیق کننده منی بر ویژگی های حیاتی اسپرم پس از انجماد در گاو بود. اسپرم گیری از چهار گاو نر هشتتین هفته ای دو بار انجام شد و سپس نمونه های مناسب با هم مخلوط شدند. نمونه های اسپرم (در پنج تکرار) به چهار گروه شامل سطوح صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومول روی (Zn-0, Zn-50-Zn-100, Zn-150) اختصاص داده و منجمد شدند. نمونه های اسپرم بعد از انجماد از نظر جنبایی و ریخت شناختی، زنده مانگی، یکپارچگی غشا، سلامت آکروزوم، پراکندگی کروماتین اسپرم و تولید مالون دی آلدئید بررسی شدند. اختلاف معناداری در درصد جنبایی و ریخت شناسی اسپرم در محیط های دارای روی با گروه شاهد وجود نداشت. گروه های Zn-100 و Zn-150 دارای درصد بیشتری از اسپرم های با آکروزوم سالم در مقایسه با شاهد بودند ( $p < 0/005$ ). زنده مانگی و یکپارچگی غشا در گروه Zn-100 از گروه شاهد بهتر بود ( $P < 0/01$  و  $P < 0/05$ ). درصد اسپرم های با DNA آسیب دیده در گروه Zn-150 در مقایسه با گروه های دیگر بیشتر بود ( $p < 0/005$ ). درصد تولید مالون دی آلدئید در گروه Zn-100 و Zn-150 از بقیه گروه ها کمتر بود ( $P < 0/05$ ). بنابراین استفاده از روی در رقیق کننده منی گاو سبب بهبود برخی فراسنجه های اسپرم بعد از فرایند انجماد می شود.

**واژه های کلیدی:** اسپرم، رقیق کننده، روی، گاو.

### مقدمه

سلول های اسپرم در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها طی فرایند انجماد-ذوب ناکافی به نظر می رسد، زیرا غلظت آنتی اکسیدان ها در فرایند رقیق سازی کاهش قابل توجهی می یابد. از طرفی اسپرم پستانداران فاقد یک جزء سیستم پلاسمیک مهم آنتی اکسیدانی است که با آثار زیان بار رادیکال های فعال اکسیژنی و پراکسیداسیون لیپیدی مقابله کند (Surai *et al.*, 1998). محافظ سیستم های آنتی اکسیدانی در مرحله اول منشأ سیتوپلاسمی دارد و چون اسپرم در مرحله انتهایی تمایز، بخش بیشتری از سیتوپلاسم خود را از دست می دهد، در نتیجه رادیکال های آزاد در حین انجماد و

یکی از فناوری های مهم برای حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی، انجماد اسپرم است. با این حال انجماد باعث آسیب به اسپرم شامل کاهش جنبایی، زنده مانگی و آسیب به غشای اسپرم و DNA می شود (Vishwanath & Shannon, 2000; Medeiros *et al.*, 2002). آسیب ها شامل تشکیل بلورهای یخی، استرس اکسیداتیو، تغییرات اسمزی و سازمان دهی مجدد لیپید-پروتئین در غشای سلولی است (Bailey *et al.*, 2000). تنش اکسیداتیو از مهم ترین عوارض ناشی از فرایند انجماد-ذوب برای اسپرم است. ظرفیت آنتی اکسیدانی موجود در

صفات ژنتیکی به نسل بعد ضروری است. طی سال‌های گذشته علاوه بر ویژگی‌های حیاتی اسپرم مانند جنبایی و زنده‌مانی، سلامت DNA اسپرم پس از انجماد برای باروری کافی اسپرم مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین مراقبت از DNA اسپرم هنگام انجماد و یخ‌گشایی بسیار مهم است. رادیکال‌های آزاد طی انجماد و ذوب منی موجب مهار قدرت جنبایی، آسیب به DNA و نیز تغییر در شکل ظاهری سلول‌های اسپرم می‌شوند. افزودن روی به محیط رقیق‌کننده به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی از تأثیرات مخرب ROSها جلوگیری می‌کند، در نتیجه می‌تواند تأثیر مهمی در کاهش آسیب‌رسانی به DNA و پراکسیداسیون لیپید اسپرم طی انجماد منی داشته باشند (Kevist *et al.*, 1987).

عنصر روی همچنین با گروه‌های سولفدریل اسپرم در ارتباط است و باعث به‌وجود آمدن پیوندهای غیر کوالان Zn...S می‌شود. گروه‌های سولفدریل در ساختار کروماتین اسپرم باعث تشکیل پیوندهای دی سولفیدی می‌شوند. وجود این پیوندها علت پایداری ساختار کروماتین اسپرم است. این پیوندها در افزایش متراکم شدن کروماتین اسپرم در فرایند اسپرماتوزن و در نتیجه محافظت بهتر طی فرایند انجماد-ذوب مؤثر هستند (Dissanayake *et al.*, 2010; Kotdawala *et al.*, 2012). اما در این خصوص در مورد گاو گزارشی وجود ندارد. بنابراین، هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر افزودن سطوح متفاوت روی به رقیق‌کننده منی گاو بر انجمادپذیری اسپرم و ویژگی‌های کیفی آن در گاو بود.

## مواد و روش‌ها

### طرح آزمایش

این پژوهش در مرکز آزمون نتاج گاوهای شیری و گوشتی ایران و گروه علوم دامی دانشگاه تهران واقع در کرج اجرا شد. رقیق‌کننده استفاده شده در این پژوهش رقیق‌کننده تجاری آندرومد (Minitube, Germany) بود و روی استفاده شده سولفات روی (Merck آلمان) بود. اسپرم‌گیری از چهار گاو نر بالغ هلشتاین انجام شد. جمع‌آوری منی با استفاده از مهبل مصنوعی هفته‌ای دو بار انجام گرفت. بی‌درنگ پس از جمع‌آوری منی و انتقال آن به آزمایشگاه بررسی‌های ابتدایی روی منی اجرا شد.

یخ‌گشایی باعث اختلال در عملکرد اسپرم می‌شوند (Aitken & Fisher, 1994). رادیکال‌های آزاد در غلظت‌های کنترل‌شده و پایین در عملکردهای خاصی از اسپرم از قبیل ظرفیت‌دار شدن و واکنش آکروزومی نقش تنظیم‌کننده دارند. بنابراین برای درک کامل عملکرد اسپرم باید تعادل مهم لیپیدها، رادیکال‌های فعال اکسیژنی و اجزای مختلف سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول را در نظر گرفت. اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌های لازم برای محافظت از غشای سلول‌های اسپرم و جلوگیری از تشکیل پراکسیداسیون اکسیژن لازم و ضروری است و می‌تواند اثرات زیان‌بار رادیکال‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داده و سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی منی از قبیل جنبایی و یکپارچگی غشا پس از ذوب شود (Aisen *et al.*, 2002). روی یکی از عوامل کمکی آنزیم سوپراکسیددسموتاز است که سبب دیس موتاسیون آنیون سوپر اکساید (ناشی از متابولیسم هوازی شده) می‌شود و آن را به هیدروژن پراکساید تبدیل می‌کند. روی علاوه بر نقش کوفاکتوری برای سوپر اکسید دیس موتاز با القای سیگنال‌های پاسخ به تنش در مقابله با استرس اکسیداتیو نقش دارد (Klotz *et al.*, 2003). روی با چند سازوکار به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم از ایجاد و گسترش آسیب‌های اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (Powell, 2000). روی به‌طور برگشت‌پذیری به اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره‌بلند متصل به فسفولیپیدهای غشایی مانند اسید آراشیدونیک متصل می‌شود. تصور می‌شود که روی سبب محافظت اسیدهای چرب غیراشباع در برابر اکسیداسیون ناشی از آهن در محیط درون تنی می‌شود (Hida *et al.*, 1995). معلوم شده که روی برای ساخت اسپرم و تولید تستوسترون ضروری است (Kvist *et al.*, 1987). اضافه کردن روی باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم می‌شود و لیپیدهای غشای اسپرم را از پراکسیداسیون محافظت می‌کند (Hidiroglou & Knipfel, 1984). غلظت روی مایع منی ارتباط مستقیم با جنبایی، زنده‌مانی و ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم‌ها دارد (Alavi-Shoushtari *et al.*, 2009).

کامل بودن DNA اسپرم برای انتقال موفقیت‌آمیز

و عدد پایانی به‌دست‌آمده به‌عنوان جنبایی هر نمونه در نظر گرفته شد.

#### یکپارچگی غشای اسپرم

در این پژوهش برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از آزمون هاس<sup>۱</sup> استفاده شد. بعد از یخ‌گشایی نی‌ها به داخل میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری تخلیه شده و ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شد و سپس قسمت بالای میکروتیوب که حاوی رقیق‌کننده بود، جداسازی و بعد از آن ۱۰ میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک که حاوی فروکتوز و سیترات سدیم بود، اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه با تهیه حدافل سه قطره (۱۰ میکرولیتر) از نمونه انکوبه‌شده، با استفاده از میکروسکوپ معکوس فاز کنتراست (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) بررسی شد. در هر گروه تیماری با استفاده از دوربین قرارگرفته روی میکروسکوپ عکس گرفته شد و حدافل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های با دم‌گره‌خورده نسبت به گرهنخورده محاسبه شد (Revell & Mrode, 1994).

#### زنده‌مانی

برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ ائوزین-نیگروزین استفاده شد. برای این رنگ‌آمیزی ۲۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم روی لام قرار داده شد. بیست میکرولیتر از رنگ آماده ائوزین-نیگروزین نیز برداشته و روی نمونه ریخته شد و با سمپلر نمونه به آرامی به هم زده شد تا اسپرم با رنگ آمیخته شود. پس از ۳۰ ثانیه، ۲۰ میکرولیتر از نمونه برداشته و بر گوشه لام دیگری گذاشته شد و با یک لام دیگر به آرامی گسترش یافت. پس از خشک‌شدن، لام در زیر میکروسکوپ (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ قرار گرفت. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگ‌شده و رنگ‌نشده محاسبه شد (WHO, 2010).

#### ریخت‌شناسی

برای بررسی ریخت‌شناسی در این پژوهش از محلول هانکوک استفاده شد. محیط هانکوک شامل ۶۲/۵

حجم بین ۴-۶ میلی‌لیتر، غلظت بیش از  $1/5 \times 10^9$  در هر میلی‌لیتر و جنبایی پیش‌رونده بیشتر از ۷۵ درصد در هر انزال، به‌عنوان منی بهینه در نظر گرفته شد. پس از اطمینان از سالم‌بودن نمونه‌ها، منی جمع‌آوری شده از چهار گاو نر با هدف از میان برداشتن تأثیرات فردی با یکدیگر آمیخته شدند. در این پژوهش پنج تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد.

#### روش انجماد و ذوب اسپرم

نمونه‌های اسپرم در چهار گروه شامل سطوح صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومول سولفات روی (Zn-0, Zn-50-Zn-) 100, Zn-150 تقسیم شدند. رقیق‌سازی طوری انجام شد که در هر پایوت، غلظت پایانی اسپرم به  $20 \times 10^6$  اسپرم زنده برسد. پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها داخل نی‌های ۰/۵ کشیده شد. سردسازی و بسته‌بندی نی‌ها با دستگاه نیمه‌خودکار (IMV, France) انجام گرفت. نی‌ها به مدت ۳-۴ ساعت در سردخانه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به دستگاه انجماد (IMV, France) که قبلاً دمای آن به ۴ درجه سانتی‌گراد رسیده بود، منتقل شد و در ۹ دقیقه دمای آن به  $-140$  درجه سانتی‌گراد رسید. در پی آن، نی‌ها داخل ازت مایع ( $-196$ ) غوطه‌ور شدند. برای ذوب منی پس از بیرون‌آوردن نی‌ها از نیتروژن مایع، نی‌ها ۳۰ ثانیه در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. برای ارزیابی (از هر تیمار برای هر تکرار) سه نی ذوب شد. سپس محتوای اسپرم به درون میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شد و ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد و سپس فراسنجه‌های اسپرم ارزیابی شد.

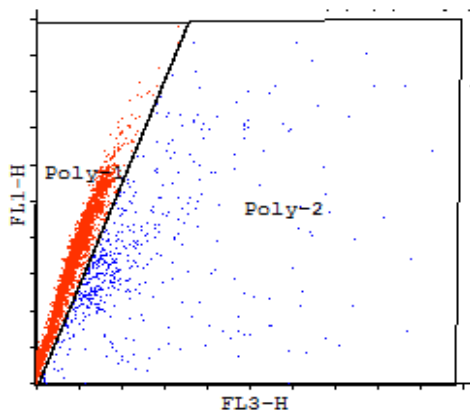
#### اندازه‌گیری فراسنجه‌های منی

##### جنبایی اسپرم

با استفاده از سمپلر ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از نمونه ذوب‌شده را روی لام گذاشته شده و با گذاشتن یک لامل، نمونه روی لام پخش شد. جنبایی اسپرم با استفاده از دستگاه آنالیز کامپیوتری اسپرم (Minitube-Germany) ارزیابی شد. برای برآورد درصد جنبایی اسپرم، سه میدان دید به‌صورت تصادفی گزینش و اجازه داده شد تا دستگاه آنالیز اسپرم میدان‌ها را بررسی کند

### سلامت کروماتین و DNA اسپرم

بررسی سلامت کروماتین و DNA اسپرم با تست<sup>۱</sup> SCSA و دستگاه فلوسایتومتری انجام شد. محتوای نی اسپرم بعد از یخ‌گشایی داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۵ دقیقه با دور ۵۰۰g سانتریفیوژ شد. بخش رویی به آرامی برداشته و دور ریخته شد. پلیت اسپرم باقیمانده در ۲ میلی‌لیتر بافر (۰/۱۵ میلی‌مول NaCl، ۱ میلی‌مول EDTA و ۱۰ میلی‌مولار تریس در pH=۷/۲) حل شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول برداشته و به آن ۴۰۰ میکرولیتر محلول اسیدی (۰/۱ درصد تریتون X-100 در ۰/۰۸ مول اسید هیدروکلریک و ۰/۱۵ مول NaCl) اضافه شد. بعد از ۳۰ ثانیه ۱۲۰۰ میکرولیتر آکریدین اورانژ (شامل ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول هیدروکلریک آکریدین اورانژ (A8097) در ۰/۱۵ مول NaCl، ۱ میلی‌مول EDTA، ۰/۲ میلی‌مول  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  و ۰/۱ میلی‌مول اسید سیتریک در pH=۶) اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه اسپرم‌ها با دستگاه فلوسایتومتری (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) ارزیابی شد. فلورسنت سبز نشان‌دهنده اسپرم با DNA سالم و فلورسنت قرمز نشان‌دهنده اسپرم دارای DNA آسیب‌دیده در نظر گرفته شد (Topraggaleh *et al.*, 2013) (نمودار ۱).



نمودار ۱. نمودار آنالیز فلوسایتومتری کروماتین اسپرم گاو بعد از انجماد-ذوب با رنگ‌آمیزی فلورسنت. POLY-1: نشان‌دهنده اسپرم‌هایی با DNA آسیب‌دیده. POLY-2: نشان‌دهنده اسپرم‌هایی با DNA سالم.

میلی‌لیتر فرمالین (۳۷ درصد)، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی سدیم، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر است. محلول نمکی سدیم شامل ۹/۰۱ گرم کلرید سدیم در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر شده است. محلول بافر خود از دو محیط جداگانه تشکیل شده است. محیط نخست شامل ۲۱/۶۸۲ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات دو ابدار ( $\text{H}_2\text{O}_2 \times \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و محیط دوم از ۲۲/۲۵۴ گرم فسفات پتاسیم ( $\text{KHPO}_4$ ) در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر تشکیل شده است. با مخلوط کردن ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط نخست با ۸۰ میلی‌لیتر از محیط دوم، ۲۸۰ میلی‌لیتر محلول بافر تهیه می‌شود (Hancock, 1956). برای ارزیابی چند قطره از هر نمونه منی به میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک اضافه شد. یک قطره از این محلول روی لام قرار داده شد و لامل به آرامی روی آن قرار گرفت و با استفاده از میکروسکوپ معکوس فاز کنتراست (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) بررسی شد. در هر گروه تیماری با استفاده از دوربین قرارگرفته روی میکروسکوپ عکس گرفته شد و حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. درصد اسپرم‌های طبیعی و اسپرم‌های غیرطبیعی شامل غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم محاسبه شد.

### سلامت آکروزوم

برای ارزیابی وضعیت سلامت آکروزومی اسپرم از پروب فلوروسنت<sup>۱</sup> PSA-FITC استفاده شد. رنگ PSA به اسپرم‌هایی دارای آکروزوم ناسالم که کلسیم‌شان تخلیه شده است، می‌چسبد. FITC رنگی فلورسنت است که به وسیله آن اسپرم‌های رنگ‌گرفته تشخیص داده می‌شود. ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید برای پیدا کردن الگو با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (BX51; Olympus, 400x) شمارش شد (Emamverdi *et al.*, 2013). اسپرم‌های دارای رنگ فلورسنت در ناحیه آکروزوم به عنوان اسپرم دارای آکروزوم سالم و اسپرم‌های بدون رنگ فلورسنت یا رنگ جزئی در این ناحیه به عنوان اسپرم دارای آکروزوم آسیب‌دیده یا گسیخته شمارش شدند.

2. Sperm Chromatin Structure Assay

1. Pisum sativum agglutinin linked to fluorescein isothiocyanate

۱۰۰ میکرومول روی دارای بیشترین مقدار بود و اختلاف معناداری با گروه شاهد داشت ( $P < 0.05$ ) (جدول ۱). در پژوهشی روی اسپرم گاومیش، نشان داده شد که روی موجود در پلاسما منی ارتباط مستقیمی با زنده‌مانی و جنبایی پیش‌رونده اسپرم‌ها دارد (Alavi-Shoushtari, 2009). بین روی پلاسما منی و تعداد اسپرم ارتباط قابل توجهی وجود دارد (Netter *et al.*, 1981). رادیکال‌های آزاد می‌توانند تأثیرات مضر و مفیدی بر عملکرد اسپرم داشته باشند. این تأثیرات متناسب با نوع و غلظت رادیکال‌های آزاد و مدت زمانی که اسپرم در معرض آن قرار می‌گیرد، متغیرند. نشان داده شده است که مقدار اندکی ROS توسط اسپرم‌ها در شرایط فیزیولوژیک ایجاد می‌شود که برای ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی اسپرم نیاز است، اما مقادیر زیاد آن با جنبایی و تعداد اسپرم رابطه منفی دارد (Agarwal *et al.*, 2006).

میانگین درصد یکپارچگی غشای اسپرم و سلامت آکروزوم در محیط حاوی ۱۰۰ میکرومول روی دارای بیشترین مقدار بود و به ترتیب اختلاف معناداری با سایر گروه‌ها و گروه شاهد و Zn-50 داشت (به ترتیب  $P < 0.01$  و  $P < 0.005$ ) (جدول ۲). افزودن روی به عنوان آنتی‌اکسیدان به رقیق‌کننده منی از بی‌ثباتی غشای اسپرم هنگام یخ‌گشایی جلوگیری و همچنین به حفظ محتویات آکروزوم کمک می‌کند (Bettger & O'Dell, 1981). افزایش رادیکال‌های آزاد در مایع منی موجب پراکسیداسیون لیپید و آسیب به غشای اسپرم و آکروزوم آن می‌شود (Hidroglou & Knipfel, 1984; Weisiger & Fridovich, 1973). در پژوهش حاضر نیز احتمالاً روی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی که دارد، مانع پراکسیداسیون لیپید و آسیب به غشا و آکروزوم شده است. در انسان محیط‌های سولفات روی دارای درصد بیشتری از اسپرم‌های با آکروزوم سالم در مقایسه با گروه شاهد بوده و اختلاف معناداری داشتند (Kotdawala *et al.*, 2012).

در این پژوهش میانگین درصد اسپرم‌های طبیعی در محیط‌های حاوی سولفات روی با گروه شاهد اختلاف معنادار نداشت (جدول ۱). مکمل روی در قوچ‌های جوان باعث افزایش تولید اسپرم روزانه و کاهش تولید اسپرم‌های غیرطبیعی شد (Underwood & Somers, 2008).

## مالون‌دی‌آلدئید

برای بررسی غلظت مالون‌دی‌آلدئید در این پژوهش از اسید تیوباریتوریک استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه منی با ۱ میلی‌لیتر EDTA، ۱ میلی‌لیتر BHT و ۲ میلی‌لیتر TCA با هم مخلوط و در لوله مخلوط ریخته شدند. لوله‌ها در  $1200 \times g$  برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ شدن، ۱ میلی‌لیتر از محلول بالای لوله با ۱ میلی‌لیتر TBA در میکروتیوب آمیخته شدند. لوله‌ها ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند. جذب نوری نمونه‌های مختلف به طول موج ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتری یادداشت شدند و در پایان غلظت مالون‌دی‌آلدئید محاسبه شد (Esterbauer & Cheeseman, 1990).

## آنالیز آماری

ارزیابی نرمال بودن داده‌ها با رویه univariate نرم‌افزار SAS انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SAS و به رویه GLM در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. میانگین داده‌ها به روش LSMeans مقایسه و اختلاف معناداری در سطح ۰/۰۵ گزارش شد.

## نتایج و بحث

در این بررسی محیط‌های حاوی روی بر درصد جنبایی اسپرم اثر معناداری نداشتند (جدول ۱). در پژوهشی که روی اسپرم انسان انجام گرفت، نشان داده شد که اضافه کردن سطح ۱/۲ میکرومول بر میلی‌لیتر روی به محیط کشت، کاهش معناداری در درصد جنبایی اسپرم بین زمان‌های صفر و چهار ساعت ایجاد می‌کند، یعنی با گذشت زمان درصد جنبایی کاهش می‌یافت. اما اضافه کردن ۰/۶ میکرومول بر میلی‌لیتر به محیط کشت سبب افزایش جنبایی اسپرم در مقایسه با گروه شاهد شد، هرچند اختلاف معناداری مشاهده نشد. همچنین درصد بازیافت اسپرم در گروه ۰/۶ میکرومول بر میلی‌لیتر بیشتر بود و تفاوت معناداری با گروه شاهد داشت (Dissanayake *et al.*, 2008).

میانگین درصد زنده‌مانی اسپرم در محیط حاوی

1969). همچنین رادیکال‌های آزاد در مایع منی موجب تغییر حرکت و مورفولوژی اسپرم می‌شود (Agarwal et al., 2006). در هر حال برخلاف گزارش‌های فوق، در مطالعه حاضر اثر روی بر مورفولوژی اسپرم دیده نشد.

جدول ۱. میانگین ( $\pm$  خطای استاندارد) درصد خصوصیات کیفی اسپرم بعد از انجماد در محیط‌های روی و گروه شاهد

مورفولوژی (%)	زنده‌مانی (%)	جنبایی پیش‌رونده (%)	جنبایی کل (%)	غلظت سولفات روی میکرو مول
۸۰/۸ $\pm$ ۱/۳۱	۷۰/۶ $\pm$ ۱/۲۵	۶۳/۹۸ $\pm$ ۲/۷۶	۷۱/۷۶ $\pm$ ۱/۲۳	۰
۸۱ $\pm$ ۱/۳۱	۷۳/۸ $\pm$ ۱/۲۵	۶۲/۲ $\pm$ ۲/۷۶	۷۱/۲ $\pm$ ۱/۲۳	۵۰
۸۵/۶ $\pm$ ۱/۳۱	<sup>b</sup> ۷۵/۲ $\pm$ ۱/۲۵	۶۶/۱۸ $\pm$ ۲/۷۶	۷۲/۵۸ $\pm$ ۱/۲۳	۱۰۰
۸۰/۴ $\pm$ ۱/۳۱	۷۱/۸ $\pm$ ۱/۲۵	۵۷/۲۶ $\pm$ ۲/۷۶	۶۸/۶۲ $\pm$ ۱/۲۳	۱۵۰

b. اختلاف معناداری با گروه کنترل ( $p < 0/05$ ).

اسپرم در فرایند اسپرماتوزنر شده و در محافظت بهتر طی فرایند انجماد-ذوب مؤثر است (Dissanayake et al., 2012; Kotdawala et al., 2010). اما برخلاف تصور، افزودن سولفات روی نه تنها نتوانست سبب بهبود شاخص سلامت کروماتین اسپرم شود، بلکه در محیط ۱۵۰ میکرو مول روی، قطعه‌قطعه شدن رشته DNA افزایش یافته و اختلاف معناداری با بقیه محیط‌های انجماد اسپرم داشت. با توجه به آنکه ترشحات غده پروستات هم واجد مقدار زیادی از عنصر روی بوده است، در نتیجه سطح اخیر روی افزوده شده در این مطالعه احتمالاً دارای تأثیر منفی بر کروماتین اسپرم بوده است. همچنین غلظت زیاد روی موجب کاهش جذب اکسیژن توسط سلول اسپرم شده و تأثیر منفی بر فراسنجه های اسپرم دارد (Kevist et al., 1987).

میانگین درصد DNA آسیب‌دیده در محیط ۱۵۰ میکرومول در مقایسه با محیط‌های دیگر بیشتر بود و اختلاف معناداری با گروه شاهد و سایر گروه‌ها داشت ( $p < 0/05$ ) (جدول ۲). در یک پژوهش روی اسپرم انسان سطح ۱۰۰ میکرومول روی در مقایسه با گروه شاهد و سطوح دیگر روی (۰، ۱۰، ۵۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، میکرومول) دارای درصد بیشتری از DNA سالم بود و اختلاف معناداری با گروه شاهد داشت (Kotdawala et al., 2012). روی باعث پایداری غشای سلول و کروماتین هسته اسپرم می‌شود و فاکتور اصلی در برابر فعالیت‌های ضد باکتری است (Chia et al., 2000) عنصر روی با گروه‌های سولفیدریل اسپرم در ارتباط است و باعث به‌وجود آمدن پیوندهای غیرکوالان s...Zn...s در ساختار کروماتین اسپرم می‌شود. در نتیجه سبب پایداری ساختار کروماتین

جدول ۲. میانگین ( $\pm$  خطای استاندارد) درصد خصوصیات کیفی اسپرم بعد از انجماد در محیط‌های روی و گروه شاهد

DNA آسیب‌دیده (%)	مالون دی‌آلدئید (%)	سلامت اکروزوم (%)	یکپارچگی غشا (%)	غلظت سولفات روی میکرو مول
۴/۳۷ $\pm$ ۰/۲	۱/۱۲ $\pm$ ۰/۱۳	۷۶/۷۸ $\pm$ ۱/۳۹	۶۱/۸ $\pm$ ۱/۱۴	۰
۴/۰۶ $\pm$ ۰/۲	۰/۸ $\pm$ ۰/۱۳	۷۷/۸ $\pm$ ۱/۳۹	۶۲/۵ $\pm$ ۱/۱۴	۵۰
۴/۲۴ $\pm$ ۰/۲	<sup>c</sup> ۰/۵۶ $\pm$ ۰/۱۳	<sup>a</sup> ۹۰/۰۹ $\pm$ ۱/۳۹	<sup>b</sup> ۶۸/۳ $\pm$ ۱/۱۴	۱۰۰
<sup>a</sup> ۵/۶۴ $\pm$ ۰/۲	<sup>c</sup> ۰/۶۷ $\pm$ ۰/۱۳	<sup>a</sup> ۸۱/۲۶ $\pm$ ۱/۳۹	۶۵/۳ $\pm$ ۱/۱۴	۱۵۰

a, b, c میانگین‌هایی که با گروه کنترل اختلاف معناداری دارند ( $p < 0/05$ ). <sup>a</sup>  $p < 0/01$ , <sup>b</sup>  $p < 0/05$ , <sup>c</sup>  $p < 0/05$ .

1979). در پژوهشی اثر روی بر آسیب‌های اکسیداتیو در بیضه موش‌ها بررسی شد و نتایج نشان داد که غلظت آهن در بیضه موش‌های با جیره غذایی کمبود روی، بیشتر بوده و تفاوت معناداری با جیره‌های غذایی دارای روی داشتند. آسیب‌های اکسیداتیو مشاهده شده ممکن است در اثر

میانگین درصد تولید مالون‌دی‌آلدئید در محیط‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومول روی کمتر بود و اختلاف معناداری با گروه شاهد داشت ( $P < 0/05$ ) (جدول ۲). روی با جایگزین کردن آهن (III) با آهن (II) مانع ورود آهن در چرخه تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (Ohkawa et al.,

اثبات برساند. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی از سطوح پایین‌تر سولفات روی یا اشکال شیمیایی دیگر روی برای ارزیابی چنین سازوکاری استفاده شود.

#### نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این پژوهش نشان داد که استفاده از دُز مناسب روی می‌تواند به عنوان مکملی مناسب در رقیق‌کننده منی از اسپرم گاو محافظت بهتری کند.

#### سپاسگزاری

از مسئولان محترم پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به دلیل فراهم کردن امکانات مالی و تجهیزاتی برای اجرای این طرح پژوهشی کمال قدردانی می‌شود. از مدیر عامل محترم شرکت نهاده‌های دامی جاهد جناب آقای مهندس ورناسری و مدیریت و کارکنان محترم مرکز آزمون نتاج گاوهای شیری و گاوهای شیرین ایران که امکانات مورد نیاز اجرای این طرح را مهیا کردند نیز تشکر و قدردانی می‌گردد.

افزایش رادیکال‌های آزاد مربوط به تجمع آهن در بافت یا کاهش فرایندهای آنتی‌اکسیدانی وابسته به روی رخ داده باشد (Oteiza *et al.*, 1995). اضافه کردن عنصر روی در نمونه‌های اسپرم انسان، تفاوت معناداری از لحاظ پراکسیداسیون چربی‌ها و تورم هاپیواسموتیک با گروه شاهد ایجاد کرد، بنابراین روی دارای تأثیرات آنتی‌اکسیدانی است (Arabi, 2005). غلظت اکسیژن با سطح بالای روی در مایع منی کاهش می‌یابد و باعث اختلال در مصرف اکسیژن توسط اسپرم می‌شود (Wong *et al.*, 2001).

در آزمایش حاضر اثر افزودن سولفات روی به محیط انجماد اسپرم گاو بر ویژگی‌های کیفی و حیاتی اسپرم ارزیابی شد. در این مطالعه خاصیت آنتی‌اکسیدانی سولفات روی و اثر مفید آن بر انجمادپذیری اسپرم با کاهش تولید مالون دی‌آلدهید نشان داده شد. همچنین، در این آزمایش برای نخستین بار در گاو احتمال دخالت عنصر روی در پایداری کروماتین اسپرم طی فرایند انجماد-ذوب ارزیابی شد. نتایج به‌دست‌آمده نتوانست چنین نقشی را برای سولفات روی در اسپرم گاو البته در سطوح بررسی‌شده به

#### REFERENCES

1. Agarwal, A., Gupta, S. & Sikka, S. (2006). The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 18(3), 325-332.
2. Aisen, E. G., Medina, V. H. & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57(7), 1801-1808.
3. Aitken, J. & Fisher, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, 16(4), 259-267.
4. Alavi-Shoushtari, S., Rezai, S. A., Ansari, M. K. & Khaki, A. (2009). Effects of the seminal plasma zinc content and catalase activity on the semen quality of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(2), 134-139.
5. Arabi, M. (2005). Antioxidant effect of manganese on human spermatozoa treated in the different conditions comparison with zinc, nickel, and trolox. *Iranian Journal of Biology*, 17 (3). (in Farsi)
6. Bailey, J. L., Blodeau, J. F. & Cormier, N. Y. (2000). Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon Minireview. *Journal of andrology*, 21(1), 1-7.
7. Bettger, W. J. & O'Dell, B. L. (1981). A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sciences*, 28(13), 1425-1438.
8. Chia, S.E., ONG, C.N., Chua, L.H., Ho, L.M. & Tay, S.K. (2000). Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *Journal of Andrology*, 21(1), 53-57.
9. Chvapil, M. (1973). New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sciences*, 13(8), 1041-1049.
10. Dissanayake, D. M. A. B., Wijesinghe, P. S., Ratnasooriya, W. D., Wimalasena, S. & Paliyawadana, T.S. (2006). Effects of different Zinc levels in the sperm culture medium on sperm recovery and quality of sperms in the swim up procedure for sperm processing. *Ceylon Journal of Medical Science*, 49, 21-27.
11. Emamverdi, M., Zhandi, M., Shahneh, A.Z., Akhlaghi, A. & Motlagh, M.K. (2014). Flowcytometric and microscopic evaluation of post-thawed ram semen cryopreserved in chemically defined home-made or commercial extenders. *Animal Production Science*, 55(4), 551-558.
12. Esterbauer, H. & Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*, 186, 407-421.
13. Hancock, J. (1956). The morphology of boar spermatozoa. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 76(3), 84-97.

14. Hida, H., Coudray, C., Calop, J. & Favier, A. (1995). Effect of antioxidants on adriamycin-induced microsomal lipid peroxidation. *Biological trace element research*, 47(1-3), 111-116.
15. Hidiroglou, M. & Knipfel, J. (1984). Zinc in mammalian sperm: a review. *Journal of Dairy Science*, 67(6), 1147-1156.
16. Klotz, L. O., Kröncke, K.D., Buchczyk, D. P. & Sies, H. (2003) Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *The Journal of nutrition*, 133(5), 1448-1451.
17. Kotdawala, A. P., Kumar., S., Salian, S. R., Thankachan, P., Govindraj, k. Kumar, P., Kalthur, G. & Adiga, S. k. (2012). Addition of zinc to human ejaculate prior to cryopreservation prevents freeze-thaw-induced DNA damage and preserves sperm function. *Journal of assisted reproduction and genetics* 29(12), 1447-1453.
18. Kvist, U., Björndahl, L. & Kjellberg, S. (1987). Sperm nuclear zinc, chromatin stability, and male fertility. *Scanning microscopy*, 1(3), 1241.
19. Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D. & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better *Theriogenology*, 57(1), 327-344.
20. Netter, A., Nahoul, K. & Hartoma, R. (1981). Effect of zinc administration on plasma testosterone, dihydrotestosterone, and sperm count. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 7(1), 69-73.
21. Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
22. Oteiza, P. I., Olin K. L., Fraga, C. G. & Keen C. L. (1995). Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *The Journal of Nutrition*, 125, 823-9.
23. Powell, S. R. (2000). The antioxidant properties of zinc. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1447S-1454S.
24. Revell, S. & Mrode, R. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal reproduction science*, 36(1), 77-86.
25. Surai, P., Blesbois, E., Grasseau, I., Chalah, T., Brillard, J. P., Wishart, G. J., Cerolini, S. & Sparks, N. H. C. (1998). Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 120(3), 527-533.
26. Topraggaleh, T., Shahverdi, A., Rastegarnia, A., Ebrahimi, B., Shafiepour, V. Esmaili, V. & Janzamin, E. (2014). Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of buffalo bull. *Andrologia*, 46(7), 777-783.
27. Underwood, E. Somers, M. (1969). Studies of zinc nutrition in sheep. I. The relation of zinc to growth, testicular development, and spermatogenesis in young rams. *Crop and Pasture Science*, 20(5), 889-897.
28. Vishwanath, R. & Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 23-53.
29. Weisiger, R. A. & Fridovich, I. (1973). Mitochondrial superoxide dismutase site of synthesis and intramitochondrial localization. *Journal of Biological Chemistry*, 248(13), 4793-4796.
30. WHO. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, World Health Organization.
31. Wong, W.Y., Flik, G., Groenen, P.M.W., Swinkels, D.W., Thomas, C. M. G., Copius- peereboom, H. J. C., Merkus, H. M. W. M. & Steegers-Theunissen, R. P. M. (2001). The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reproductive toxicology*, 15(2), 131-136.