

Effect of Low-Density Lipoprotein-based semen extender supplementation with cysteine on goat sperm quality after freezing

Javad Ghorbanzadeh-Savar¹ , Saeed Zeinoaldini^{2*} , Mahdi Zhandi³ , Sayyed Mohammad Hadi Hussaini⁴ 

1. Department of Animal Science, faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: Javad.ghorbanzadeh@gmail.com
2. Corresponding author, Department of Animal Science, faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: zeinoaldini@ut.ac.ir
3. Department of Animal Science, faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: mzhandi@ut.ac.ir
4. Department of Animal Science, faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: Hosseini.sayyed@ut.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received 10 Nov 2024
Received in revised form 17 Apr 2026
Accepted 21 Apr 2026
Available online 21 Apr 2026

Keywords:
Antioxidants,
Freezing,
Goat,
Quality,
Sperm

ABSTRACT

Objective: This study aimed to investigate the effect of adding cysteine to an Low Density Lipoprotein (LDL)-based extender on some quality parameters of goat sperm after freezing.

Method: This study was conducted in a completely randomized design with four treatments, including: egg yolk-based extender without cysteine (EY), LDL-based extender containing zero (LDL-C0), five (LDL-C5), and 10 (LDL-C10) mM cysteine, and six replicates. Semen samples after dilution with the aforementioned extenders, were frozen. After thawing, total and progressive motility (CASA system), sperm plasma membrane integrity (eosin-negrosin staining), functionality (HOS test), and sperm morphology (Hancock solution) were evaluated.

Results: Total motility was higher in LDL-C5 compared to EY and LDL-C10 ($P < 0.05$). Progressive motility in all treatments using LDL-based extender was significantly higher than EY. Other motility parameters were higher in LDL-C5 compared to EY ($P < 0.05$). However, no significant differences were observed between the LDL-C0, LDL-C5, and LDL-C10, except for the VSL, which was significantly lower in LDL-C0 compared to LDL-C5 ($P < 0.05$). Sperm plasma membrane integrity, functionality, and sperm morphology were higher in all treatments using LDL-based extender compared to EY ($P < 0.05$), with the highest values observed in LDL-C5.

Conclusions: Overall, the results showed that adding 5 mM cysteine to the LDL-based extender can improve some quality parameters of goat sperm and using semen from this group may enhance both in vitro and in vivo fertility.

Cite this article: Ghorbanzadeh J, Zeinoaldini S, Zhandi M, Hussaini SM(2026),. Effect of Low-Density Lipoprotein-based semen extender supplementation with cysteine on goat sperm quality after freezing. Nova Biologica Reperta. , 13 (1), 1-17. <http://doi.org/10.22034/nbr.2026.11546>



© The Author(s).
DOI: <http://doi.org/10.22034/nbr.2026.11546>

Publisher: Kharazmi University.

Introduction

Freezing-induced damage to sperm occurs mainly due to the formation of ice crystals and the increased concentration of components within semen and spermatozoa. During artificial insemination procedures, sperm are exposed to oxygen and visible light during processes such as evaluation and storage, which ultimately lead to the generation of reactive oxygen species (ROS) and reduced sperm motility. Stress caused by ice crystal formation is consistently accompanied by changes in osmotic pressure within the unfrozen fraction. Intracellular damage can be minimized by using a slow-freezing protocol, thereby reducing cell death. Although the exact cause of reduced fertility in frozen or chilled stored sperm has not been well established, extensive studies have investigated effective antioxidants to neutralize the harmful effects of ROS on sperm quality. One of the antioxidants proposed for sperm protection is cysteine. Cysteine can inhibit the activity of toxic oxygen metabolites that induce lipid peroxidation of the sperm plasma membrane. Previous studies have shown that supplementation with cysteine before freezing and after thawing improves sperm viability, motility, acrosome integrity, and reduces ROS levels in ram sperm.

On the other hand, egg yolk has been widely used for many years as a non-penetrating cryoprotectant in the freezing of semen from various animal species and even humans. The main protective component of egg yolk is low-density lipoprotein (LDL), which helps preserve membrane integrity during freezing. However, studies have shown that egg yolk may reduce post-thaw sperm viability and acrosome integrity in some species, including rams. Although the protective effects of egg yolk against cryopreservation-induced sperm damage have been well documented, it should be noted that egg yolk contains a variety of components that may affect outcomes. Therefore, researchers have proposed using LDL, the principal protective fraction of egg yolk, to retain its beneficial effects while minimizing the disadvantages associated with whole egg yolk. Based on these considerations, the present study was conducted to evaluate the effect of supplementing an LDL-based extender with the amino acid cysteine on the post-thaw quality of goat sperm.

Method

In this experiment, semen samples were collected using an artificial vagina twice weekly for three consecutive weeks. After initial evaluation, the selected ejaculates were pooled and divided into four equal aliquots. Each aliquot was diluted with one of the following extenders: (1) an egg yolk-based extender without cysteine (EY), (2) an LDL-based extender without cysteine (LDL-C0), (3) an LDL-based extender supplemented with 5 mM cysteine (LDL-C5), and (4) an LDL-based extender supplemented with 10 mM cysteine (LDL-C10). Following dilution, the samples were frozen using liquid nitrogen. After thawing, several sperm quality parameters were evaluated. These included total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), straight-line velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude of lateral head displacement (ALH, μm), beat cross frequency (BCF, Hz), linearity (LIN, %), and straightness (STR, %). These parameters were assessed using a computer-assisted sperm analysis system (CASA; IVOS Version 12, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA). In addition, sperm plasma membrane integrity and

morphology were evaluated using eosin–nigrosin staining, while the sperm plasma membrane functionality was assessed using the hypo-osmotic swelling test (HOST). The data were analyzed using the GLM procedure of SAS software (Version 9.1), and treatment means were compared using Duncan's multiple range test.

Results

The results of this study showed that total motility was significantly higher in the LDL-C5 treatment than in the EY and LDL-C10 treatments, whereas no significant difference was observed between LDL-C5 and LDL-C0. Progressive motility was significantly higher in all LDL-based extender treatments than in the EY treatment. However, no significant differences were found among the LDL-C0, LDL-C5, and LDL-C10 groups. The results for LIN, VSL, VCL, VAP, STR, and ALH showed that all of these parameters were significantly higher in the LDL-C5 treatment than in the EY treatment. However, no significant differences were observed among the LDL-C0, LDL-C5, and LDL-C10 treatments, except for VSL, which was significantly lower in the LDL-C0 group than in the LDL-C5 group. The results for plasma membrane integrity, plasma membrane functionality, and normal sperm morphology indicated that all LDL-based extender treatments produced significantly higher values than the EY treatment. Furthermore, among the LDL-based treatments, the LDL-C5 group showed significantly higher values than both the LDL-C0 and LDL-C10 groups.

Conclusions

The results of this study showed that progressive motility, other motility parameters, plasma membrane integrity, plasma membrane functionality, and normal sperm morphology were significantly better in all treatments using the LDL-based extender compared to the egg yolk-based extender. These findings are consistent with previous studies that evaluated the effects of LDL-based extenders on post-thaw sperm quality in rabbits, bulls, and rams. In addition, our results agree with studies investigating the supplementation of cysteine in ram and bull semen extenders. The improvement in sperm motility and related motility parameters observed in the LDL-based extender supplemented with cysteine is likely due to the removal of harmful egg yolk components and the protective effect of cysteine on the functional integrity of the acrosome and mitochondria. It has been suggested that the main mechanism by which LDL protects sperm is through its binding to seminal plasma proteins. By binding to these proteins, LDL prevents their interaction with the sperm membrane. Furthermore, LDL contributes its phospholipids and cholesterol to the sperm plasma membrane, replacing lost membrane components and helping to restore membrane structure and stability. Cysteine is a non-essential amino acid with free radical scavenging properties. It also serves as a precursor for intracellular glutathione, the level of which decreases during the freeze–thaw process.

Overall, the findings of this study indicate that the use of an extender containing 8% LDL and 5 mM cysteine can improve the post-thaw quality of goat sperm. This improvement is likely

associated with the ability of cysteine to neutralize reactive oxygen species and the role of LDL in restoring the sperm plasma membrane.

Author Contributions

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

We would like to express our sincere gratitude for the financial support provided by the University of Tehran for this research.

Ethical Considerations

The study was approved by the Ethics Committee of the University of Tehran (Ethical code: 712501043.6.15). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

The study was funded by the University of Tehran. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

اثر مکمل سازی رقیق کننده بر پایه لیپوپروتئین کم چگال با سیستمین بر کیفیت اسپرم بز پس از انجماد

جواد قربانزاده سوار^۱، سعید زین الدینی^۲✉، مهدی ژندی^۳، سید محمد هادی حسینی^۴

۱. گروه علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: Javad.ghorbanzadeh@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: zeinoaldini@ut.ac.ir

۳. گروه علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mzhandi@ut.ac.ir

۴. گروه علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: Hosseini.sayyed@ut.ac.ir

چکیده

اطلاعات مقاله

مقدمه: هدف از انجام این آزمایش، بررسی اثر افزودن سیستمین در رقیق کننده بر پایه لیپوپروتئین کم چگال (Low Density Lipoprotein, LDL) بر برخی فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز، پس از انجماد بود. **مواد و روش‌ها:** این پژوهش، در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار شامل: رقیق کننده بر پایه زرده تخم مرغ فاقد سیستمین (EY)، رقیق کننده بر پایه LDL و حاوی سطوح صفر (LDL-C0)، پنج (LDL-C5) و ۱۰ (LDL-C10) میلی مول سیستمین و شش تکرار انجام شد. نمونه های منی پس از رقیق سازی با رقیق کننده های فوق، منجمد شدند. پس از ذوب، فراسنجه های تحرک کل و پیش رونده (سیستم کاسا)، یکپارچگی (رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین)، فعالیت غشاء (ازمون HOS) و ریخت شناسی اسپرم (محیط هانکوک) ارزیابی شدند.

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۰۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۲/۰۱

نتایج: میزان تحرک کل در تیمار LDL-C5، نسبت به تیمار EY و LDL-C10 بیشتر بود ($P < 0.05$). تحرک پیش رونده در تمام تیمارهای ی که از رقیق کننده بر پایه LDL استفاده کرده بودند به طور معنی داری نسبت به تیمار EY بیشتر بود. سایر ویژگی های تحرک در تیمار LDL-C5 نسبت به تیمار EY بالاتر بود ($P < 0.05$)، در حالی که بین تیمارهای LDL-C0، LDL-C5 و LDL-C10 تفاوت معنی داری مشاهده نشد، به جز در فراسنجه VSL که در LDL-C0 نسبت به LDL-C5 به طور معنی داری کمتر بود ($P < 0.05$). یکپارچگی و فعالیت غشاء و همچنین ریخت شناسی طبیعی اسپرم در تمام تیمارهای ی که از رقیق کننده بر پایه LDL استفاده کرده بودند، نسبت به تیمار EY بیشتر بود ($P < 0.05$)، به طوری که بیشترین مقدار مربوط به LDL-C5 بود.

کلیدواژه‌ها:

آنتی اکسیدان،

اسپرم،

انجماد،

بز،

کیفیت

نتیجه گیری: به طور کلی نتایج نشان داد که افزودن پنج میلی مول سیستمین به رقیق کننده بر پایه LDL می تواند برخی فراسنجه های کیفی اسپرم بز را بهبود بخشد و احتمالاً استفاده از اسپرم های این گروه باعث بهبود باروری طبیعی و آزمایشگاهی شود.

استناد: قربانزاده، زین الدینی، ژندی، حسینی، سید محمد هادی. (۱۴۰۵)، اثر مکمل سازی رقیق کننده بر پایه لیپوپروتئین کم چگال با سیستمین بر کیفیت اسپرم بز پس از انجماد. یافته های نوین در علوم زیستی، ۱۲ (۱)، ۲۰-۱۱۵۴۶. <http://doi.org/10.22034/nbr.2026.11546>

مقدمه

آسیب‌های حاصل از انجماد در اسپرم، در اثر تشکیل بلورهای یخی و همچنین افزایش غلظت ترکیبات درون مایع منی و اسپرم به وجود می‌آیند (Pesch & Bergmann, 2006). زمانی که اسپرم برای تلقیح مصنوعی استفاده می‌شود در معرض اکسیژن و نور مرئی در حین فرآیندهایی مثل ارزیابی و ذخیره‌سازی قرار می‌گیرد که نهایتاً منجر به تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش تحرک اسپرم می‌شود (Foote et al., 1993; Miller & Schultz, 1987). تنش حاصل از تشکیل بلورهای یخی، همواره با تغییر در فشار اسمزی در بخش یخ‌زده همراه است. آسیب درون سلولی را می‌توان با انجام مراحل انجماد به‌طور آهسته کاهش داد که نتیجه‌ی آن عدم مرگ سلولی است. دلیل کاهش باروری در اسپرم ذخیره شده به صورت منجمد و یا سرد به‌طور کامل مشخص نشده است اما اخیراً شواهد زیادی برای نقش ROS در کنش و ظرفیت بارور سازی اسپرم طی انجماد به وجود آمده است (Aitken, 2017). گونه‌های فعال اکسیژن در اسپرم بالغ نقش مهمی در ظرفیت‌دارشدن، پایداری صفحات میتوکندریایی و تحرک اسپرم دارد. پروتئین‌های درگیر در زنجیره انتقال الکترون محل احتمالی برای تولید ROS هستند. مطالعات گسترده‌ای برای یافتن آنتی‌اکسیدان‌های مؤثر برای مقابله با اثرات گونه‌های فعال اکسیژن بر کیفیت اسپرم صورت گرفته است (Amidi et al., 2016; Vichas et al., 2018). یکی از آنتی‌اکسیدان‌های مطرح شده برای محافظت از اسپرم، سیستئین می‌باشد (Bansal & Bilaspuri, 2011; Sikka, 1996). سیستئین اسید آمینه‌ای با وزن مولکولی پایین است که حاوی گروه تیول می‌باشد. گروه‌های تیول مانع تشکیل پراکسید هیدروژن در اسپرم می‌شوند. همچنین، تیول پیش‌ماده‌ی بیوسنتز گلوپروتئین‌ها داخل سلولی است و سطح آن را افزایش می‌دهد. از طرف دیگر، سیستئین می‌تواند از فعالیت متابولیت‌های سمی اکسیژن که باعث پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم می‌شوند، جلوگیری کند (Sagrístá et al., 2002; Uysal & Bucak, 2007). گلوپروتئین مولکولی است که در سطح میلی‌مولار در بسیاری از سلول‌ها یافت می‌شود و قادر است با بسیاری از انواع گونه‌های فعال اکسیژنی به‌طور مستقیم واکنش دهد و میزان آن‌ها را از طریق بیوسنتز چرخه گلوتامین کاهش دهد (Uysal & Bucak, 2007). گلوپروتئین کوفاکتور گلوپروتئین پراکسیداز نیز می‌باشد که باعث کاهش سمیت هیدروژن پراکسید می‌شود و سلول‌های پستانداران را در مقابل تنش اکسیداتیو محافظت می‌کند (Hendin et al., 1999). سیستئین به‌عنوان یک ماده محافظ در مقابل آسیب‌های ناشی از انجماد عمل می‌کند (Uysal & Bucak, 2007) و نشان داده شده است که باعث بهبود تحرک و مورفولوژی اسپرم‌های گاو (Bilodeau et al., 2001a; Sariözkan et al., 2009)، قوچ (Uysal & Bucak, 2007) و بز (Bucak & Uysal, 2008) می‌شود. همچنین مشخص شده است که تیمار سیستئین زنده‌مانی، ساختار کروماتین و یکپارچگی غشای اسپرم خوک را در زمان ذخیره سازی در دمای ۵ درجه بهبود می‌بخشد (Szcześniak-Fabiańczyk et al., 2003). مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از سیستئین پیش از انجماد و پس از ذوب باعث بهبود زنده‌مانی، تحرک، یکپارچگی آکروزوم و همچنین کاهش ROS در اسپرم قوچ شده است (Kafi et al., 2024). علاوه بر اثرات نام‌برده شده، سیستئین باعث بهبود بلوغ و باروری اووسیت در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (Jeong & Yang, 2001). زرده‌ی تخم‌مرغ سال‌های زیادی است که به عنوان محافظ انجمادی غیرنفوذی در انجماد منی حیوان‌های گوناگون و حتی انسان استفاده می‌شود. مهمترین بخش نگهدارنده زرده تخم‌مرغ، LDL می‌باشد که از یکپارچگی غشاء طی انجماد محافظت می‌کند (Tonieto et al., 2010). نشان داده شده است که زرده تخم‌مرغ می‌تواند زنده‌مانی و یکپارچگی آکروزوم را بعد از انجماد در برخی گونه‌ها از قبیل قوچ کاهش دهد (Forouzanfar et al., 2010). اگرچه اثرات مثبت زرده تخم‌مرغ بر محافظت از اسپرم در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد به طور قابل توجهی گزارش شده است اما باید در نظر داشت که زرده تخم‌مرغ دارای ترکیبات متفاوتی است که می‌تواند نتایج را تحت تأثیر قرار دهد (Forouzanfar et al., 2010). بنابراین پیشنهاداتی توسط پژوهش‌گران مبنی بر چگونگی اثرگذاری زرده در محافظت از اسپرم (که توسط LDL می‌باشد) و کاهش عوامل منفی استفاده از زرده تخم‌مرغ بیان شد (Manjunath et al., 2002) و پژوهش‌ها را به سمت خالص‌سازی LDL و استفاده از آن سوق داد. در مطالعه‌ای، روشی برای استخراج LDL از زرده تخم‌مرغ به منظور استفاده در رقیق‌کننده منی گاو پیشنهاد شد که بسیار کارآمدتر از روش‌های پیشین بود (Moussa et al., 2002). طی فرایند انجماد-ذوب، سازماندهی لیپیدها و ترکیبات شیمیایی غشای پلاسمایی اسپرم به هم می‌ریزد. مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که

سازوکار اصلی LDL در محافظت از اسپرم از طریق چسبیدن به پروتئین های پلاسمای منی است (Hu et al., 2010; Manjunath et al., 2002). با توجه به مطالب گفته شده، این مطالعه با هدف بررسی اثر افزودن آمینواسید سیستمین در رقیق کننده بر پایه LDL بر کیفیت اسپرم بز بعد از انجماد- ذوب انجام شد.

مواد و روش ها

تمامی مراحل مربوط به حیوانات مطابق با دستورالعمل های کمیته مراقبت و استفاده از حیوانات دانشگاه تهران انجام شد و توسط کمیته اخلاق [با کد ۷۱۵۶۹/۶/۱۳۵] تایید گردید. در این آزمایش نمونه های منی از چهار رأس بز نر نژاد مهابادی، با استفاده از واژن مصنوعی، به مدت سه هفته و دو بار در هفته (در مجموع شش تکرار) به دست آمد. پس از جمع آوری منی و انتقال آن به آزمایشگاه، بررسی های اولیه انجام گرفت و در صورتی که نمونه های منی حجمی بالاتر از یک میلی لیتر و دارای اسپرم با تحرک بالای ۷۰ درصد بودند برای ادامه آزمایش انتخاب شدند. نمونه ها پس از انتخاب با هم مخلوط و سپس به چهار قسمت مساوی تقسیم شده و هر قسمت با یکی از رقیق کننده های ذیل رقیق شدند. رقیق کننده ها عبارت بودند از: ۱) رقیق کننده بر پایه زرده تخم مرغ فاقد سیستمین (EY)، ۲) رقیق کننده بر پایه LDL و حاوی سطوح صفر (LDL-C0)، ۳) پنج (LDL-C5) و ۴) ۱۰ (LDL-C10) میلی مول سیستمین بودند.

انجماد منی

پس از رقیق سازی نمونه ها با رقیق کننده های ذکر شده، لوله های آزمایش حاوی منی رقیق شده به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و سپس به داخل یخچال منتقل شدند تا پس از سپری کردن دو ساعت زمان تعادل به دمای چهار درجه برسند. پس از آن، نمونه ها به داخل نی های یک چهارم سی سی کشیده شدند و طرف باز آن با استفاده از پودر پلی وینیل الکل بسته شدند. در مرحله ی بعد، نی های بسته شده به مدت ۱۲ دقیقه روی بخار ازت قرار گرفته و سپس وارد ازت شدند تا در دمای منفی ۱۹۶ درجه سانتی گراد منجمد شوند. برای ساخت رقیق کننده (محیط پایه) از ترکیب تریس، اسید سیتریک، فروکتوز [به ترتیب به مقدار ۳/۰۲، ۱/۷، ۱/۲۵ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر] به همراه پنج درصد (حجمی / حجمی) گلیسرول استفاده شد.

استخراج LDL از زرده ی تخم مرغ

ابتدا تخم مرغ های تازه شکسته شده و زرده ها از آلبومین جدا شدند. هر زرده برای حذف شالاز و تکه های آلبومین که به غشای ویتلین چسبیده اند روی فیلتر کاغذی به دقت غلطانده شد. غشای ویتلین به آرامی توسط تیغه جراحی بریده و زرده با قرار دادن در آب سرد جمع آوری شد. پلاسما به وسیله روش ارائه شده توسط مک بی و کوتریل جداسازی شد (Mc Bee and Cotterill, 1979). این روش به این گونه است که ابتدا زرده با محلول ایزوتونیک نمکی (۰/۱۷ NaCl مولار) رقیق شده و برای یک ساعت توسط شیکر تکان داده شده و بلافاصله سانتریفیوژ ($10000 \times g$ در ۴ درجه ی سانتی گراد برای ۴۵ دقیقه) می شود. محلول شناور رویی (پلازما) گرفته و برای حذف کامل گرانول ها بار دیگر به همان ترتیب فوق سانتریفیوژ شد. سپس پلازما برای استخراج LDL در دمای چهار درجه سانتی گراد نگهداری شد. پلاسمای به دست آمده با ۴۰ درصد سولفات آمونیوم ترکیب و برای یک ساعت با شیکر تکان داده شد. دما در چهار درجه سانتی گراد تثبیت و سانتریفیوژ ($10000 \times g$ در ۴ درجه سانتی گراد برای ۴۵ دقیقه) انجام و محلول شناور از رسوب جدا شد. محلول شناور به مدت حداقل شش ساعت در معرض آب مقطر برای حذف سولفات آمونیوم مورد دیالیز قرار گرفت و سپس برای حذف کامل سولفات آمونیوم، سانتریفیوژ شد ($10000 \times g$ در ۴ درجه ی سانتی گراد برای ۴۵ دقیقه) و باقی مانده شناور که غنی از LDL است، جمع آوری گردید (Moussa et al., 2002).

ارزیابی فراسنجه‌های تحرک و سرعتی اسپرم

فراسنجه‌های تحرک و سرعتی اسپرم به وسیله سیستم آنالیز کامپیوتری (CASA, Version 12 IVOS, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) ارزیابی شدند. فراسنجه‌های به دست آمده به شرح ذیل هستند: تحرک کل (TM، درصد)، تحرک پیش‌رونده (PM، درصد)، میانگین سرعت در مسیر (VAP، میکرومتر در ثانیه)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL، میکرومتر در ثانیه)، سرعت در مسیر منحنی (VCL، میکرومتر در ثانیه)، تحرک عرضی سر (ALH، میکرومتر)، تناوب عرضی زنش (BCF، هرتز)، درصد خطی بودن تحرک (LIN، درصد) و راستی مسیر طی شده (STR، درصد).

ارزیابی یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم

برای ارزیابی یکپارچگی غشاء پلاسمایی و همچنین ریخت شناسی اسپرم از رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد (Salmani et al., 2013). برای این رنگ آمیزی، ۲۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم و ۲۰ میکرولیتر از رنگ آماده شده ائوزین-نیگروزین روی لام از پیش گرم شده قرار گرفته و مخلوط شدند. پس از گذشت ۳۰ ثانیه، از قطره مخلوط یک گسترش روی لام تهیه شد و لام به سرعت خشک شد. لام حاصل زیر میکروسکوپ نوری (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفت. از هر لام تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های رنگ نشده (زنده) محاسبه شد.

ارزیابی فعالیت غشاء پلاسمایی اسپرم

فعالیت غشاء پلاسمایی اسپرم به وسیله تست تورم هاپپواسموتیک (HOST) بررسی شد (Salmani et al., 2013). به طور خلاصه، برای انجام این تست ۳۰ میکرولیتر نمونه منی با ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هاپپواسموتیک با فشار اسموزی ۱۰۰ میلی اسمول بر کیلوگرم مخلوط و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ان کوبه شدند. سپس یک قطره از مخلوط فوق روی لام ریخته و گسترش تهیه شد. لام حاصل زیر میکروسکوپ فاز کنتراست (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفت. از هر لام تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای دم گره‌خورده (اسپرم های دارای غشاء فعال) محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱، رویه‌ی GLM آنالیز و میانگین تیمارها تو سط آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. سطح معنی‌داری در این آزمایش ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. مدل آماری به شرح ذیل بود.

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

Y_{ij} : مشاهدات

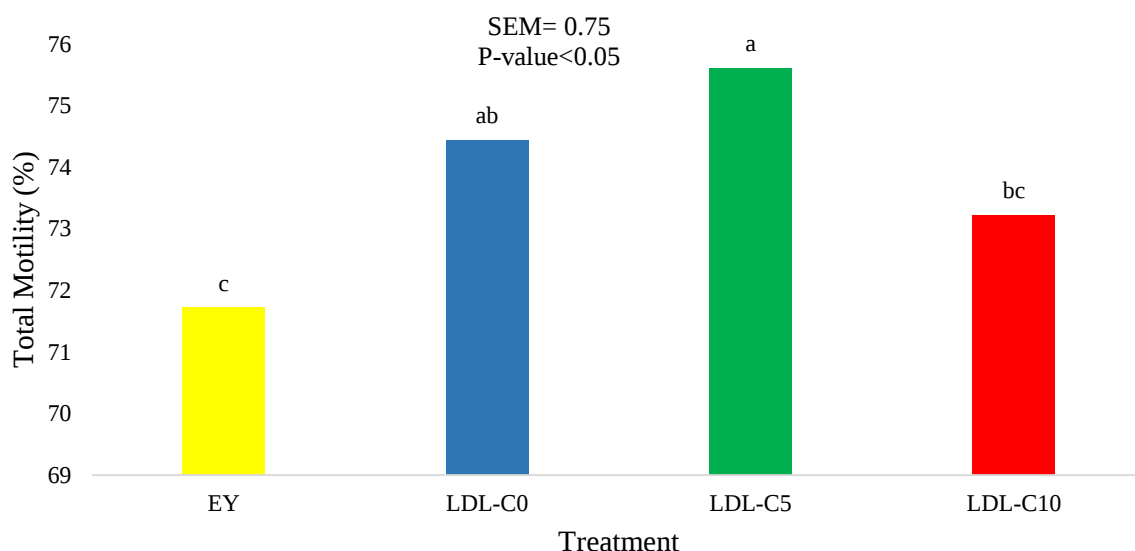
μ : میانگین جامعه

T_{ij} : اثر اثر نوع رقیق‌کننده

e_{ij} : اثرات باقیمانده

نتایج

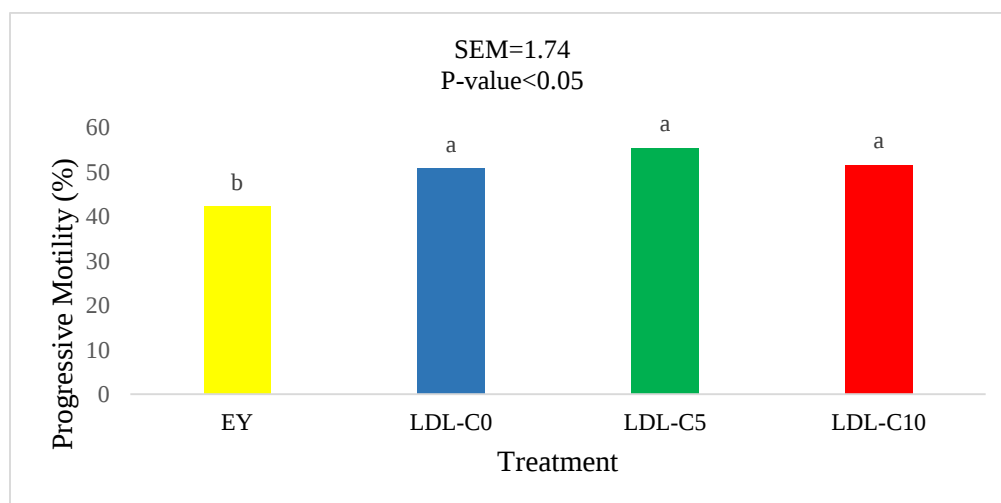
نتایج مربوط به تحرک کل در نمودار ۱ نشان داده شده است. یافته‌های این مطالعه نشان داد که تحرک کل در تیمار LDL-C5، نسبت به تیمار EY و LDL-C 10 بیشتر بود ($P < 0.05$)، در حالی که نسبت به گروه LDL-C0 تفاوت معنی داری نداشت ($P > 0.05$).



نمودار ۱- اثر سیستئین بر تحرک کل اسپرم (LS mean $\pm$ SEM)

Figure 1. effect of cysteine on sperm total motility

نمودار ۲ نمایانگر نتایج مربوط به تحرک پیش‌رونده است. داده‌های مربوط به تحرک پیش‌رونده نشان دادند که تحرک پیش‌رونده در تمام تیمارهای که از رقیق کننده بر پایه LDL استفاده کرده بودند به طور معنی داری نسبت به تیمار EY بیشتر بود ($P < 0.05$) در حالی که بین خود آن‌ها (صفر، ۵ و ۱۰ درصد سیستئین) تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).



نمودار ۲- اثر سیستئین بر تحرک پیش‌رونده اسپرم (LS mean $\pm$ SEM)

Figure 2. effect of cysteine on sperm progressive motility

نتایج مربوط به اثر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های تحرک، شامل LIN، VSL، VCL، VAP، STR و ALH در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که تمام فراسنجه‌های نام‌برده، در تیمار LDL-C5 نسبت به تیمار EY به طور معنی داری بالاتر بود.

($P < 0.05$)، درحالی‌که بین تیمارهای LDL-C0، LDL-C5 و LDL-C10 تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$)، به‌جز در فراسنجه VSL که در LDL-C0 نسبت به LDL-C5 به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0.05$).

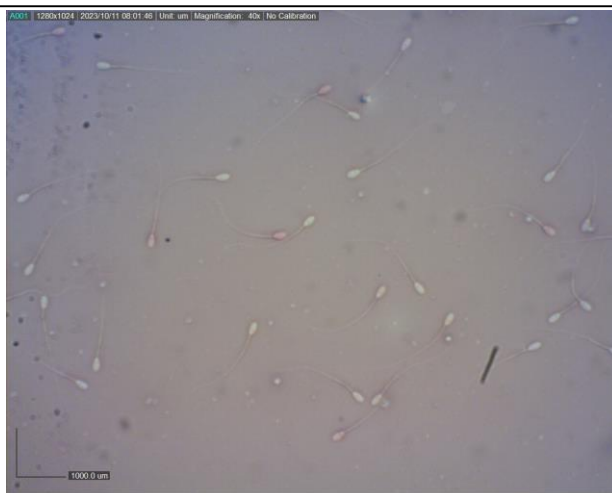
جدول ۱- اثر سیستئین بر ویژگی‌های حرکتی اسپرم (LS mean $\pm$ SEM)

Table 1. Effect of cysteine on sperm motility characteristics

P-value	SE	LDL-C10	LDL-C5	LDL-C0	EY	صفات
*	۲/۸۷	۴۷/۲۵ ^a	۵۱/۷۶ ^a	۴۳/۱۰ ^a	۳۰/۸۹ ^b	سرعت در مسیر میانگین (VAP)
*	۲/۳۲	۳۶/۵۰ ^{ab}	۴۰/۴۶ ^a	۳۳/۱۳ ^b	۲۳/۸۸ ^c	سرعت در مسیر مستقیم (VSL)
*	۴/۹۲	۹۱/۶۶ ^a	۹۸/۳۰ ^a	۸۴/۰۷ ^a	۶۰/۷۷ ^b	سرعت در مسیر منحنی (VCL)
*	۰/۱۳	۲/۳۴ ^a	۲/۴۲ ^a	۲/۲۴ ^{ab}	۱/۸۶ ^b	تحرک عرضی سر (ALH)
*	۰/۰۱	۶۲/۷۲ ^{ab}	۶۵/۵۳ ^a	۶۵/۰۹ ^a	۵۸/۴۱ ^b	راستی مسیر طی شده (STR)
*	۰/۰۰۹	۳۲/۲۲ ^{ab}	۳۴/۶۶ ^a	۳۳/۴۰ ^a	۳۰/۰۱ ^b	خطی بودن تحرک (LIN)

حروف غیرمشابه تفاوت معنی‌داری دارند ($P < 0.05$). * = معنی‌دار

یافته‌های مربوط به یکپارچگی غشاء پلاسمایی، فعالیت غشاء پلاسمایی (اشکال ۱ و ۲) و همچنین ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم به‌ترتیب در نمودارهای ۳، ۴ و ۵ ارائه شده‌است. نتایج به‌دست آمده بیان‌گر این است که مقدار این فراسنجه‌ها در تمام تیمارهای ی که از رقیق‌کننده بر پایه LDL استفاده کرده‌بودند، به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار EY بیشتر بود ($P < 0.05$) و بین تیمارهای ی که از رقیق‌کننده ی بر پایه LDL استفاده کرده بودند، LDL-C5 به‌طور معنی‌داری نسبت به دو گروه دیگر مقادیر بالاتری را نشان داد ($P < 0.05$).



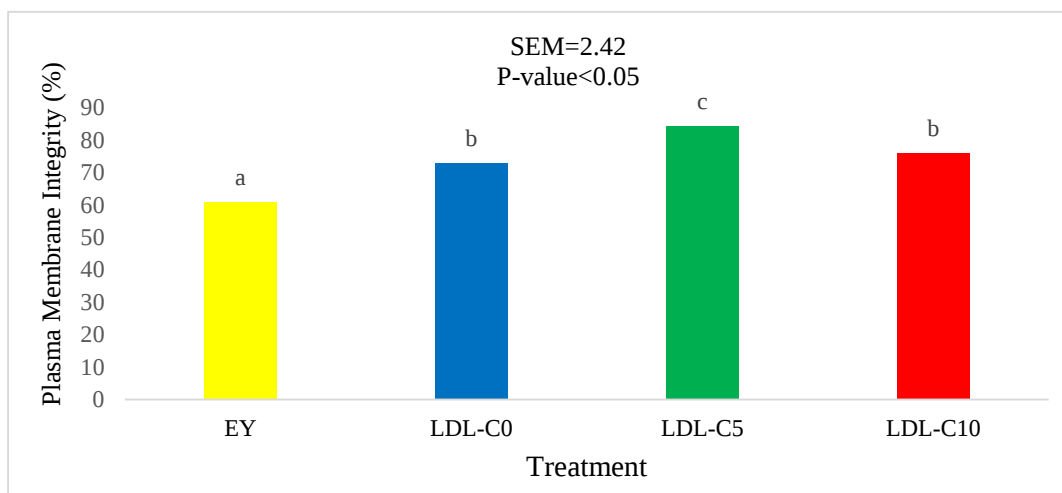
عکس ۱- اسپرم‌هایی با غشاء یکپارچه (سر بی‌رنگ) و غشاء غیر یکپارچه (سر قرمز رنگ)

Image 1. Spermatozoa with intact membranes (colorless heads) and non-intact membranes (red-colored heads)



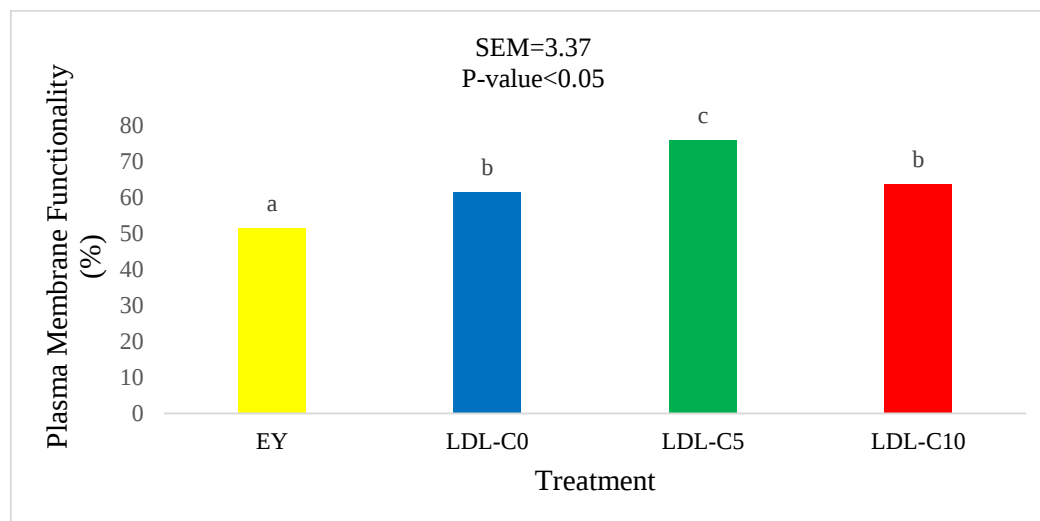
عکس ۲- اسپرم‌هایی با غشاء فعال (دم پیچ خورده) و غشاء غیر فعال (دم غیر پیچ خورده)

Image 2. Spermatozoa with functional membranes (curled tails) and non-functional membranes (uncurled tails).



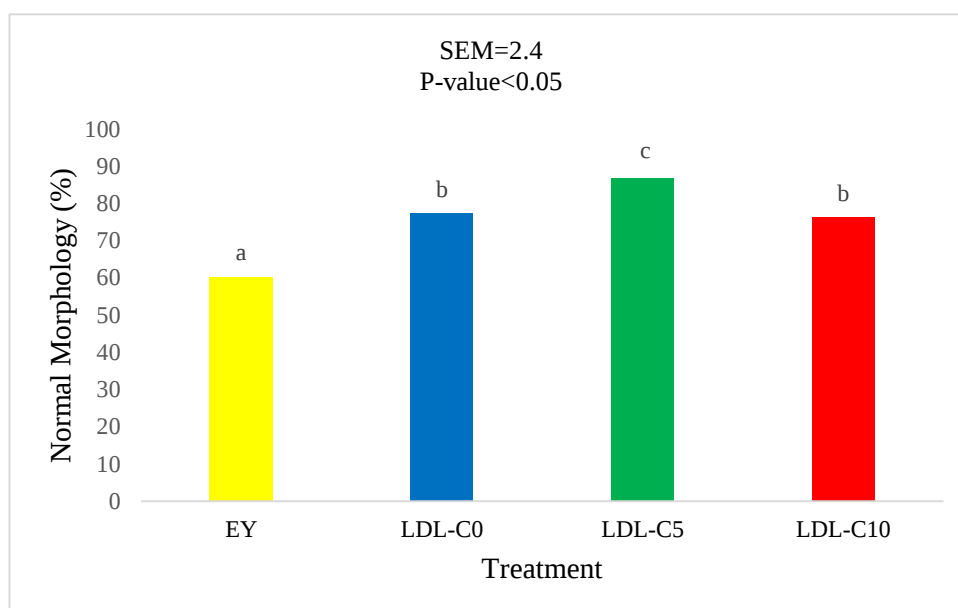
نمودار ۳- اثر سیستئین بر یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم (LS mean $\pm$ SEM)

Figure 3. effect of cysteine on sperm plasma membrane integrity



نمودار ۴- اثر سیستئین بر فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم (LS mean $\pm$ SEM)

Figure 4. effect of cysteine on sperm plasma membrane functionality



نمودار ۵- اثر سیستئین بر ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم (LS mean $\pm$ SEM)

Figure 5. effect of cysteine on sperm normal morphology

بحث

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که تحرک پیش رونده و دیگر شاخص های تحرک در تمام تیمارهای که از رقیق کننده بر پایه LDL استفاده کرده بودند نسبت به رقیق کننده بر پایه زرده تخم مرغ بهتر بودند. همچنین، بالاترین مقدار تحرک و دیگر شاخص های تحرک در تیمار LDL-C5 مشاهده شد. نتایج این مطالعه با یافته های دیگر مطالعات که اثر استفاده از LDL در رقیق کننده منی خرگوش (Iaffaldano et al., 2014)، گاو (Amirat et al., 2004) و قوچ (Tonieto et al., 2010) را بر پارامترهای کیفی اسپرم پس از انجماد بررسی کرده بودند مطابقت داشت. در مطالعات نام برده، نتایج نشان داد که استفاده از LDL در رقیق کننده باعث بهبود تحرک و دیگر فرا سنج های تحرک در مقایسه با زرده تخم مرغ می شود. بیان شده است که استفاده از زرده تخم مرغ به عنوان سرما محافظ غیر قابل نفوذ، علاوه بر اینکه منبع آلودگی باکتریایی است، دارای معایب متعددی است (Moreno et al., 2013) و برخی از ترکیبات آن می تواند اثرات مخربی بر اسپرم داشته باشد. از عوامل مضر احتمالی می توان به گرانول های یافت شده در زرده تخم مرغ اشاره کرد که بیان شده است منجر به کاهش تنفس و تحرک اسپرم می شود (Amirat et al., 2004). همچنین، پیشنهاد شده است که پروژسترون موجود در زرده تخم مرغ به طور بالقوه می تواند از عوامل ظرفیت دار کردن اسپرم باشد که برای نگهداری اسپرم مضر است (Bowden et al., 2001; Moreno et al., 2013). به علاوه، نتایج این مطالعه با دیگر مطالعاتی که اثر افزودن سیستمین به رقیق کننده منی قوچ (Kafi et al., 2024) و گاو (Sarıözkan et al., 2009) را بررسی کرده بودند مطابقت داشت. آکسوزوم و الیاف متراکم مربوط به بخش میانی اسپرم توسط میتوکندری پوشیده شده است که از ذخایر درون سلولی ATP، انرژی تولید می کند که این عوامل مسئول تحرک اسپرم هستند (De Lamirande & Gagnon, 1992). بر این اساس، محققان بیان کرده اند که بهبود تحرک اسپرم در رقیق کننده حاوی سیستمین احتمالاً ناشی از تأثیر محافظتی سیستمین بر یکپارچگی عملکردی آکسوزوم و میتوکندری است (Sarıözkan et al., 2009). بنابراین بهبود تحرک و فراسنجه های مربوط به تحرک در این مطالعه در تیمارهای که از رقیق کننده بر پایه LDL و حاوی سیستمین استفاده کرده بودند احتمالاً ناشی از حذف عوامل مخرب زرده و اثر محافظتی سیستمین بر یکپارچگی عملکردی آکسوزوم و میتوکندری است. لازم به ذکر است که تحرک کل در این مطالعه در تیمارهای EY و LDL-C 10 مشابه بود، در حالی که نسبت به گروه LDL-C5 به طور معنی داری کمتر بود. این نتیجه بیان گر مضر بودن عوامل آنتی اکسیدانی در مقادیر بالا می باشد. اگرچه در مطالعه ای (Öğretmen et al., 2015) بیان کردند که رقیق کننده حاوی ۲۰ میلی مول سیستمین بهترین مقدار تحرک را در اسپرم ماهی پس از ذوب نشان داد. عدم مطابقت بین نتایج این مطالعه و مطالعه ذکر شده می تواند به دلیل تفاوت بین گونه ای باشد.

یافته های این مطالعه نشان دادند که یکپارچگی غشاء پلاسمایی، فعالیت غشاء پلاسمایی و همچنین ریخت شناسی طبیعی اسپرم در تمام تیمارهای که از رقیق کننده بر پایه LDL استفاده کرده بودند، به طور معنی داری نسبت به تیمار EY بیشتر بود ($P < 0.05$) و بین تیمارهای که از رقیق کننده بر پایه LDL استفاده کرده بودند، به طور معنی داری نسبت به دو گروه دیگر مقادیر بالاتری را نشان داد ($P < 0.05$). مشابه با نتایج به دست آمده در این مطالعه، (Iaffaldano et al., 2014) و (Tonieto et al., 2010) بیان کردند که اسپرم خرگوش و قوچ منجمد شده با رقیق کننده بر پایه زرده تخم مرغ، یکپارچگی غشای پلاسمایی کمتری نسبت به اسپرم منجمد شده با رقیق کننده بر پایه LDL داشتند. همچنین، (Kafi et al., 2024) و (Kaeoket et al., 2010) گزارش کرده اند که افزودن سیستمین به رقیق کننده منی قوچ و خوک باعث بهبود زنده ماندی و یکپارچگی آکروزومی می شود. دیگر محققان نیز گزارش کرده اند که میزان فعالیت غشاء اسپرم با افزودن ۵ میلی مول سیستمین به رقیق کننده بیشتر از افزودن ۱۰ میلی مول سیستمین است (Uysal & Bucak, 2007). تحقیقات دیگری نیز نشان داده اند که استفاده از سیستمین باعث افزایش فعالیت غشای اسپرم بز می شود (Szcześniak-Fabianczyk et al., 2003). به علاوه، در خوک نیز نتایج مطالعه ای نشان داد که افزودن ۵ میلی مول سیستمین به رقیق کننده، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم را در دمای اتاق بهبود بخشید (Funahashi & Sano, 2005). لازم به ذکر است، بر خلاف نتایج مطالعه حاضر و همچنین نتایج مطالعات (Uysal & Bucak, 2007)، یافته های مطالعات (Kafi et al., 2024) و (Kaeoket et al., 2010) نشان دهنده عدم

تأثیر منفی افزودن ۸ و ۱۰ درصد سیستئین در رقیق‌کننده بر زنده‌مانی و یکپارچگی آکروزم اسپرم بود. (Manjunath et al., 2002) و (Hu et al., 2010) پیشنهاد کردند که سازوکار اصلی که LDL از طریق آن از اسپرم محافظت می‌کند، چسبیدن به پروتئین‌های پلاسمای منی است. همچنین LDL با اتصال به پروتئین‌های پلاسمای منی، آن‌ها را از دسترس خارج کرده و نیز با فسفولیپید و کلسترول خود در غشاء شرکت کرده و جانشین این ترکیبات در غشاء می‌شود و به گونه‌ای آن‌را بازسازی می‌کند. سیستئین، یک اسید آمینه غیر ضروری و پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد است (Ercal et al., 1996). همچنین آل-سیستئین پیش‌سازی برای گلووتاتیون درون سلولی است (Bilodeau et al., 2001b) که سطح آن در فرایند انجماد-ذوب کاهش می‌یابد. علاوه بر این، آل-سیستئین این توانایی را دارد که به سرعت به درون سلول منتقل شود و به تأثیرین تبدیل شود، که پس از ترکیب با اسید چرب در غشای پلاسمایی، به آسیل‌تائورین تبدیل می‌شود که می‌تواند خواص مواد فعال سطحی و تنظیم اسمزی را بهبود بخشد (Kaeoket et al., 2010). آل-سیستئین توانایی کاهش پراکسیداسیون لیپیدی که رادیکال‌های آزاد تولید می‌کند را دارد که نتیجه آن محافظت از اسپرم در برابر ROS است (Chatterjee et al., 2001) که در نهایت باعث بهبود یکپارچگی و فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم می‌شود. مطالعات نشان داده است که اگرچه سیستئین در غلظت مناسب باعث افزایش گلووتاتیون و کاهش ROS می‌شود، اما وقتی غلظت آن از حد بهینه بیشتر شود، تعادل اکسایش-کاهش سلول به هم می‌خورد. در این حالت به جای محافظت از سلول، می‌تواند باعث تنش احیایی شود (reductive stress) و یا حتی باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد شود و عملکرد سلول را کاهش دهد (Kafi et al., 2024). این پدیده برای بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌ها گزارش شده است. همچنین، بیان شده است که اضافه کردن مقادیر زیاد اسیدهای آمینه به رقیق‌کننده، اسمولاریته را افزایش می‌دهد. سلول‌ها (به‌خصوص اسپرم یا سلول‌های حساس به انجماد) به تغییرات اسمزی بسیار حساس هستند و افزایش بیش از حد اسمولاریته می‌تواند به غشا آسیب بزند و تحرک و زنده‌مانی را کاهش دهد (Khalili et al., 2010). در بسیاری از مطالعات انجماد اسپرم مشاهده شده که سیستئین دارای یک غلظت بهینه است و افزایش غلظت بیشتر از آن غلظت بهینه می‌تواند اثر عکس داشته باشد. بنابراین اگرچه افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده اسپرم می‌تواند اثر مثبت بر کیفیت اسپرم داشته باشد اما باید غلظت بهینه آن در نظر گرفته شود.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از ۸ درصد LDL و ۵ میلی‌مول سیستئین در رقیق‌کننده اسپرم بز می‌تواند فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از ذوب را بهبود بخشد که این بهبود احتمالاً ناشی از دخیل بودن سیستئین در غیرفعال کردن گونه‌های اکسیژنی فعال و همچنین نقش LDL در بازسازی غشای پلاسمایی اسپرم است.

سپاسگزاری

از حمایت‌های مادی دانشگاه تهران در انجام این پژوهش می‌باشد، صمیمانه سپاسگزاریم.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش کد اخلاق را به شماره ۷۱۲۵۰۱۰۴۳/۶/۱۵ از کمیته اخلاق دانشکده کشاورزی/دانشگاه تهران دریافت کرده است.

نویسندگان اصول اخلاقی را در انجام و انتشار این پژوهش علمی رعایت نموده‌اند و این موضوع مورد تأیید همه آنهاست.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان به طور مساوی در تدوین ایده و مفهوم پردازی مقاله و نگارش نسخه اولیه و پیش نویس های بعدی آن مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

حامی مالی

مقاله حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام شد.

حمایت مالی از این پژوهش از طرف دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی در قالب پژوهانه پایان نامه دانشجویی نوید سنده اول و همچنین پژوهانه برای سایر نویسندگان انجام شده است.

References

- Aitken, R.J.**, 2017. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol. Reprod. Dev.* 84, 1039–1052. <https://doi.org/10.1002/mrd.22871>
- Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani Nashtaei, M., Khodarahmian, M., Nekoonam, S.**, 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank.* 17, 745–756. DOI 10.1007/s10561-016-9566-5
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J.L., Anton, M.**, 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61, 895–907. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00259-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00259-0)
- Bansal, A.K., Bilaspuri, G.S.**, 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet. Med. Int.* 2011, 686137. <https://doi.org/10.4061/2011/686137>
- Bilodeau, J.-F., Blanchette, S., Gagnon, C., Sirard, M.-A.**, 2001a. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56, 275–286. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00562-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00562-3)
- Bilodeau, J.-F., Blanchette, S., Gagnon, C., Sirard, M.-A.**, 2001b. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56, 275–286. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00562-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00562-3)
- Bowden, R.M., Ewert, M.A., Lipar, J.L., Nelson, C.E.**, 2001. Concentrations of steroid hormones in layers and biopsies of chelonian egg yolks. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 95–103. <https://doi.org/10.1006/gcen.2000.7579>
- Bucak, M.N., Uysal, O.**, 2008. The role of antioxidants in freezing of Saanen goat semen. *Indian Vet J.* 85, 148–150.
- Chatterjee, S., de Lamirande, E., Gagnon, C.**, 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol. Reprod. Dev. Inc. Gamete Res.* 60, 498–506. <https://doi.org/10.1002/mrd.1115>
- De Lamirande, E.V.E., Gagnon, C.**, 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.* 13, 368–378. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1992.tb03327.x>

- Ercal, N., Treeratphan, P., Lutz, P., Hammond, T.C., Matthews, R.H.,** 1996. N-acetylcysteine protects Chinese hamster ovary (CHO) cells from lead-induced oxidative stress. *Toxicology* 108, 57–64. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(95\)03273-I](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(95)03273-I)
- Foote, R.H., Chen, Y., Brockett, C.C., Kaproth, M.T.,** 1993. Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine, or blood serum. *J. Dairy Sci.* 76, 1908–1913. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77524-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77524-4)
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S.M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H.R., Nasr-Esfahani, M.H.,** 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 73, 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.005>
- Funahashi, H., Sano, T.,** 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 C. *Theriogenology* 63, 1605–1616. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.016>
- Hendin, B.N., Kolettis, P.N., Sharma, R.K., Thomas JR, A.J., Agarwal, A.,** 1999. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J. Urol.* 161, 1831–1834. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)68818-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)68818-0)
- Hu, J.-H., Li, Q.-W., Zan, L.-S., Jiang, Z.-L., An, J.-H., Wang, L.-Q., Jia, Y.-H.,** 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing–thawing. *Anim. Reprod. Sci.* 117, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.04.001>
- Iaffaldano, N., Di Iorio, M., Rosato, M.P., Manchisi, A.,** 2014. Cryopreservation of rabbit semen using non-permeable cryoprotectants: effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk versus egg yolk or sucrose. *Anim. Reprod. Sci.* 151, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.020>
- Jeong, B., Yang, X.,** 2001. Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 330–335. <https://doi.org/10.1002/mrd.1038>
- Kaeoket, K., Chanapiwat, P., Tummaruk, P., Techakumphu, M.,** 2010. Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen. *Asian J. Androl.* 12, 760. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.48>
- Kafi, A., Khalid, M., Herath, T., Kershaw, C.,** 2024. Cysteine supplementation pre-freeze and post-thaw improves integrity and reduces oxidative stress in cryopreserved ram spermatozoa. *Cryobiology* 114, 104854. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2024.104854>
- Khalili, B., Jafaroghli, M., Farshad, A., & Pareskh-Khiavi, M.,** 2010. The effects of different concentrations of glycine and cysteine on the freezability of Moghani ram spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(3), 318–325. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.90387>
- Mc Bee, L.E. and Cotterill, O.J.,** 1979. Ion-exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk proteins. *Journal of Food Science*, 44(3), pp.656–667.
- Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., Ménard, M.,** 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.* 67, 1250–1258. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1250>
- Miller, J.G.O., Schultz, G.A.,** 1987. Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol. Reprod.* 36, 125–129. <https://doi.org/10.1095/biolreprod36.1.125>
- Moreno, D., Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Neira, A., Destrumelle, S., Tainturier, D.,** 2013. Preliminary results: the advantages of low-density lipoproteins for the cryopreservation of equine semen. *J. equine Vet. Sci.* 33, 1068–1075. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.04.004>

- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M.,** 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57, 1695–1706. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00682-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00682-9)
- Öğretmen, F., İnanan, B.E., Kutluyer, F., Kayim, M.,** 2015. Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Theriogenology* 83, 1548–1552. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.02.001>
- Pesch, S., Bergmann, M.,** 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 37, 597–612. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.02.006>
- Sagrístá, M.L., Garcíá, A.F., De Madariaga, M.A., Mora, M.,** 2002. Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* 36, 329–340. <https://doi.org/10.1080/10715760290019354>
- Salmani, H., Nabi, M.M., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, M.B., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Towhidi, A., Shahneh, A.Z., Zhandi, M.,** 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Rumin. Res.* 112, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.015>
- Sarıözkan, S., Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Ulutaş, P.A., Bilgen, A.,** 2009. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology* 58, 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.006>
- Sikka, S.C.,** 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front. Biosci. a J. virtual Libr.* 1, e78-86. <https://doi.org/10.2741/a146>
- Szcześniak-Fabiańczyk, B., Bochenek, M., Smorag, Z., Ryska, F.,** 2003. Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. *Reprod Biol* 3, 81–87.
- Tonieto, R.A., Goularte, K.L., Gastal, G.D.A., Schiavon, R.S., Deschamps, J.C., Lucia Jr, T.,** 2010. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Rumin. Res.* 93, 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.05.003>
- Uysal, O., Bucak, M.N.,** 2007. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet. Brno* 76, 383–390. <https://doi.org/10.2754/avb200776030383>
- Vichas, L., Tsakmakidis, I.A., Vafiadis, D., Tsousis, G., Malama, E., Boscós, C.M.,** 2018. The effect of antioxidant agents' addition and freezing method on quality parameters of frozen thawed ram semen. *Cell Tissue Bank.* 19, 113–121. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9633-6>