نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۵، تابستان ۱۳۹۶
ص‌ص: ۲۳۳~۲۴۲

# بررسی تأثیر سطوح مختلف اسید آمینه گلوتامین بر کیفیت منی قوچ عربی طی زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی به حالت مایع در ۵ درجه سانتی‌گراد

- **صالح طباطبائی وکیلی** (نویسنده مسئول)
  دانشیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
- **رقیه زیدی**
  دانش آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
- **مرتضی مموئی**
  استاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
- **خلیل میرزاده**
  دانشیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

تاریخ دریافت : مرداد ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش : مهر ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۶۱۳۶۵۲۲۴۳۸
Email: tabatabaei@ramin.ac.ir

**چکیده**

**گلوتامین یک اسیدآمینه با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر سطوح مختلف گلوتامین بر خصوصیات منی قوچ عربی تحت شرایط مایع بود. اسپرم‌گیری از ۸ رأس قوچ عربی به طور هفتگی برای ۸ هفته انجام و منی آن‌ها با هم مخلوط شد. منی مخلوط و رقیق شده به ۵ قسمت تقسیم و سطوح گلوتامین (صفر یا شاهد، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مول) را دریافت نمودند. در شرایط نگهداری بصورت مایع تحت دمای ۵°C و در زمان‌های مختلف (یک، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت)، فراسنجه‌های کیفی منی مورد بررسی قرار گرفت. سطوح گلوتامین تأثیری بر کیفیت منی در ساعت اول نگهداری نداشت (P>۰/۰۵). تحرک اسپرم طی ۲۴ و ۴۸ ساعت از ذخیره تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت، اما زنده‌مانی اسپرم در تیمار شاهد کمتر از تیمار حاوی ۲۵ میلی مول گلوتامین بود (P<۰/۰۵). پس از ۷۲ ساعت، کمترین میزان تحرک و زنده‌مانی اسپرم (بجز گلوتامین ۱۰۰) مربوط به تیمار شاهد بود. بعد از ۹۶ ساعت، فقط اسپرم های حاوی ۲۵ و ۵۰ میلی مول گلوتامین نسبت به تیمار شاهد تحرک و زنده‌مانی بالاتری داشتند (P<۰/۰۵). در زمان ۲۴ ساعت، تمام سطوح گلوتامین موجب کاهش میزان ناهنجاری‌های اسپرم شدند. با گذشت زمان، سطوح پایین‌تر گلوتامین (۲۵ و ۵۰) موجب کاهش میزان ناهنجاری‌ها و بهبود سلامت غشای پلاسمایی اسپرم شد (P<۰/۰۵). pH منی تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت (P>۰/۰۵). بطور کلی، استفاده از گلوتامین بخصوص سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌مول آن باعث بهبود معنی‌دار فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی بدون تأثیر بر pH منی در زمان نگهداری شد.**

**واژه‌های کلیدی:** اسپرم، آنتی‌اکسیدان، کیفیت منی، گلوتامین، قوچ عربی

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 233-242

**Effect of different levels of glutamine amino acid on semen quality of Arabi ram during different storage times under liquid condition in 5°C**

By: Saleh Tabatabaei Vakili*[1], Roghayeh Zeidi[2], Morteza Mamouei[3], Khalil Mirzadeh[4]

*1:Associate professor, Department of Animal Science, Ramin Agriculture and Natural Resource University of Khuzestan, Ahwaz, Iran. Email: tabatabaei@ramin.ac.ir, Tel: 06136522438.

2: M.Sc. graduate of Animal physiology, Ramin Agriculture and Natural Resource University of Khuzestan, Ahwaz, Iran

3: Professor, Department of Animal Science, Ramin Agriculture and Natural Resource University of Khuzestan, Ahwaz, Iran

4: Associate professor, Department of Animal Science, Ramin Agriculture and Natural Resource University of Khuzestan, Ahwaz, Iran

**Received: July 2016** **Accepted: October 2016**

Glutamine is an amino acid which has antioxidant role. The aim of this study was to investigate the effect of different levels of glutamine into diluent on semen characteristics of Arabi ram in liquid condition. Semen samples were collected weekly from 8 Arabi rams for 8 weeks and pooled. After dilution, the pooled semen was divided into 5 parts and received the levels of glutamine (0 or control, 25, 50, 75 and 100 mM). In liquid storage condition under 5°C and different times (1, 24, 48, 72 and 96 hours), semen quality characteristics were evaluated. The glutamine levels have no effects on semen quality in first hour of maintenance (P>0.05). The sperm motility was not affected by treatments during 24 and 48 hours; But, sperm viability in control was lower than 25 mM glutamine (P<0.05). After 72 hours, the lowest sperm motility and viability (except 100 mM of glutamine) was observed in control. While, after 96 hours, only 25 mM and 50 mM dose of glutamine improved the spermatozoa motility and viability (P<0.05). After 24 hours, all glutamine levels were reduced the morphological defect rates of spermatozoa. But, over time, lower levels of glutamine (25 and 50 mM) reduced the morphological defect rates and improved the plasma membrane integrity of spermatozoa (P<0.05). In all times, pH of semen was not affected by treatments (P>0.05). Overall, the use of glutamine especially dose of 25 and 50 mM significantly increased the sperm quality parameters of Arabi ram without effect on semen pH.

**Key words:** Antioxidant, Arabi ram, Glutamine, Semen quality, Sperm.

**مقدمه**

از مهمترین اهداف رقیق‌سازی منی افزایش زنده‌مانی اسپرماتوزآ از طریق کاهش نرخ متابولیکی سلول است و برای نیل به این هدف استفاده از رقیق‌کننده‌های با ترکیبات مناسب جهت نگهداری منی در ۵ درجه سانتی‌گراد پیشنهاد شده است. تأثیر اصلی نگهداری منی در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد، کاهش فعالیت متابولیکی اسپرم است که منجر به افزایش زنده‌مانی آن می‌شود و استفاده از زرده تخم‌مرغ و ترکیبات دیگر به محیط نگهداری، نگرانی شوک-سرمایی در این دما را برطرف می‌کند (Phillips، ۱۹۳۹). پستانداران به صورت طبیعی در سلول های خود دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از قبیل تائورین، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و هیپوتائورین می‌باشند که به عنوان مکانیسمی در برابر صدمه‌های پراکسیداز بوده و برای جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو عمل می‌کنند. این توانایی آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های اسپرم به دلیل کم بودن اجزای سیتوپلاسمی محدود است و این آنتی‌اکسیدان‌ها برای نگهداری طولانی مدت کافی نیستند. بنابراین اسپرم پستانداران قابلیت و توانایی کامل برای مقابله با پراکسیداسیون در طول فرآیند دخیره منی را ندارد (Aitken و همکاران، ۱۹۹۸؛ Agarwal و همکاران، ۲۰۰۴).

مکانیسم‌های خاصی برای استفاده از آمینواسیدها برای ایجاد مقاومت در برابر تنش سرمایی وجود دارد. به عنوان مثال آمینواسیدهای گلوتامین و سیستئین نقش مهمی در جلوگیری از رسوب پروتئین‌های غشا در زمان نگهداری اسپرم و همچنین در افزایش پتانسیل محافظت اسپرم بز در برابر شوک سرمایی دارند (Li و همکاران، ۲۰۰۳؛ Khlifaoui و همکاران، ۲۰۰۵).

گلوتامین از انواع اسیدهای آمینه آزاد موجود در بیضه است و به طور عمده در پلاسمای منی بسیاری از گونه های پستانداران و نه در اسپرم آن ها وجود دارد. افزودن گلوتامین به منی انسان، گاو، سگ، قوچ و نریان، پتانسیل باروری را بهبود بخشید (Sariozkan و همکاران، ۲۰۱۴). مکمل نمودن منی انسان با گلوتامین در بهبود تحرک و پتانسیل باروری آن نقش دارد، همچنین در هامستر ماده، گلوتامین باعث بلوغ هسته‌ای تخمک و گسترش کومولوس می شود (Bucak و همکاران، ۲۰۰۹). اسیدآمینه گلوتامین در طول غشای اسپرم پخش می‌شود و با فسفولیپیدها در غشای پلاسمایی اسپرم ترکیب شده و پراکسیداسیون لیپید غشاء را متوقف کرده و خاصیت سیالی غشا را افزایش می‌دهد که منجر به مقاومت بیشتر اسپرم در برابر شوک سرمایی می‌شود (Lapointe و Bilodeau، ۲۰۰۳؛ Agarwal و همکاران، ۲۰۰۴).

در یک آزمایش افزودن سطوح مناسب اسیدآمینه گلوتامین به رقیق‌کننده تریس- زرده‌ی تخم‌مرغ قبل از انجماد منی قوچ، موجب بهبود قابل توجه ویژگی‌های کیفی اسپرم شامل حرکت پیش‌رونده و درصد زنده مانی نسبت به گروه شاهد شد اما تفاوت معنی‌داری در درصد سلامت آکروزوم اسپرم بین تیمارهای آزمایش با گروه شاهد مشاهده نگردید (Uysal و Bucak، ۲۰۰۷). فرآیندهای انجماد و رفع انجماد در اثر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشای پلاسمایی، موجب ایجاد مولکول‌های فعال و رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند که تحرک بعد از رفع انجماد، قابلیت زنده‌مانی، فعالیت آنزیمی درون سلولی، باروری و عملکرد اسپرم را مختل می‌کند (Aitken و همکاران، ۱۹۹۸؛ Uysal و Bucak، ۲۰۰۷). با توجه به این گزارشات در مطالعه حاضر تأثیر افزودن سطوح مختلف گلوتامین به رقیق‌کننده بر خصوصیات منی قوچ عربی تحت شرایط مایع مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از مهرماه تا اواخر آذرماه سال ۱۳۹۴، هم زمان با فصل تولیدمثلی پاییزه گوسفند عربی، در ایستگاه دامپروری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان واقع در ۳۶ کیلومتری شمال شرقی اهواز انجام شد. برای این منظور، اسپرم-گیری از ۸ رأس قوچ عربی بالغ با سن متوسط حدود ۲/۵ سال و تحت برنامه تغذیه‌ای و مدیریتی یکسان در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. جمع‌آوری منی بصورت هفتگی توسط دستگاه الکترواجاکولاتور برای مدت ۸ هفته انجام گرفت. منی جمع-آوری شده از قوچ‌ها در هر دوره، برای جلوگیری از اثرات فردی بلافاصله با هم مخلوط و به نسبت ۱ به ۱۰ در رقیق کننده پایه تریس (تریس ۳/۶۳ گرم، فروکتوز ۰/۵ گرم، اسید سیتریک ۱/۹۹ گرم، زرده تخم مرغ ۱۴ میلی‌لیتر و آب مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر) رقیق شد (Salamon و Maxwell، ۲۰۰۰). نمونه‌های منی مخلوط و رقیق شده به ۵ قسمت تقسیم و هر کدام سطح مختلف اسیدآمینه گلوتامین (صفر یا شاهد، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مول) را دریافت کردند. پس از ذخیره منی حاوی تیمارهای آزمایشی بصورت مایع در ۵°C، در زمان‌های یک، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از ذخیره، فراسنجه‌های کیفی منی بررسی شد.

جهت ارزیابی تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها، پنج میکرولیتر از منی رقیق شده روی لام گرم قرارداده شده و پس از لامل‌گذاری، با استفاده از میکروسکوپ نوری، با بزرگنمایی ۴۰۰X در چند میدان دید درصد تحرک پیش‌رونده ارزیابی شده و در انتها میانگین حاصل به عنوان درصد تحرک پیش‌رونده ثبت شد (Sariozkan و همکاران، ۲۰۰۹). برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین شامل رنگ ائوزین (۱/۶۷ گرم در لیتر)، رنگ نیگروزین (۱۰۰ گرم در لیتر) و سیترات سدیم (۲۹ گرم در لیتر) استفاده گردید. ابتدا منی رقیق شده‌ی تیمارها با رنگ ائوزین- نیگروزین (نسبت ۱ به ۱) آمیخته شد و پس از ۳۰ ثانیه،

روی لام توسط یک لام دیگر گسترش تهیه گردید و با جریان هوای گرم خشک شد. پس از خشک شدن گسترش، لام‌ها توسط بزرگنمایی ۱۰۰۰X میکروسکوپ نوری و با استفاده از روغن ایمرسیون مورد ارزیابی قرار گرفتند. درصد اسپرم‌های زنده و مرده در چندین میدان از لام (با شمردن حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید) تعیین شد. اسپرم‌های مرده به علت تغییر در ساختمان غشا، رنگ ائوزین را به خود جذب کرده و به رنگ صورتی دیده شدند، اما اسپرم‌های زنده رنگ را به خود جذب نکرده و سفید رنگ ماندند (Evans و Maxwell، ۱۹۸۷). برای بررسی درصد اسپرم‌های ناهنجار، نمونه کوچکی از منی در روی لام با رنگ ائوزین- نیگروزین رنگ‌آمیزی شد. هنگام تهیه گسترش دقت شد تا آسیب‌های فیزیکی به اسپرم‌های سالم وارد نشود (برای جلوگیری از افزایش درصد اسپرم‌های ناهنجار). پس از رنگ-آمیزی، درصد اسپرم‌های ناهنجار با استفاده از روغن ایمرسیون و شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر لام تحت بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰X میکروسکوپ تعیین گردید (Blom، ۱۹۸۳).

برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم یا آزمون HOST از محلول هیپواسموتیک استفاده شد. در این حالت اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالمی داشتند به محلول واکنش نشان داده، ولی اسپرم های ناسالم بدون واکنش باقی می‌ماندند. در واقع پس از این آزمایش اسپرم‌های با دم گره خورده به عنوان اسپرم‌های با پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌هایی که دم آن‌ها صاف بود به عنوان اسپرم با پاسخ منفی (غشای پلاسمایی معیوب) تلقی شد. در این بخش آزمایش مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هیپواسموتیک حاوی فروکتوز (۹ گرم در لیتر) و سیترات سدیم (۴/۹ گرم در لیتر) مخلوط گردید، سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل ۳ قطره از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. بررسی میکروسکوپی با استفاده از یک صفحه گرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با بزرگ نمایی ۴۰۰X صورت گرفت. در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم های دارای غشای یکپارچه محاسبه شد (Evans و Maxwell، ۱۹۸۷). برای بررسی میزان pH منی طی زمان‌های مختلف پس از نگهداری منی در هر کدام از تیمارهای آزمایشی از pH سنج دیجیتالی قلمی (مدلAZ8686) با دقت ۰/۰۱ استفاده شد.

داده های به دست آمده از پژوهش حاضر، با استفاده از برنامه نرم-افزار آماری SPSS (ویرایش ۱۶) با مدل آماری زیر مورد آنالیز قرار گرفت. جهت بررسی کیفیت اسپرم و میزان pH منی در هر زمان بین تیمارها از تحلیل واریانس یک‌طرفه ( one way ANOVA) و آزمون مقایسه‌ای چند دامنه دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تعداد تکرار برای هر تیمار، هشت واحد آزمایش در نظر گرفته شد. $Y_{Ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$

$Y_{ij}$ = مقدار هر مشاهده، $\mu$ = میانگین کل، $T_i$ = اثر تیمار، $\varepsilon_{ij}$ = اثر خطای آزمایشی

## نتایج

تأثیر سطوح مختلف گلوتامین بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم و pH منی قوچ عربی طی زمان‌های مختلف نگهداری منی به حالت مایع در ۵ درجه سانتی‌گراد در جداول ۱ تا ۵ ارائه شده است. یک ساعت پس از ذخیره منی به حالت مایع، میزان تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم و نیز pH منی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند ($P>0/05$) و البته اختلاف میزان pH منی بین تیمارها در مابقی زمان‌های ذخیره نیز معنی‌دار نشد ($P>0/05$) (جدول ۱).

۲۴ ساعت پس از ذخیره منی، میزان تحرک پیشرونده اسپرم بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0/05$). در این زمان، میزان زنده‌مانی و نیز سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در گروه شاهد به طور معنی‌داری کمتر از سطح ۲۵ میلی‌مول گلوتامین بود ($P<0/05$). کمترین میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در زمان ۲۴ ساعت، مربوط به شاهد بود ($P<0/05$) (جدول ۲).

**جدول ۱- تأثیر گلوتامین بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم (درصد) و pH منی قوچ عربی طی یک ساعت پس از ذخیره منی به‌حالت مایع (میانگین ± اشتباه معیار)**

| تیمارها (میلی مول) | تحرک پیشرونده | زنده‌مانی | ناهنجاری مورفولوژیکی | سلامت غشای پلاسمایی | pH |
|---|---|---|---|---|---|
| گلوتامین ۲۵ | ۸۷/۱۷ ± ۴/۱۵ | ۹۱/۳۳ ± ۲/۴۴ | ۵/۶۷ ± ۰/۶۱ | ۸۱/۶۰ ± ۱/۴۴ | ۶/۶۳ ± ۰/۱۵ |
| گلوتامین ۵۰ | ۸۶/۶۷ ± ۳/۳۳ | ۸۹/۱۷ ± ۲/۳۹ | ۶/۳۳ ± ۰/۴۲ | ۷۹/۴۰ ± ۱/۹۶ | ۶/۶۳ ± ۰/۱۸ |
| گلوتامین ۷۵ | ۸۷/۰۰ ± ۳/۴۲ | ۸۸/۶۷ ± ۲/۵۴ | ۶/۵۰ ± ۰/۵۰ | ۸۱/۲۵ ± ۲/۳۹ | ۶/۵۸ ± ۰/۱۵ |
| گلوتامین ۱۰۰ | ۸۳/۳۳ ± ۳/۵۷ | ۸۵/۸۳ ± ۲/۷۱ | ۷/۰۰ ± ۰/۵۸ | ۸۰/۴۰ ± ۲/۰۱ | ۶/۵۳ ± ۰/۱۸ |
| شاهد | ۸۵/۰۰ ± ۳/۱۶ | ۸۷/۵۰ ± ۱/۱۲ | ۷/۰۰ ± ۰/۵۲ | ۷۷/۰۰ ± ۲/۵۵ | ۶/۷۰ ± ۰/۱۴ |

در هر ستون حروف نامشابه نشانه اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

**جدول ۲- تأثیر گلوتامین بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم (درصد) و pH منی قوچ عربی طی ۲۴ ساعت پس از ذخیره منی به‌حالت مایع (میانگین ± اشتباه معیار)**

| تیمارها (میلی مول) | تحرک پیشرونده | زنده‌مانی | ناهنجاری مورفولوژیکی | سلامت غشای پلاسمایی | pH |
|---|---|---|---|---|---|
| گلوتامین ۲۵ | ۷۸/۶۷ ± ۳/۹۳ | ۸۴/۵۰ ± ۱/۶۱[a] | ۷/۳۳ ± ۰/۴۲[b] | ۷۳/۶۰ ± ۳/۳۰[a] | ۶/۶۷ ± ۰/۱۶ |
| گلوتامین ۵۰ | ۷۹/۸۰ ± ۵/۲۱ | ۷۹/۸۳ ± ۳/۸۴[ab] | ۷/۸۳ ± ۰/۴۰[b] | ۷۲/۶۰ ± ۳/۱۲[ab] | ۶/۶۷ ± ۰/۲۰ |
| گلوتامین ۷۵ | ۷۶/۰۰ ± ۴/۰۰ | ۸۰/۰۰ ± ۳/۱۶[ab] | ۸/۳۳ ± ۰/۴۹[b] | ۷۳/۰۰ ± ۱/۷۰[ab] | ۶/۷۰ ± ۰/۲۳ |
| گلوتامین ۱۰۰ | ۷۰/۸۳ ± ۳/۲۷ | ۷۶/۶۷ ± ۲/۴۷[ab] | ۸/۵۰ ± ۰/۳۴[b] | ۷۱/۶۰ ± ۱/۴۴[ab] | ۶/۷۳ ± ۰/۲۲ |
| شاهد | ۶۹/۲۵ ± ۱/۴۹ | ۷۵/۸۳ ± ۲/۳۹[b] | ۱۱/۰۰ ± ۰/۶۸[a] | ۶۵/۶۰ ± ۱/۶۹[b] | ۶/۵۶ ± ۰/۱۴ |

در هر ستون حروف نامشابه نشانه اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

پس از ۴۸ ساعت از ذخیره منی، تحرک پیش‌رونده اسپرم تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت (P>۰/۰۵). درحالیکه، میزان زنده‌مانی اسپرم در تیمار شاهد به طور معنی‌داری کمتر از سطح ۲۵ میلی‌مول گلوتامین بود (P<۰/۰۵). همچنین، میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌مول گلوتامین پس از ۴۸ ساعت از ذخیره منی کمتر از تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵). میزان سلامت غشای پلاسمایی اسپرم نیز در این زمان در تیمار شاهد به طور معنی‌داری کمتر از سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌مول گلوتامین بود (P<۰/۰۵) (جدول ۳).

در زمان ۷۲ ساعت پس از نگهداری، میزان تحرک پیش‌رونده اسپرم در تمامی سطوح گلوتامین به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵). میزان زنده‌مانی اسپرم طی این زمان، در گروه شاهد به طور معنی‌داری کمتر از تیمارهای حاوی سطوح ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌مول گلوتامین بود (P<۰/۰۵). بیشترین میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در این زمان، مربوط به تیمار ۱۰۰ میلی‌مول گلوتامین و شاهد بود (P<۰/۰۵). بر اساس جدول ۴ میزان سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در شاهد با سطوح گلوتامین اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵).

**جدول ۳- تأثیر گلوتامین بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم (درصد) و pH منی قوچ عربی طی ٤٨ ساعت پس از ذخیره منی به‌حالت مایع (میانگین ± اشتباه معیار)**

| تیمارها (میلی مول) | تحرک پیشرونده | زنده‌مانی | ناهنجاری مورفولوژیکی | سلامت غشای پلاسمایی | pH |
|---|---|---|---|---|---|
| گلوتامین ۲۵ | ۷۰/۰۰ ± ۵/۴۸ | ۷۵/۰۰ ± ۴/۰۸$^{a}$ | ۱۱/۳۳ ± ۱/۴۰$^{b}$ | ۶۹/۶۲ ± ۴/۷۱$^{a}$ | ۶/۳۰ ± ۰/۲۰ |
| گلوتامین ۵۰ | ۶۳/۳۳ ± ۵/۱۱ | ۶۹/۱۷ ± ۳/۵۲$^{ab}$ | ۱۱/۵۰ ± ۱/۱۲$^{b}$ | ۶۷/۰۰ ± ۴/۶۴$^{a}$ | ۶/۲۱ ± ۰/۲۱ |
| گلوتامین ۷۵ | ۵۸/۳۳ ± ۴/۹۴ | ۶۵/۰۰ ± ۳/۶۵$^{ab}$ | ۱۲/۶۷ ± ۰/۹۲$^{ab}$ | ۶۱/۴۰ ± ۲/۱۱$^{ab}$ | ۶/۰۸ ± ۰/۲۴ |
| گلوتامین ۱۰۰ | ۶۰/۰۰ ± ۴/۲۸ | ۶۶/۶۷ ± ۵/۲۷$^{ab}$ | ۱۲/۶۶ ± ۱/۴۵$^{ab}$ | ۵۵/۰۴ ± ۲/۲۴$^{b}$ | ۶/۳۷ ± ۰/۱۴ |
| شاهد | ۵۸/۳۳ ± ۳/۳۳ | ۶۰/۰۰ ± ۳/۴۲$^{b}$ | ۱۵/۱۶ ± ۱/۰۸$^{a}$ | ۵۶/۱۱ ± ۱/۸۷$^{b}$ | ۶/۵۲ ± ۰/۱۹ |

در هر ستون حروف نامشابه نشانه اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

**جدول٤- تأثیر گلوتامین بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم (درصد) و pH منی قوچ عربی طی ۷۲ ساعت پس از ذخیره منی به‌حالت مایع (میانگین ± اشتباه معیار)**

| تیمارها (میلی مول) | تحرک پیشرونده | زنده‌مانی | ناهنجاری مورفولوژیکی | سلامت غشای پلاسمایی | pH |
|---|---|---|---|---|---|
| گلوتامین ۲۵ | ۵۴/۱۷ ± ۴/۵۵$^{a}$ | ۵۷/۵۰ ±۳/۱۰$^{a}$ | ۱۶/۱۷ ± ۱/۸۵$^{b}$ | ۵۸/۸۰ ± ۳/۵۰$^{a}$ | ۶/۲۲ ± ۰/۲۸ |
| گلوتامین ۵۰ | ۵۵/۰۰ ±۱/۸۳$^{a}$ | ۶۰/۰۰ ±۱/۵۸$^{a}$ | ۱۵/۳۳ ± ۱/۶۷$^{b}$ | ۶۰/۴۰ ± ۱/۶۳$^{a}$ | ۶/۲۱ ± ۰/۱۸ |
| گلوتامین ۷۵ | ۵۵/۰۰ ± ۴/۴۷$^{a}$ | ۵۶/۰۰ ± ۴/۸۵$^{a}$ | ۱۵/۰۰ ± ۱/۷۹$^{b}$ | ۴۷/۰۰ ± ۲/۵۵$^{b}$ | ۶/۳۵ ± ۰/۲۶ |
| گلوتامین ۱۰۰ | ۴۹/۰۰ ± ۲/۴۵$^{a}$ | ۵۰/۰۰ ± ۴/۴۷$^{ab}$ | ۲۱/۸۰ ± ۱/۰۲$^{a}$ | ۵۰/۰۰± ۱/۵۸$^{ab}$ | ۶/۲۰ ± ۰/۱۹ |
| شاهد | ۳۵/۸۳ ± ۳/۵۲$^{b}$ | ۴۲/۵۰ ± ۴/۴۳$^{b}$ | ۲۲/۰۰ ± ۱/۰۶$^{a}$ | ۵۰/۲۲ ± ۵/۲۴$^{ab}$ | ۶/۶۸ ± ۰/۱۵ |

در هر ستون حروف نامشابه نشانه اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

**جدول ٥- تأثیر گلوتامین بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم (درصد) و pH منی قوچ عربی طی ۹٦ ساعت پس از ذخیره منی به‌حالت مایع (میانگین ± اشتباه معیار)**

| تیمارها (میلی مول) | تحرک پیشرونده | زنده‌مانی | ناهنجاری مورفولوژیکی | سلامت غشای پلاسمایی | **pH** |
|---|---|---|---|---|---|
| گلوتامین ۲۵ | ۴۱/۲۲ ± ۳/۳۲$^{a}$ | ۴۳/۱۵ ±۳/۷۴$^{a}$ | ۲۱/۲۰ ± ۱/۱۶$^{bc}$ | ۵۵/۶۰ ± ۵/۴۲$^{ab}$ | ۶/۳۰± ۰/۱۵ |
| گلوتامین ۵۰ | ۴۱/۴۰ ±۳/۹۳$^{a}$ | ۴۴/۴۰ ±۴/۴۶$^{a}$ | ۱۹/۴۰ ± ۱/۰۳$^{c}$ | ۵۹/۰۰ ± ۴/۳۰$^{a}$ | ۶/۲۴ ± ۰/۱۵ |
| گلوتامین ۷۵ | ۳۶/۰۰ ± ۴/۳۰$^{ab}$ | ۳۶/۱۷ ± ۳/۱۱$^{ab}$ | ۲۵/۴۰ ± ۱/۲۹$^{a}$ | ۵۷/۰۰ ± ۳/۳۹$^{a}$ | ۶/۲۶ ± ۰/۱۹ |
| گلوتامین ۱۰۰ | ۳۵/۱۵ ± ۵/۴۸$^{ab}$ | ۳۶/۰۰ ± ۴/۳۰$^{ab}$ | ۲۴/۴۰ ± ۰/۴۰$^{ab}$ | ۵۶/۰۰± ۴/۳۰$^{ab}$ | ۶/۲۰ ± ۰/۰۹ |
| شاهد | ۲۶/۷۷ ± ۲/۴۵$^{b}$ | ۳۰/۰۰ ± ۳/۵۴$^{b}$ | ۲۵/۷۵ ± ۱/۴۹$^{a}$ | ۴۱/۶۰ ± ۵/۷۰$^{b}$ | ۶/۵۰ ± ۰/۱۰ |

در هر ستون حروف نامشابه نشانه اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

۹۶ ساعت بعد از ذخیره منی، میزان تحرک پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم در سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌مول گلوتامین به طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (P<۰/۰۵). همچنین، میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌مول گلوتامین بود (P<۰/۰۵). بر اساس جدول ۵، میزان سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌های حاوی سطوح ۵۰ و ۷۵ میلی-مول گلوتامین پس از ۹۶ ساعت، به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بهبود یافت (P<۰/۰۵) .

## بحث

نتایج سایر بررسی های انجام شده تاثیر مثبت استفاده از گلوتامین بر کیفیت اسپرم را نشان می دهد. برای مثال در یک بررسی با افزودن گلوتامین به منی رقیق شده گاومیش و بررسی برخی از فاکتورهای میکروسکوپی اسپرم بعد از یخ‌گشایی مشاهده شد که این اسیدآمینه موجب بهبود قابل توجه ویژگی‌های کیفی اسپرم شامل حرکت پیش‌رونده و درصد زنده‌مانی اسپرم نسبت به گروه شاهد شد اما تفاوت معنی‌داری در درصد سلامت آکروزوم اسپرم بین تیمارهای آزمایش با شاهد مشاهده نگردید (Uysal و Bucak، ۲۰۰۷). اسیدآمینه گلوتامین در طول غشای اسپرم پخش شده و با فسفولیپیدهای موجود در غشای پلاسمایی ترکیب می‌شود که در نهایت منجر به مقاومت بیشتر اسپرم در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد و رفع انجماد می‌شود (Foote و همکاران، ۲۰۰۲). نتایج حاصل از تحقیق حاضر در خصوص افزایش درصد تحرک اسپرم‌ها با دیگر نتایج گزارش شده در مورد تأثیر مواد آنتی‌اکسیدان مختلف بر اسپرم گوسفند، خرگوش و خوک هم‌خوانی و مطابقت دارد (Bandyopadhyay و همکاران، ۲۰۰۳؛ Alvare و Storey، ۲۰۰۵؛ Bucak و همکاران، ۲۰۰۸). Topraggaleh و همکاران (۲۰۱۴)، با بررسی اثر اسیدآمینه گلوتامین بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از انجماد گزارش کردند که غلظت ۱۵ میلی‌مول گلوتامین سبب افزایش تحرک و بهبود یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم گاومیش شد که موافق با نتایج مطالعه‌ی حاضر بود. نتایج یک بررسی نشان داد که افزودن سیستئین سبب افزایش تحرک اسپرم شده و موجب بهبود میزان سلامت آکروزوم و ناهنجاری اسپرم گردید و استفاده از اسیدآمینه تورین نیز سبب افزایش تحرک اسپرم گاو شد (Sariozkan و همکاران، ۲۰۰۹). این در حالی است که در مطالعه حاضر، یک ساعت پس از ذخیره منی قوچ عربی حاوی سطوح اسیدآمینه گلوتامین، تأثیر معنی‌داری بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم مشاهده نشد. در تحقیقی که در آن اثر ال- سیستئین بر اسپرم گاو نر بررسی شد، مشخص گردید که این اسیدآمینه سبب بهبود پارامترهای کیفی اسپرم در طول ذخیره سازی در دمای ۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت شد و غلظت ۲۰۰ مول بر لیتر آن سبب بهبود تحرک پیشرونده، زنده مانی و یکپارچگی آکروزوم اسپرم گردید. این درحالی است که در مطالعه حاضر، بالاترین سطح اسیدآمینه گلوتامین بکار رفته یعنی ۱۰۰ میلی‌مول تأثیر معنی‌داری بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم در مقایسه با تیمار شاهد نداشت. احتمالاً از دلایل تفاوت در این نتایج می‌توان به نوع اسیدآمینه بکار رفته و اختلاف گونه‌ای اشاره کرد. طی پژوهشی که درآن اثرات اسیدهای آمینه‌ی گلوتامین، گلیسین، آلانین و سیستئین بر اسپرم گاومیش نر پس از انجماد بررسی شد، دو اسید آمینه گلوتامین و گلیسین اثرات مثبتی بر میزان تحرک اسپرم، یکپارچگی آکروزوم و سلامت غشای اسپرم داشتند. طوری‌که غلظت ۲۵ میلی‌مولار این اسیدهای آمینه و همچنین غلظت ۵ میلی‌مولار سیستئین سبب افزایش تحرک، یکپارچگی آکروزوم و غشای اسپرم شد و غلظت‌های بالاتر مانند ۱۰۰ میلی‌مولار سبب کاهش معنی‌دار تحرک، یکپارچگی غشای اسپرم و آکروزومی گردید (El-Sheshtawy و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعه حاضر نیز سطح ۲۵ میلی‌مول اسیدآمینه گلوتامین در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت موجب بهبود معنی‌دار میزان سلامت غشای پلاسمایی اسپرم نسبت به شاهد در قوچ عربی شد ولی در زمان‌های دیگر ذخیره‌سازی منی این اختلاف معنی‌دار نبود. در یک پژوهش اثرات اسیدهای آمینه غیرضروری بر پارامترهای اسپرم قوچ در شرایط انجماد بررسی شد و گزارش گردید که این اسیدهای آمینه سبب بهبود میزان تحرک، زنده-

مانی، سلامت آکروزوم و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در مقایسه با شاهد شدند (Badr و همکاران، ۲۰۱۵) که این گزارش نتایج مطالعه حاضر در استفاده از سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌مول اسیدآمینه گلوتامین در زمان‌های بیش از یک ساعت از نگهداری منی قوچ عربی به حالت مایع را تأیید می‌کند. موافق با تحقیق حاضر، در پژوهشی اثرات اسیدهای آمینه آلانین، پرولین و گلوتامین بر پارامترهای اسپرم قوچ در شرایط انجماد بررسی شد و نتایج نشان داد که غلظت ۲۰ میلی‌مول گلوتامین و ۲۵ میلی‌مول پرولین سبب بهبود کیفیت اسپرم شد (Sangeeta و همکاران، ۲۰۱۵). در پژوهش حاضر، سطح ۲۵ میلی مول گلوتامین باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم در ساعت اول نگهداری منی بصورت مایع نشد ولی با افزایش مدت زمان نگهداری منی موجب بهبود اغلب فراسنجه‌های کیفی اسپرم نسبت به شاهد گردید. در پژوهشی دیگر، اثرات اسیدهای آلفالیپوئیک که مشابه گلوتامین خاصیت اسیدآمینه‌ای دارند، بر فراسنجه‌های اسپرم بز بوئر بررسی شد و گزارش گردید که اسیدهای آلفالیپوئیک سبب بهبود تحرک اسپرم شدند، طوری‌که در غلظت ۰۲/ میلی‌مول بر لیتر آلفالیپوئیک تحرک اسپرم بهبود یافت (Ibrahim و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعه حسن‌پور و همکاران (۱۳۹۲)، اثر افزودن گلوتامین به رقیق کننده تریس بر انجماد اسپرم پوشش‌دار شده قوچ تالشی بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان زنده‌مانی اسپرم در مقادیر صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی‌مول گلوتامین بیشتر از ۱۶۰ میلی-مول آن بود. به طوری‌که سه ساعت پس از یخ‌گشایی، بیشترین میزان سلامت غشای پلاسمایی در مقدار ۸۰ میلی‌مول گلوتامین و ۹ ساعت پس از یخ‌گشایی، بیشترین تحرک پیش‌رونده اسپرم در مقدار ۸۰ میلی‌مول گلوتامین مشاهده شد. این نتایج یافته‌های مطالعه حاضر مبنی بر عدم تأثیر مناسب سطح بالای گلوتامین بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم را تأیید می‌کند. طی پژوهشی که در آن اثر گلوتامین بر اسپرم بز پس از انجماد بررسی شد، مشاهده گردید که گلوتامین سبب بهبود تحرک اسپرم پس از انجماد شد. طوری‌که غلظت ۸۰ میلی‌مول گلوتامین سبب بهبود حرکت اسپرم پس از انجماد شد (De-Mercado و همکاران، ۲۰۰۹).

## نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن اسیدآمینه گلوتامین بخصوص سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌مول آن به منی رقیق شده قوچ عربی، می‌تواند موجب حفاظت از اسپرم طی زمان‌های مختلف نگهداری منی به حالت مایع در ۵ درجه سانتی‌گراد شود. بطوری-که ۹۶ ساعت پس از ذخیره منی، سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌مول گلوتامین باعث افزایش حدود ۱۴ درصدی تحرک پیش‌رونده و قابلیت زنده‌مانی و نیز کاهش حدود ۵ درصدی میزان ناهنجاری-های مورفولوژیکی اسپرم نسبت به تیمار شاهد شدند.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان به سبب فراهم ساختن امکانات تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع

حسن پور، س.، روستایی علی مهر، م. و محمدی، م. (۱۳۹۳). اثر افزودن ال گلوتامین به رقیق کنندهٔ تریس بر انجماد اسپرم پوشش دارشدهٔ قوچ تالشی. علوم دامی ایران. دوره ۴۵، شماره ۳، ص ص. ۲۹۶-۲۸۹.

Agarwal, A., Nallella, K.P., Allamaneni, S. and Said, T.M. (2004) Role of antioxidant in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine Online*. 8: 616-627.

Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennigs, Z. and et al. (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 59(2): 1037-1046.

Alvarez, J.G. and Storey, B.T. (2005) Differential incorporation of fatty acids into andperoxidative loss of fattyacids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*. 42(3): 334-346.

Badr, M.R., Rawash, Z.M., Ghada, H., Abdel, R., Assi, M.M. and Hasan, H.M. (2015) Effect of amino acids on ram sperm freezability biochemical ultrastructure changes and fertilizing potentials. *Assiut Veterinary Medical Journal.* 61(146).

Bandyopadhyay, A.K., Ray, P.R. and Ghatak, P.K. (2003) Effective utilization of buffalo milk for manufacturing dairy products. In Proceedings of the 4th *Asian Buffalo Congress* 191.

Blom, E. (1983) Pathological conditions in the genital organs and in the semen as ground for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark. *Nordisk Veterinary Medicine.* 45: 105-130.

Bucak, M.N., Atessahin, A. and Yuce, A. (2008) Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research.* 75(2):128-134.

Bucak, M.N., Tuncera, P.B., Sariozkan, S. and Ulutas, P.A. (2009) Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research.* 81(1): 13-17.

De-Mercado, E., Hernandez, M., Sanz, E., Rodriguez, A., Gomez, E., Vazquez, J.M. and Roca, J. (2009) Evaluation of L-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 115(1):149-157.

El-Sheshtawy, R.I., El-Sisy, G.A. and El-Nattat, W.S. (2008) Use of selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. *Global Veterinaria.* 2(4): 146-150.

Evans, G. and Maxwell, W.M.C. (1987) Handling and examination semen. In: Maxwell WMC, editor. Salamon's artificial insemination of sheep and goat. Sydney: Butterworths 93-106.

Foote, R.H., Brockett, C. and Kaproth, M.T. (2002) Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science.* 71(1): 13-23.

Ibrahim, SF., Osman, K., Das, S., Othman, A.M., Majid N.A. and Rahman, M.P. (2008) A study of the antioxidant effect of alpha lipoic acids on sperm quality. *Clinics.* 63(4): 545-550.

Khlifaoui, M., Battut, I., Bruyas, J.F., Chatagnon, G., Trimeche, A. and Tainturier, D. (2005) Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology.* 63(1): 138-149.

Li, Y., Si, W., Zhang, X., Dinnyes, A. and Ji, W. (2003) Effect of amino acids on cryopreservation of cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) sperm. *American Journal of Primatology.* 59(4): 159-165.

Lapointe, J. and Bilodeau, J.F. (2003) Antioxidants defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*. 68(4): 1157–1164.

Phillips, P.H. (1939) Preservation of bull semen. *The Journal of Biological Chemistry.* 130: 415.

Salamon, S. and Maxwell, W.M.C. (2000) Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science.* 62(1): 77-111.

Sangeeta, S., Arangasamy, A., Kulkarni, S. and Selvaraju, S. (2015) Role of amino acids as additives on sperm motility plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science.* 161: 82-88.

Sariozkan, S., Bucack, M.N., Purhan, B.T., Pinar, A.U. and Ali, B. (2009) The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology.* 58(2): 134–138.

Sariozkan, S., Ozdamar, S., Turk, G., Canturk, F. and Yay, A. (2014) In vitro effects of L-carnitine and glutamine on motility acrosomal abnormality and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology*. 68(3): 349-353.

Topraggaleh, T.R., Shahverdi, A., Rastegarnia, A., Ebrahimi, B., Shafiepour, V., Sharbatoghli, M. and et al. (2014) Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of buffalo bull. *Andrologia* 46(7): 777-783.

Uysal, O. and Bucak, M.N. (2007) Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Burno* 76: 383-390.