DOI: 10.22092/vj.2019.126494.1587
شماره ۱۲۸ پاییز ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بهبود بازده اسپرم منجمد در قوچ با استفاده از آنتی اکسیدان گلوتاتیون

• رضا مسعودی (نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• احمد زارع شحنه
گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
• نادر اسدزاده
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۳-۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۵-۰۲
Email: rezamasoudi@ut.ac.ir

چکیده

هدف از اجرای این طرح بهبود بازده باروری اسپرم در گوسفند با افزودن آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون به محیط انجماد بود. در این آزمایش اسپرم از ۵ رأس قوچ نژاد زل جمع‌آوری به رقیق‌کننده‌های حاوی صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌مولار گلوتاتیون اضافه و سپس منجمد شدند. در مرحله ارزیابی آزمایشگاهی کیفیت اسپرم، اسپرم‌های منجمد مورد ارزیابی آزمایشگاهی قرار گرفتند و فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی، سلامت غشا، مورفولوژی، سلامت آکروزوم، فعالیت میتوکندری و میزان لیپید پراکسیداسیون مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استفاده از ۴ میلی مولار گلوتاتیون منجر به بهبود جنبایی کل، جنبایی پیشرونده، سلامت غشا، فعالیت میتوکندری، سلامت آکروزوم، زنده مانی و کاهش آپوپتوزیس و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در اسپرم منجمد قوچ پس از یخگشایی شد. استفاده از تیمار ۸ میلی مولار گلوتاتیون منجر به کاهش کیفیت اسپرم پس از یخگشایی شد و استفاده از آنتی اکسیدان گلوتاتیون تاثیری بر مورفولوژی اسپرم پس از فرایند انجماد-یخگشایی نداشت. در نتیجه استفاده از تیمار ۴ میلی مولار آنتی اکسیدان گلوتاتیون می‌تواند راهکاری در جهت بهبود بازده باروری اسپرم قوچ پس از فرایند انجماد-یخگشایی باشد.

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

● Veterinary Researches & Biological Products No 128 PP: 69-75

Improvement of Ram's Frozen Sperm Quality Using Glutathione Antioxidant

By: Masoudi. R., (Corresponding Author) Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Shahneh, A.Z., Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. and Asadzadeh, N., Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2019-06-01 **AccePted: 2019-07-24**

Emali: rezamasoudi@ut.ac.ir

The aim of this study was improvement of ram frozen semen efficiency using addition of glutathione antioxidant to freezing medium. In this experiment, semen samples were collected from five Zell rams and add to the extender containing 0, 0.5, 1, 2, 4 and 8 mM glutathione. In sperm quality evaluation, sperm samples were evaluated and motion parameters, membrane integrity, morphology, acrosome integrity, mitochondria activity, viability and lipid peroxidation were assessed. The results showed using 4 mM glutathione resulted in improving of sperm total and progressive motility, membrane integrity, mitochondria activity, acrosome integrity, and viability as well as reduction of apoptosis rate and lipid peroxidation. Using the treatment of 8 mM glutathione caused to reduction of sperm quality after thawing and the antioxidantd did not have any effect on sperm morphology. In conclusion, using 4 mM glutathione in freezing extender could be a suitable method to improve ram sperm reproductive performance after freeze-thaw process.

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

مقدمه

پرورش گوسفند در ایران دارای قدمت تاریخی بسیار طولانی می‌باشد اما به علت عدم بازده تولید مثلی و عدم استفاده بهینه از تلقیح مصنوعی و بازده پایین اسپرم منجمد در صنعت پرورش گوسفند، صرفه اقتصادی خوبی از این صنعت به دست نیامده و رشد چندانی نکرده است. تلقیح مصنوعی مهم‌ترین تکنیکی است که برای اصلاح ژنتیکی حیوانات ارائه شده است، چرا که در آن، تنها با چند رأس حیوان نر انتخابی، می‌توان اسپرم مورد نیاز برای تلقیح هزاران ماده را در سال برآورده کرد. از مزایای سرد کردن و منجمد کردن اسپرم می‌توان به بارور نمودن هم‌زمان تعداد زیادی ماده با استفاده از اسپرم نرهای با نژاد برتر، از میان رفتن هزینه‌های مربوط به نگه‌داری نرها، افزایش مخزن ژنی، انتقال آسان مایع منی از مراکز تولید و جمع‌آوری به دورترین مکان‌ها، از بین رفتن اختلاف در فصل جفت‌گیری در دام‌های دارای فصل تولیدمثلی است و از طرف دیگر مشکلی برای برنامه‌ریزی جفت‌گیری وجود نخواهد داشت (۱۶). هم‌چنین می‌توان به ذخیره‌ی ژن‌ها برای استفاده‌ی آینده و تضمین در مقابل از دست دادن نرهای منحصر به فرد و جلوگیری از انقراض نسل نژادهای خاص اشاره نمود. افزون بر این تلقیح مصنوعی جایگزین اقتصادی و مقرون به صرفه‌ای برای تلقیح طبیعی است بدون این که خطرات و آسیب‌های نگه‌داری دام نر را به همراه داشته باشد. امروزه تلاش‌های قابل ملاحظه‌ای بر روی تکوین تکنیک‌های انجماد اسپرم در حال انجام است. انجماد اسپرم با مشکلاتی از جمله کاهش زنده‌مانی و تحرک اسپرم‌ها بعد از فرایند انجماد- یخ گشایی مواجه است. زنده مانی و تحرک اسپرم پس از انجماد– یخ-گشایی متاثر از عامل‌های متعددی از قبیل کیفیت منی، نوع و غلظت اجزای موجود در محیط انجماد می‌باشد (۲۱). بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان در محیط انجماد مناسب منی که بتواند از اسپرم‌ها در برابر آسیب‌های انجماد- یخ‌گشایی محافظت کند و زنده‌مانی و تحرک اسپرم را بعد از انجماد- یخ‌گشایی حفظ کند، گام مهمی در جهت استفاده از تلقیح مصنوعی است. همچنین استفاده از منبع آنتی‌اکسیدانی در رقیق‌کننده انجماد از راهکارهای بهبود کیفیت اسپرم پیش از انجماد می باشد.

گلوتاتیون که به آن ال-گلوتاتیون، ال-گاما گلوتامبل و ال-سیستینیل گلیسین نیز می‌گویند، یک زنجیره سه تایی آمینواسید است که بطور طبیعی در بدن تولید می‌شود. گلوتاتیون که در هر سلول بدن یافت می‌شود، یک ملکول کوچک است که از سه آمینواسید سیستین، گلیسین و اسید گلوتامیک درست شده است. تحقیقات نشان می‌دهد که کاهش سریع گلوتاتیون احیاء شده درون سلولی که در طی نگهداری اسپرم در شرایط هوازی اتفاق می‌افتد به خاطر واکنش گروه سولفیدریل گلوتاتیون با دیگر مولکول‌ها و در نتیجه تبدیل آن به گلوتاتیون اکسید شده و کاهش غلظت گلوتاتیون احیا شده است. در نتیجه این واکنش، پروتئین‌های سطح غشاء با گروه سولفیدریل واکنش داده و گروه‌های دی

سولفیدی تشکیل می‌دهد که می‌تواند باعث حفاظت از سطح غشاء در برابر آسیب‌های اکسیداتیو شود (۲۶).
هدف از این مطالعه بهبود بازده اسپرم منجمد قوچ با استفاده از افزودن منبع آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون به رقیق کننده انجماد اسپرم می‌باشد تا بدین طریق بتوان کارایی اسپرم قوچ را در ارزیابی های آزمایشگاهی بهبود بخشید.

مواد و روش‌کار

پنج رأس قوچ نژاد زل سه تا چهار ساله با میانگین وزنی ۲/۵ ± ۵۷ کیلوگرم برای این مطالعه انتخاب شدند. جیره پایه شامل ۸۰۰ گرم جو، ۵۰۰ گرم یونجه، ۶۰۰ گرم کاه، ۲۵۰ گرم سبوس و ویتامین E بود. سپس قوچها برای اسپرم دهی عادت دهی شده و جمع آوری منی دوبار در هفته با استفاده از واژن مصنوعی انجام شد. اسپرم از قوچها جمع‌آوری و به رقیق کننده حاوی صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌مولار گلوتاتیون اضافه و سپس منجمد شدند. رقیق کننده بر پایه‌ی تریس حاوی (۲/۷ گرم تریس، ۱ گرم فروکتوز، ۱/۴ گرم سیتریک اسید در ۱۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر)، هفت درصد گلیسرول و با PH=۷ و اسمولاریته ۳۲۰ میلی اسمول، به عنوان رقیق کننده پایه منی استفاده شد. سپس به رقیق کننده ۲۰ درصد (حجم/حجم) زرده تخم‌مرغ اضافه شد.
بلافاصله پس از جمع‌آوری منی، نمونه‌ها داخل بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌های منی گرفته شده در هر نوبت با هدف از میان برداشتن اثرات فردی با یکدیگر آمیخته شدند. قبل از مخلوط شدن نمونه‌های اسپرم، ارزیابی‌های اولیه روی آن‌ها صورت گرفت و فقط از نمونه‌هایی برای انجماد استفاده شد که دارای اسپرم‌های با جنبایی بیش از ۷۰ درصد بودند. رقیق‌سازی به نسبت یک حجم منی و ۱۰ حجم محیط انجمادی در دمای اتاق انجام شد طوری که غلظت نهایی اسپرم ۴۰۰ میلیون در هر میلی لیتر باشد (۱۰۰ میلیون اسپرم در هر پایت (۰/۲۵).
تعداد اسپرم در انزال با استفاده از لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری شمارش شد.
پس از فرآیند انجماد-ذوب فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل پارامترهای حرکتی، زنده مانی، سلامت غشا، مورفولوژی طبیعی، یکپارچگی آکروزوم، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم و نیز درصد میتوکندری‌های فعال اسپرم ارزیابی شد.
به منظور بررسی ویژگی‌های جنبایی اسپرم پس از انجماد-ذوب در گروه‌های مختلف تیماری، نرم افزار کامپیوتری آنالیز جنبایی اسپرم مورد استفاده قرار گرفت. فراسنجه‌ها شامل موارد زیر است:
جنبایی کل (TM): درصد اسپرم‌های جنبا؛ جنبایی پیش‌رونده (PM): درصد اسپرم‌های دارای جنبایی رو به جلو؛ LIN: درصد خطی بودن حرکت اسپرم؛ STR: راستی مسیر طی شده؛ VCL: سرعت در مسیر منحنی؛ ALH: دامنه جابه‌جایی سر اسپرم؛ VAP: میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر؛ VSL: سرعت در مسیر مستقیم.
در این مطالعه برای بررسی فعالیت و یکپارچگی غشاء از تست تورم هیپواسموتیک HOST استفاده شد. تست هاست که مطابق با روش Revell و همکاران (۱۹۹۴) می‌باشد، بر اساس اسمولاریتی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. در این روش اسپرم با دم گره خورده به عنوان اسپرم دارای غشای سالم و اسپرم با دم گره نخورده به عنوان اسپرم با غشای آسیب دیده دسته‌بندی می‌شود (۱۹). تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش‌شده و سپس درصد اسپرم‌های با غشاء سالم و آسیب‌دیده محاسبه شد.
برای بررسی مورفولوژی اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد (۲۰). برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی، حداقل ۳ قطره از هر نمونه (۳۰ میکرولیتر) به میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک اضافه شد. یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط لامل پوشانده شد. توسط میکروسکوپ معکوس فازکنتراست و با بزرگنمایی ×۴۰۰ تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و به صورت درصد کل اسپرم‌های غیر طبیعی (آکروزوم غیرطبیعی، سر جدا شده، نقص‌های دم و قطعه میانی اسپرم) به کل اسپرم شمارش و گزارش شد.
برای اندازه‌گیری یکپارچگی آکروزم از رنگ فلورسنت PSA استفاده شد (۱۵). تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید با میکروسکوپ فلورسنت (BX ; OlymPus۵۱) با بزرگنمایی ۴۰۰ ارزیابی شد. اسپرم‌های با سر سبز به عنوان آکروزوم دست نخورده و سالم و اسپرم‌های با کمربند سبز به عنوان آکروزم تخریب شده در نظر گرفته شد.
در این تحقیق فعالیت میتوکندریایی به وسیله رودامین-۱۲۳ اندازه‌گیری شد (۱۵) رودامین-۱۲۳ یک پروب فلورسنت کاتیونی است که با غشای داخلی میتوکندری باند می‌شود. پس از آن میزان فعالیت میتوکندریایی نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شدند. در نمودار دستگاه فلوسایتومتر نمونه رودامین مثبت و PI منفی (PI-/R۱۲۳+) باشد، به عنوان نمونه دارای میتوکندری فعال و نمونه رودامین مثبت و PI مثبت (PI+/R۱۲۳+) باشد به عنوان میتوکندری غیر فعال در نظر گرفته شد.
در این آزمایش از فسفاتیدیل سرین، به عنوان یک نشانگر برای تشخیص زنده بودن یا آپوپتوزیس اسپرم استفاده شد. حضور این نشانگر در سطح غشای پلاسمایی اسپرم، از نشانه اولیه آپوپتوزیس است که در حالت طبیعی یا حالت زنده اسپرم در داخل سیتوپلاسم اسپرم یافت می‌شود (۹). پس از آن میزان جابه‌جایی فسفاتیدیل‌سرین غشای اسپرم در نمونه‌ها به وسیله فلوسایتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. در نمودار دستگاه فلوسایتومتر نمونه‌های آنکسین منفی و PI منفی (-A- /PI) به عنوان اسپرم زنده تلقی شدند. نمونه‌های آنکسین مثبت و PI منفی (-A+/PI) زنده ولی دچار آپوپتوزیس اولیه بودند. نمونه‌های آنکسین مثبت و PI مثبت (+A+/PI) به عنوان اسپرم مرده و دچار آپوپتوزیس ثانویه شده تلقی شدند و آنکسین منفی و PI مثبت (+A-/PI) به عنوان اسپرم نکروز شده تلقی در نظر گرفته شدند.
اندازه‌گیری غلظت MDA با تیوباربیوتوریک اسید (TBA) یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدها است (۱۷). یک مولکول MDA با دو مولکول TBA واکنش می‌دهد و فرآورده این واکنش، مولکولی صورتی رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد. جذب نوری نمونه‌های مختلف یادداشت شدند و در پایان، نتایج حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتری در فرمول منحنی استاندارد گذاشته و غلظت MDA (نانو مول در میلی‌لیتر منی) محاسبه شد.
ارزیابی کیفیت اسپرم در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام

شد.

$$Yij= \mu+Ai+eij$$

Y: متغیر وابسته (مشاهدات)، A: اثر غلظت تیمار آنتی‌اکسیدان، e: اثر عوامل باقیمانده

نتایج و بحث

جنبایی و فراسنجه‌های حرکتی اسپرم پس از انجماد-یخگشایی در رقیق کننده که حاوی دوزهای مختلف آنتی اکسیدان گلوتاتیون بوده‌اند در جدول یک نشان داده شده است. نتایج جنبایی و فراسنجه‌های حرکتی نشان داد که گروه دریافت کننده چهار میلی‌مولار گلوتاتیون بیشترین میزان (P<۰/۰۵) جنبایی و جنبایی پیشرونده را نشان داده است. در مورد سایر فراسنجه‌های حرکتی اختلافی میان گروه‌های تیماری وجود نداشت. در این مطالعه استفاده از گلوتاتیون منجر به بهبود جنبایی کل و جنبایی پیشرونده شد که نتایج حاصل با نتایج مطالعات انجام شده در انسان (۱۱)، گاو (۵) و خوک (۱۰) همخوانی داشت. شاید بازده بالاتر اسپرم در گروه‌های دریافت کننده گلوتاتیون به دلیل حضور گروه‌های تیول سطحی باشد که نقش مهمی را در تحرک اسپرم دارا می‌باشند (۶). نتایج مربوط به سلامت غشا، مورفولوژی اسپرم، فعالیت میتوکندری، سلامت آکروزوم، زنده‌مانی، آپوپتوزیس و میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم قوچ پس از یخگشایی در جدول دو نشان داده شده است. نتایج تست هاست نشان داد که در مورد سلامت غشا پس از یخگشایی بیشترین درصد اسپرم با غشا سالم مربوط به گروه دریافت کننده چهار میلی‌مولار گلوتاتیون بوده و استفاده از هشت میلی مولار گلوتاتیون کمترین میزان سلامت غشا را نشان داده است (P<۰/۰۵). نتایج این قسمت با نتایج مطالعات انجام شده در قوچ (۲۶) همخوانی داشت ولی این نتایج مغایر با نتایج انجام شده در بز (۲۰) بوده است.

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

نتایج فلوسایتومتری و رنگ آمیزی با رودامین-۱۲۳ نشان داد که در مورد فعالیت میتوکندری پس از یخگشایی بیشترین درصد اسپرم با میتوکندری فعال مربوط به گروه‌های دریافت کننده یک، دو و چهار میلی‌مولار گلوتاتیون بوده و استفاده از هشت میلی مولار گلوتاتیون کمترین میزان میتوکندری فعال را نشان داده است (P<۰/۰۵). شواهد حاکی از این است که گلوتاتیون دارای اثرات مثبتی بر فعالیت میتوکندری می‌باشد. میتوکندری ارگان اصلی برای تولید انرژی است که تولید آن برای حرکت اسپرم ضروری است پس فعالیت صحیح میتوکندری برای حرکت اسپرم و رسیدن آن به محل لقاح ضروری است (۴). بنابراین ارزیابی فعالیت میتوکندری شاخص مناسبی برای تخمین باروری اسپرم است. نرخ اسپرم با میتوکندری سالم دارای همبستگی مثبتی با زنده مانی (۱۲) و باروری

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

تیمارها	۰ G	۰,۵ G	۱ G	۲ G	۴ G	۸ G	SEM
(٪) TM	۴۳/۵ b	۴۲/۲ b	۴۴/۶ b	۴۵/۰ b	۵۱/۲ a	۳۰/۴ c	۱/۵
(٪) PM	۲۱/۲ c	۲۳/۰ bc	۲۳/۲ bc	۲۳/۴ bc	۳۰/۱ a	۱۲/۸ d	۱/۳
VAP (µm/s)	۸۸/۴	۸۶/۹	۸۸/۷	۹۲/۴	۹۰/۷	۸۹/۹	۳/۸
VSL (µm/s)	۷۱/۱	۷۲/۰	۷۲/۳	۷۱/۵	۷۱/۴	۷۰/۸	۱/۱
VCL (µm/s)	۱۷۰/۲	۱۷۱/۰	۱۶۹/۹	۱۶۸/۴	۱۷۰/۴	۱۷۱/۱	۲/۲
(٪) LIN	۴۱/۷	۴۲/۱	۴۲/۵	۴۲/۴	۴۱/۹	۴۱/۳	۲/۷
ALH (µm)	۷/۲	۷/۱	۷/۶	۷/۵	۷/۴	۷/۲	۰/۶
BCF (Hz)	۲۶/۰	۲۶/۴	۲۶/۵	۲۶/۲	۲۶/۵	۲۵/۸	۰/۸

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

(۴) می‌باشد.

نتایج تست سلامت آکروزوم نشان داد که پس از یخگشایی بیشترین درصد اسپرم با آکروزوم سالم مربوط به گروه دریافت کننده چهار میلی‌مولار گلوتاتیون بوده و استفاده از هشت میلی‌مولار گلوتاتیون کمترین میزان سلامت آکروزوم را نشان داده است (P<۰/۰۵). کاپاسیته شدن اسپرم و ظرفیت پذیری دو مرحله کلیدی در باروری اسپرم می‌باشد. وجود آکروزوم سالم برای انجام واکنش آکروزوم ضروری می‌باشد (۳) بنابراین ارزیابی آکروزوم در راستای ارزیابی قدرت باروری بسیار مهم می‌باشد. استفاده از گلوتاتیون سلامت آکروزوم بیشتری را نسبت به سایر تیمارها نشان داد که این پدیده نشان می‌دهد استفاده از این آنتی اکسیدان می‌توانددر راستای حفظ فعالیت و سلامت آکروزوم مفید باشد. نتایج این مطالعه تاییدکننده نتایج قبلی در در اسپرم بز (۲۳) است که در آن استفاده از گلوتاتیون منجر به کاهش نرخ خسارت به آکروزوم شد. نتایج مشابهی نیز در گونه‌های دیگر نظیر گاو (۲۴)، گاومیش (۱) و خوک (۸) گزارش شده است.

با بررسی نتایج فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی آنکسین-۵ در مورد زنده‌مانی و میزان پیشرفت آپوپتوزیس گروه‌های دریافت‌کننده دو و چهار میلی‌مولار گلوتاتیون بیشترین درصد اسپرم زنده و کمترین درصد اسپرم مرده را نشان دادندکه این اختلاف نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار بوده و گروه دریافت‌کننده هشت میلی‌مولار گیلوتاتیون کمترین مقدار اسپرم زنده و بیشترین مفدار اسپرم مرده را نشان داد (P<۰/۰۵). استفاده از دوز مناسب گلوتاتیون در رقیق کننده انجماد اسپرم منجر به بهبود زنده مانی و کاهش نرخ آپوپتوزیس و نکروزیس می‌شود (۲۴). در فرایند ذخیره انجمادی افزایشی در سطوح رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود که تولید آنیون های سوپراکسید را افزایش می‌دهد که این فرایند منجر به کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاهش مقدار گلوتاتیون می‌گرددکه نتیجه این فرآیند ها کاهش قدرت باروری است. گلوتاتیون سبب حفظ قدرت باروری از طریق پاکسازی رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۱۴) که بصورت مانعی در برابر پراکسیداسیون لیپیدهاست. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعات دیگر در این زمینه همخوانی داشته است (۲). در هنگام استفاده از گلوتاتیون در رقیق‌کننده انجماد اسپرم کمترین میزان تولید مالون دی آلدهاید که شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی می‌باشد مربوط به گروه‌های دریافت کننده دو و چهار میلی مولار گلوتاتیون بوده است که اختلاف آن‌ها نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵) و در گروه دریافت‌کننده هشت میلی مولار گلوتاتیون بیشترین مقدار تولید مالون دی آلدهاید دیده شد که بیانگر اثر منفی دوز بالای این آنتی‌اکسیدان می‌باشد. به نظر می رسد غلظت بالای گلوتاتیون می‌تواند سبب افزایش نامطاوب سیالیت غشا شود که این امر اسپرم را نسبت به پراکسیداسیون لیپیدها حساس می‌کند و دارای اثرات زیان بار بر روی اسپرم است. همچنین ممکن است سطوح بالای گلوتاتیون هومئوستازی کلسیم را تغییر دهد (۲۲) مضاف بر اینکه غلظت بالای کلسیم اسپرم را نسبت به آسیب‌های انجمادی حساس می‌کند (۱۸).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که آنتی اکسیدان گلوتاتیون دارای اثرات محافظتی مناسبی برای انجماد اسپرم می باشد. این ترکیب دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی در سطوح مناسب است به طوریکه پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم کاهش پیدا کرد و همزمان شاخص‌ها و

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

تیمارها	۰ G	۰,۵ G	۱ G	۲ G	۴ G	۸ G	SEM
سلامت غشا	۳۹ b	۳۸/۵ b	۴۱/۶ b	۴۲/۱ b	۴۶/۱ a	۳۲/۸ c	۱/۳
مورفولوژی غیر طبیعی	۱۴/۹	۱۴/۳	۱۲/۹	۱۵/۷	۱۴/۶	۱۵	۱/۵
فعالیت میتوکندری	۴۵/۱ b	۴۶/۴ b	۴۸/۷ ab	۴۸/۹ ab	۵۲/۱ a	۳۹/۸ c	۱/۹
سلامت آکروزوم	۵۹/۷ bc	۵۶/۲ c	۵۷/۴ bc	۶۱/۴ b	۶۷ a	۵۲/۲ d	۱/۷
زنده مانی	۴۳/۲ b	۴۵ b	۴۵/۵ b	۴۶/۷ ab	۵۰ a	۳۴/۱ c	۱/۴
آپوپتوزیس	۵۶/۸ b	۵۵ b	۵۴/۵ b	۵۳/۳ ab	۵۰ a	۶۶/۹ d	۱/۶
پراکسیداسیون لیپیدی	۴/۲ b	۴/۲ b	۳/۹ a	۳/۸ a	۳/۸ a	۴/۵ c	۰/۰۹

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

فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از انجماد بهبود یافت. محیط انجماد حاوی چهار میلی‌مولار گلوتاتیون باعث افزایش جنبایی کل، جنبایی پیش رونده، یکپارچگی غشای پلاسمایی، زنده مانی و سایر فراسنجه‌های سلولی اسپرم قوچ پس فرایند از انجماد-یخگشایی شد در نتیجه می‌توان با استفاده از خواص محافظتی این آنتی‌اکسیدان‌ها در هنگام فرایند انجماد بازده تولیدمثلی اسپرم را پس فرایند یخگشایی حفظ نمود.

منابع مورد استفاده

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

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

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

4 - Bartoov, B., F. Eltes, R. Weissenberg and B. Lunenfeld. 1980. Morphological characterization of abnormal human spermatozoa using transmission electron microscopy. *Archives of Andrology*. 5: 305–322.

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

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

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

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

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

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

11 - Gadea, J., M. Molla, E. Selles, M.A. Marco and et al. 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*. 62: 40–46.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25 -Tuncer, P.B., M.N. Bucak, S. Büyükleblebici, S. Sariözkan and

et al. 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*. 61: 303–307.

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