

تاثیر افزودن آنتی اکسیدان گلوتاتیون به رقیق کننده اسپرم بر کیفیت اسپرم سرد شده قوچ

• مختار مهاجر (نویسنده مسئول)

موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۰۸-۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱-۰۹-۰۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱-۰۹-۰۱ تاریخ انتشار: ۱۴۰۴-۰۴-۰۱

Email: mokhtar_mohajer@yahoo.com



چکیده

هدف از این مطالعه بررسی حفظ کیفیت اسپرم در گوسفند با استفاده از آنتی اکسیدان گلوتاتیون طی فرآیند سردسازی بوده است. در این آزمایش اسپرم از ۵ رأس قوچ نژاد زل جمع‌آوری به رقیق‌کننده‌های حاوی صفر، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌مولار گلوتاتیون اضافه و سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت ذخیره شدند. کیفیت اسپرم در زمان‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی مورد ارزیابی آزمایشگاهی قرار گرفتند و فراسنجه‌های جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشا، فعالیت میتوکندری و میزان لیپید پراکسیداسیون مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد در زمان ۰ اختلافی بین تیمارها مشاهده نشد. در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی، استفاده از تیمار ۴ میلی‌مولار گلوتاتیون منجر به بهبود جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشا، و همچنین کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در اسپرم سرد شده قوچ شد. در نتیجه استفاده از تیمار ۴ میلی‌مولار آنتی اکسیدان گلوتاتیون می‌تواند راهکاری مناسب در جهت حفظ کیفیت اسپرم قوچ در هنگام فرآیند سردسازی باشد.

کلمات کلیدی: ارزیابی اسپرم، سردسازی، گلوتاتیون، قوچ

● Veterinary Researches & Biological Products No 139 pp: 122-127

The Effect of Glutathione Addition to the Sperm Extender on Ram Cooled Sperm Quality

By: Mohajer, M., (Corresponding Author) Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2022-11-08 Accepted: 2022-11-22

Revised: 2022-11-22 Published: 2023-07-22

Email: mokhtar_mohajer@yahoo.com

The aim of this study was to evaluate the sperm quality preservation in sheep using glutathione antioxidant during cooling process. In this experiment, semen samples were collected from 5 Zella rams and added to the extender containing 0, 1, 2, 4 and 8 mM glutathione and stored at 4 °C until 48 hours. Sperm quality was evaluated at 0, 24 and 48 hours after cooling and total motility, progressive motility, viability, membrane integrity, mitochondrial activity and lipid peroxidation were assessed. No difference was observed between treatments at time 0 of cooling. At 24 and 48 hours of cooling period, the use of 4 mM glutathione increased total motility, progressive motility, viability, membrane integrity, mitochondrial activity and decreased lipid peroxidation in ram cooled sperm. In conclusion, using 4 mM glutathione antioxidant treatment could be a suitable method to preserve ram sperm quality during cooling process.

Key words: Sperm evaluation, Cooling, Glutathione, Ram

می‌شود، یک مولکول کوچک است که از سه آمینواسید سیستین، گلیسین و اسید گلوتامیک درست شده است. تحقیقات نشان می‌دهد که کاهش سریع گلوکوتاتیون احیاء شده درون سلولی که در طی نگهداری اسپرم در شرایط هوازی اتفاق می‌افتد به خاطر واکنش گروه سولفیدریل گلوکوتاتیون با دیگر مولکول‌ها و در نتیجه تبدیل آن به گلوکوتاتیون اکسید شده و کاهش غلظت گلوکوتاتیون احیاء 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 (۱۶).

هدف از این مطالعه حفظ کیفیت اسپرم سرد شده قوچ در زمان ذخیره سرمایی با استفاده از افزودن منبع آنتی‌اکسیدانی گلوکوتاتیون به رقیق‌کننده اسپرم می‌باشد تا بدین طریق بتوان کارایی اسپرم قوچ را در ارزیابی‌های آزمایشگاهی بهبود بخشید.

مواد و روش‌ها

مدیریت دام‌ها، آماده‌سازی رقیق‌کننده و اعمال تیمارها

پنج رأس قوچ نژاد زل سه تا چهار ساله با میانگین وزنی $57 \pm 2/5$ کیلوگرم برای این مطالعه انتخاب شدند. جیره پایه شامل ۸۰۰ گرم جو، ۵۰۰ گرم یونجه، ۶۰۰ گرم گاه، ۲۵۰ گرم سبوس و ویتامین E بود. سپس قوچ‌ها برای اسپرم‌دهی عادت‌دهی شده و جمع‌آوری منی انجام شد. اسپرم از قوچ‌ها جمع‌آوری و به رقیق‌کننده حاوی صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌مولار گلوکوتاتیون اضافه و سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. رقیق‌کننده پایه شامل ۲/۷ گرم تریس، ۱ گرم فروکتوز و ۱/۴ گرم سیتریک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر بود. سپس به رقیق‌کننده ۲۰ درصد (حجم/حجم) زرده تخم‌مرغ اضافه شد.

مقدمه

علیرغم سابقه طولانی پرورش گوسفند در ایران، اما به علت عدم بازده تولیدمثلی و عدم استفاده بهینه از تلقیح مصنوعی و بازده پایین اسپرم فراوری شده در صنعت پرورش گوسفند، صرفه اقتصادی خوبی از این صنعت به دست نیامده و رشد چندانی نکرده است. تلقیح مصنوعی از مهم‌ترین تکنیک‌هایی است که برای اصلاح ژنتیکی حیوانات ارائه شده است، زیرا 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 نرها با نژاد برتر اشاره کرد (۱۷). همچنین تلقیح مصنوعی جایگزین اقتصادی و مقرون به صرفه‌ای برای تلقیح طبیعی است بدون این که خطرات و آسیب‌های نگره‌داری دام نر را به همراه داشته باشد. امروزه تلاش‌های قابل ملاحظه‌ای بر روی تکوین تکنیک‌های سردسازی و انجماد اسپرم در حال انجام است. فراوری سرمایی اسپرم با مشکلاتی از جمله کاهش زنده‌مانی و تحرک اسپرم‌ها بعد از فراوری مواجه است. عوامل متعددی از قبیل کیفیت منی، نوع و غلظت اجزای موجود در رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم فراوری شده تاثیر می‌گذارند (۱۳). بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان در رقیق‌کننده مناسب منی که بتواند از اسپرم‌ها در برابر آسیب‌های سرمایی محافظت کند و زنده‌مانی و تحرک اسپرم را بعد از سردسازی حفظ کند، گام مهمی در جهت استفاده از تلقیح مصنوعی است. همچنین استفاده از منبع آنتی‌اکسیدانی در رقیق‌کننده از راهکارهای بهبود کیفیت اسپرم می‌باشد. گلوکوتاتیون که به آن ال-گلوکوتاتیون، ال-گاما گلوتامیل و ال-سیستینیل گلیسین نیز می‌گویند، یک زنجیره سه‌تایی آمینواسید است که بطور طبیعی در بدن تولید می‌شود. گلوکوتاتیون که در هر سلول بدن یافت

جنبایی پیش‌رونده (PM) ثبت و گزارش شدند.

زنده‌مانی

برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد (۱۷). این روش بر این اساس می‌باشد که اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. رنگ نیگروزین برای رنگ‌آمیزی پس‌زمینه و ایجاد اختلاف میان اسپرم و رنگ زمینه برای دید بهتر است. برای این رنگ‌آمیزی ۱۰ μl از نمونه‌ی اسپرم را برداشته و بر روی لام قرار داده و سپس ۱۰ μl از رنگ آماده‌شده ائوزین-نیگروزین روی نمونه ریخته و با سر سمپلر به آرامی نمونه را هم زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. سپس ۱۰ μl از نمونه را بر گوشه‌ی لام دیگری قرار داده و با یک لام دیگر گسترش تهیه می‌شود. پس از خشک شدن لام را زیر میکروسکوپ قرار داده و از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ به خود نگرفته بودند و یا تنها بخشی از گردن آن‌ها رنگ گرفته بود به عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شد.

سلامت غشا

برای بررسی فعالیت و یکپارچگی غشا از تست تورم هیپواسموتیک استفاده شد. تست هاست بر اساس اسمولاریتی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند (۱۳). اسمولاریته محیط هاست ۱۰۰ میلی‌اسمولار و اسمولاریته موردنیاز برای اسپرم ۳۷۵-۳۲۰ میلی‌اسمول است. بنابراین اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریته پایین به سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. بدیهی است که تنها اسپرم‌های با غشا سالم قادر هستند به این نوع تغییر واکنش دهند و اسپرم‌های مرده که در این محیط قرار می‌گیرند هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند. در واقع پس از انجام این تست اسپرم‌های با دم گره‌خورده به‌عنوان اسپرم‌های زنده و اسپرم‌هایی که دم آن‌ها صاف است به‌عنوان اسپرم مرده تلقی می‌شوند.

نمونه‌های منی دوبار در هفته با استفاده از واژن مصنوعی جمع‌آوری 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 ادامه استفاده شد که دارای اسپرم‌های با جنبایی بیش از ۷۰ درصد بودند. رقیق‌سازی به نسبت یک حجم منی و ۱۰ حجم رقیق‌کننده در دمای اتاق انجام شد طوری که غلظت نهایی اسپرم ۴۰۰ میلیون در هر میلی‌لیتر باشد تعداد اسپرم در انزال با استفاده از لام نتوبار زیر میکروسکوپ نوری شمارش شد.

ارزیابی نمونه‌های سرد شده

فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشا، فعالیت میتوکندری و میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ذخیره‌سازی سرمایی ارزیابی شدند.

جنبایی

به منظور بررسی ویژگی‌های حرکتی اسپرم در گروه‌های مختلف، نرم‌افزار کامپیوتری آنالیز جنبایی اسپرم مورد استفاده قرار گرفت (۱۲). بدین ترتیب که ۳ استرا از هر گروه تیماری به داخل میکروتیوب انتقال داده شدند. سپس با استفاده از سمپلر، ۵ میکرولیتر از منی روی لام تخلیه شده و یک لامل تمیز روی آن قرار گرفت. لام مورد نظر به زیر میکروسکوپ فاز کنتراست منتقل شده و با استفاده از سیستم آنالیز کامپیوتری، جنبایی اسپرم با استفاده از رایانه مجهز به نرم‌افزار SCA ارزیابی شد. برای برآورد درصد جنبایی اسپرم، سه میدان دید به صورت تصادفی گزینش و اجازه داده شد تا سیستم نرم‌افزاری در هر میدان دید ۵ بررسی و جمعاً ۱۵ بررسی برای هر نمونه انجام دهد. فراسنجه‌های جنبایی کل (TM) و

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف گلووتاتیون بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم پس از فرایند سردسازی.

جنبایی پیش‌رونده اسپرم (%)			جنبایی اسپرم (%)			فراسنجه
۴۸ h	۲۴ h	۰ h	۴۸ h	۲۴ h	۰ h	تیمار (میلی‌مولار)
۱۴/۰ ^b	۲۸/۰ ^b	۶۵/۰	۲۸/۹ ^b	۵۱/۰ ^b	۸۵/۵	۰
۱۵/۵ ^b	۲۹/۰ ^b	۶۶/۳	۳۱/۰ ^b	۵۰/۵ ^b	۸۶/۰	۱
۱۶/۱ ^b	۳۰/۳ ^b	۶۶/۰	۳۱/۵ ^b	۵۱/۲ ^b	۸۷/۴	۲
۲۰/۰ ^a	۳۴/۶ ^a	۶۵/۵	۳۵/۸ ^a	۵۵/۵ ^a	۸۶/۵	۴
۱۴/۵ ^b	۲۹/۴ ^b	۶۵/۲	۳۰/۲ ^b	۵۰/۰ ^b	۸۵/۱	۸
۱/۴	۱/۱	۱/۰	۱/۵	۱/۰	۱/۳	SEM

حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ستون است ($P < 0.05$).

واکنش، مولکولی صورتی رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد. یک میلی‌لیتر از هر نمونه منی با یک میلی‌لیتر EDTA، یک میلی‌لیتر BHT و ۲ میلی‌لیتر TCA با هم مخلوط شده و به داخل لوله ریخته شده و در $1200 \times g$ برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، یک میلی‌لیتر از محلول بالای لوله‌ها با یک میلی‌لیتر TBA در میکروتیوب، آمیخته شدند. لوله‌ها برای مدت ۲۰ دقیقه در صفحه گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند و سپس جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر (با اسپکتروفوتومتر) اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

آنالیز آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد.

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

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

نتایج و بحث

نتایج مربوط به جنبایی کل و پیشرونده اسپرم قوچ پس از صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی در رقیق‌کننده حاوی دوزهای مختلف آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون در جدول شماره یک نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد، به طور کلی با افزایش زمان ذخیره‌سازی اسپرم، میزان توانایی جنبایی کل و پیشرونده اسپرم نسبت به زمان استحصال منی کاهش می‌یابد، اما استفاده از تیمار ۴ میلی‌مولار گلوتاتیون بالاترین درصد جنبایی کل و پیشرونده را در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از سردسازی به همراه داشت که این اختلاف در مقایسه با سایر گروه‌ها معنی‌دار بوده است ($P < 0.05$) ولی در زمان صفر تیمارها تاثیر معنی‌داری از خود نشان ندادند. در این مطالعه استفاده از گلوتاتیون منجر به بهبود جنبایی کل

به این منظور ۳۰ میکرولیتر از اسپرم رقیق‌شده با رقیق‌کننده به نسبت ۱:۱۰ را با ۳۰۰ میکرولیتر از محلول هاست مخلوط کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه را بر روی یک‌گوشه لام قرار داده و با لام دیگر به آرامی گسترش تشکیل و پس از خشک شدن با استفاده از میکروسکوپ نوری نمونه‌ها را می‌توان ارزیابی کرد. تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شده و سپس درصد اسپرم‌های با غشا سالم و آسیب‌دیده محاسبه شد.

فعالیت میتوکندری

در این تحقیق فعالیت میتوکندریایی به وسیله رودامین-۱۲۳ اندازه‌گیری شد (۹ رودامین-۱۲۳ یک پروب فلورسنت کاتیونی است که با غشای داخلی میتوکندری باند می‌شود. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت میتوکندریایی ابتدا پایوت‌های اسپرم یخ‌گشایی و برای حذف قسمت رقیق‌کننده سانتریفیوژ شدند و سپس پلت تشکیل شده با ۵۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس مخلوط شد. رنگ رودامین باید در جای تاریک به نمونه اضافه شود. ۱۰ میکرولیتر رودامین به نمونه اضافه شده و در مکان تاریک و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از طی زمان ۲۰ دقیقه به مقدار ۱۰ میکرولیتر PI به نمونه اضافه شد. پس از آن میزان فعالیت میتوکندریایی نمونه‌ها به وسیله دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. نمودار دستگاه فلوسایتومتر نمونه رودامین مثبت و PI منفی ($PI/R123^+$) باشد، به عنوان نمونه دارای میتوکندری فعال و نمونه رودامین مثبت و PI مثبت ($PI/R123^+$) باشد به عنوان میتوکندری غیرفعال در نظر گرفته شد.

پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی

اندازه‌گیری غلظت MDA با تیوباربیوتوریک اسید (TBA) یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدها است (۱۰). یک مولکول MDA با دو مولکول TBA واکنش می‌دهد و فرآورده این

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف گلوتاتیون بر زنده‌مانی و سلامت غشا اسپرم پس از فرایند سردسازی.

سلامت غشا اسپرم (%)			زنده‌مانی اسپرم (%)			فراستجه
۴۸ h	۲۴ h	۰ h	۴۸ h	۲۴ h	۰ h	تیمار (میلی‌مولار)
۳۴/۳ ^b	۶۲/۰ ^b	۹۰/۰	۳۱/۳ ^b	۶۰/۱ ^b	۸۸/۸	۰
۳۶/۴ ^b	۶۳/۵ ^b	۹۰/۰	۳۳/۵ ^b	۶۱/۵ ^b	۸۹/۵	۱
۳۷/۵ ^b	۶۴/۰ ^b	۹۰/۸	۳۴/۷ ^b	۶۲/۰ ^b	۹۰/۰	۲
۴۰/۰ ^a	۶۶/۴ ^a	۹۰/۵	۳۸/۴ ^a	۶۵/۵ ^a	۹۰/۰	۴
۳۵/۵ ^b	۶۲/۳ ^b	۸۹/۶	۳۲/۵ ^b	۶۱/۰ ^b	۸۹/۱	۸
۱/۴	۱/۱	۰/۵	۱/۸	۱/۵	۰/۸	SEM

حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ستون است ($P < 0.05$).

اثرات زیان بار بر روی اسپرم است. همچنین ممکن است سطوح بالای گلوتاتیون هومئوستازی کلسیم را تغییر دهد (۱۴) مضاف بر اینکه غلظت بالای کلسیم اسپرم را نسبت به آسیب‌های انجمادی حساس می‌کند (۱۱). نتایج فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی با رودامین-۱۲۳ نشان داد که در مورد فعالیت میتوکندری پس از سردسازی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، بیشترین درصد اسپرم با میتوکندری فعال مربوط به گروه‌های دریافت‌کننده ۴ میلی‌مولار گلوتاتیون بوده که اختلاف آن با گروه کنترل و سایر تیمارها معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$). 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 (۲). بنابراین ارزیابی فعالیت میتوکندری شاخص مناسبی برای تخمین باروری اسپرم است. نرخ اسپرم با میتوکندری سالم دارای همبستگی مثبتی با زنده ماندن (۷) و باروری (۲) می‌باشد. استفاده از دوز مناسب گلوتاتیون در رقیق‌کننده اسپرم منجر به بهبود زنده‌مانی و کاهش نرخ آپوپتوزیس و نکروزیس می‌شود (۱۵). در فرایند ذخیره‌سازی افزایشی در سطوح رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود که تولید آنیون‌های سوپراکسید را افزایش می‌دهد که این فرایند منجر به کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاهش مقدار گلوتاتیون می‌گردد که نتیجه این فرآیندها کاهش قدرت باروری است. گلوتاتیون سبب حفظ قدرت باروری از طریق پاکسازی رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۸) که به صورت مانعی در برابر پراکسیداسیون لیپیدهاست. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعات دیگر در این زمینه همخوانی داشته است (۱).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد گلوتاتیون دارای اثرات محافظتی مناسبی برای حفظ کیفیت اسپرم می‌باشد. این ترکیب دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی

و جنبایی پیشرونده شد که نتایج حاصل با نتایج مطالعات انجام شده در انسان (۶)، گاو (۳) و خوک (۵) همخوانی داشت. شاید بازده بالاتر اسپرم در گروه‌های دریافت‌کننده گلوتاتیون به دلیل حضور گروه‌های تیول سطحی باشد که نقش مهمی را در تحرک اسپرم دارا می‌باشند (۴). نتایج مربوط به زنده‌مانی و سلامت غشا اسپرم قوچ پس از سردسازی در جدول دو نشان داده شده است. در زمان صفر هیچکدام از تیمارها تأثیری بر زنده‌مانی و یا سلامت غشا اسپرم نداشتند. در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از سردسازی، نتایج تست هاست و ائوزین-نیگروزین نشان داد که در مورد سلامت غشا و زنده‌مانی اسپرم بیشترین درصد اسپرم زنده و با غشا سالم مربوط به گروه دریافت‌کننده ۴ میلی‌مولار گلوتاتیون بوده که اختلاف آن با گروه‌های کنترل و سایر تیمارها معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$). نتایج این قسمت با نتایج مطالعات انجام شده در قوچ (۱۶) همخوانی داشت ولی این نتایج مغایر با نتایج انجام شده در بز (۱۲) بوده است.

نتایج مربوط به پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و فعالیت میتوکندری اسپرم قوچ پس از صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی در رقیق‌کننده حاوی دوزهای مختلف آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون در جدول شماره سه نشان داده شده است. مشابه با تست‌های قبلی در زمان صفر اختلافی بین تیمارها مشاهده نشد. نتایج نشان می‌دهد استفاده از گلوتاتیون در رقیق‌کننده اسپرم در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی موجب کاهش تولید MDA می‌شود به طوری که کمترین میزان تولید MDA مربوط به گروه دریافت‌کننده ۴ میلی‌مولار گلوتاتیون بوده است که اختلاف آن با گروه کنترل و سایر تیمارها معنی‌دار بود ($P < 0/05$). تیمارهای ۱ و ۲ میلی‌مولار گلوتاتیون نیز نسبت به گروه‌های شاهد ۸ میلی‌مولار مقدار کمتری از پراکسیداسیون لیپیدی را نشان دادند ($P < 0/05$). به نظر می‌رسد غلظت بالای گلوتاتیون می‌تواند سبب افزایش نامطلوب سیالیت غشا شود که این امر اسپرم را نسبت به پراکسیداسیون لیپیدها حساس می‌کند و دارای

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف گلوتاتیون بر غلظت MDA تولیدی و فعالیت میتوکندری اسپرم پس از فرایند سردسازی.

فعالیت میتوکندریایی اسپرم (%)			غلظت MDA (nmol/ml)			فراسنجه
۴۸ h	۲۴ h	۰ h	۴۸ h	۲۴ h	۰ h	تیمار (میلی‌مولار)
۳۳/۰ ^b	۶۳/۵ ^b	۸۶/۲	۸/۱۵ ^c	۵/۶۰ ^c	۲/۲۵	۰
۳۴/۲ ^b	۶۵/۰ ^b	۸۵/۷	۷/۴۹ ^b	۵/۰۰ ^b	۲/۲۰	۱
۳۵/۴ ^b	۶۵/۶ ^b	۸۶/۴	۷/۳۵ ^b	۴/۹۵ ^b	۲/۳۱	۲
۳۹/۸ ^a	۷۰/۰ ^a	۸۵/۳	۶/۸۵ ^a	۴/۵۵ ^a	۲/۲۵	۴
۳۳/۵ ^b	۶۴/۱ ^b	۸۶/۰	۷/۹۵ ^c	۵/۴۸ ^c	۲/۲۲	۸
۲/۰	۲/۲	۱/۲	۰/۲۲	۰/۱۵	۰/۱۱	SEM

حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ستون است ($P < 0/05$).

ity and reproductive performance. *Animal Reproduction Science*. 225:106671.

11- 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.

12- 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.

13- 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.

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

15- Stradaoli, 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.

16- 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.

17- Zarei, F., Kia, H.D., Masoudi, R., Moghaddam, G. and Ebrahimi, M. 2021. Supplementation of ram's semen extender with Mito-TEMPO I: Improvement in quality parameters and reproductive performance of cooled-stored semen. *Cryobiology*. 98:215-218.



بالایی در سطوح مناسب است به طوری که پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم را کاهش داده و موجب حفظ فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از سردسازی می‌شود. رقیق‌کننده حاوی ۴ میلی‌مولار گلوکاتینون باعث حفظ بهتر جنبایی کل، جنبایی پیش رونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و فعالیت میتوکندریایی اسپرم قوچ پس فرایند از سردسازی شد و در نتیجه می‌توان با استفاده از خواص محافظتی این آنتی‌اکسیدان، بازده تولیدمثلی اسپرم را پس طی فرایند سردسازی حفظ نمود.

منابع مورد استفاده

1- 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.

2- 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.

3- 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.

4- 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.

5- 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.

6- 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.

7- 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.

8- Masoudi, R., Sharafi, M., Pourazadi, L., Davachi, N.D., Asadzadeh, N., Esmailkhanian, S. and Dirandeh, E., 2020. Supplementation of chilling storage medium with glutathione protects rooster sperm quality. *Cryobiology*. 92: 260-262.

9- Masoudi, R., Asadzadeh, N. and Sharafi, M. 2020. The mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO conserves rooster's cooled semen quality and fertility potential. *Theriogenology*. 156: 236-241.

10- Masoudi, R., Asadzadeh, N. and Sharafi, M. 2021. Effects of freezing extender supplementation with mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO on frozen-thawed rooster semen qual-