نشریه علوم دامی

شماره ۱٤٦، بهـــار ۱٤۰٤

ص‌ص: ۱۲۵~۱۳۸

ارزیابی اثرات آنتی‌اکسیدانی کوآنزیم Q10 بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز سانن پس از فرایند انجماد

• رضا مسعودی[۱]، فاطمه زارعی[۲]، نادر اسدزاده*[۱]، شهروز خرمی[۱]

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

۲- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت : اردیبهشت ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش : مرداد ۱۴۰۳

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۲۳۱۶۷۸

Email: nader.asadzadeh4@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI):10.22092/ ASJ.2025.367020.2417

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 بر انجمادپذیری اسپرم بز سانن بود. به این منظور از پنج رأس بز بالغ نژاد سانن استفاده شد. پس از اسپرم‌گیری به‌وسیله واژن مصنوعی و ارزیابی اولیه، نمونه‌های منی در رقیق‌کننده تریس حاوی غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 (۰، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار) رقیق‌سازی و سپس منجمد شدند. فراسنجه‌های حرکتی، سلامت غشا، مورفولوژی، فعالیت میتوکندری، سلامت آکروزوم، غلظت مالون‌دی‌آلدئید و زنده‌مانی پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد استفاده از غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 به ترتیب بیشترین و کمترین اثر را بر حفظ فراسنجه‌های کیفی اسپرم در طول فرایند انجماد داشته است (P<۰/۰۵). به این ترتیب که بیشترین میزان تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا، فعالیت میتوکندری، سلامت آکروزوم و زنده‌مانی اسپرم و کمترین میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید به عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدی مربوط به غلظت ۱۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 بود (P<۰/۰۵). بنابراین افزودن آنتی‌اکسیدان کوآنزیم Q10 به رقیق‌کننده اسپرم روشی مناسب جهت حفظ فراسنجه‌های کیفی اسپرم منجمدشده بز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کوآنزیم Q10، اسپرم، بز، انجماد.

Copyright: © 2024 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by **Research Journal of Livestock Science** (https://asj.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Research Journal of Livestock Science No 146 pp: 125-138

Evaluation of antioxidant effects of CoQ10 on quality parameters of Saanen buck sperm after freezing process

By: Reza Masoudi[1], Fatemeh Zarei[2], Nader Asadzadeh[1*], Shahrouz Khorrami[1]
1:Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
2:Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: May 2024 **Accepted: August 2024**

The current study was aimed to assess the influence of adding different concentrations of CoQ10 on the freezability of buck sperm. For this purpose, five adult Saanen bucks were used. After semen collection by using an artificial vagina and primary evaluation, semen samples were diluted with tris extender supplemented with different CoQ10 (0, 0.1, 1, 10 and 100 µM) concentraitons and were frozen. Motility, membrane integrity, morphology, mitochondria activity, acrosome integrity, viability and malondialdehyde (MDA) concentration were evaluated after thawing. The results showed that using 10 and 100 µM concentrations of CoQ10 had the highest and lowest effect on the preservation of sperm qualitative parameters during the freezing process, respectively. In this way the highest percentages of total motility, progressive motility, membrane integrity, mitochondria activity, acrosome integrity and viability and lowest MDA concentration as a marker of lipid peroxidation were observed in extenders containing 10 µM CoQ10. Therefore, supplementation of freezing medium with CoQ10 could be an efficient method to preserve the quality of buck's semen.

Key words: CoQ10, Sperm, Buck, Quality evaluation, Freezing

مقدمه

انجماد اسپرم به عنوان یکی از روش‌های اساسی فناوری‌های تولید مثلی، ابزاری کارآمد برای مطالعات جنین‌شناسی و تلقیح مصنوعی محسوب می‌شود (Mocé و همکاران، ۲۰۱۶)، اما رویدادهای کرایوبیولوژیک که در حین انجماد رخ می‌دهد، با ایجاد آسیب فیزیکی و اختلال در ساختارهای شیمیایی سلول، فراسنجه‌های کیفی آن را تحت تأثیر قرار داده به‌طوری که میزان زنده‌مانی و باروری اسپرم بعد از فرایند انجماد کاهش می‌یابد (Zarei و همکاران ۲۰۲۲، Walters و همکاران، ۲۰۱۸، Masoudi و همکاران، ۲۰۱۸ و Reed و همکاران، ۲۰۰۹). اسپرم مانند هر سلول دیگر در شرایط هوازی با مصرف اکسیژن در زنجیره تنفس میتوکندری، ATP مورد نیاز خود را تأمین می‌کند و در مقابل، سایر متابولیت‌های اکسیژن نظیر رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در این مسیر تولید می‌کند که می‌تواند برای بقا سلول مضر باشد (Saleh، ۲۰۰۲). رادیکال‌های آزاد اصلی‌ترین عامل استرس شیمیایی طی فرآیند انجماد و یخ‌گشایی هستند. این مولکول‌ها پیوند دوگانه اسید چرب غیر اشباع را مورد حمله قرار داده و فرایند پراکسیداسیون لیپیدی را به راه می‌اندازند (Wang و همکاران، ۲۰۱۴). غشا پلاسمایی اسپرم دارای اسیدهای چرب غیر اشباع فراوانی است، بنابراین شرایط برای آسیب پراکسیداسیونی مساعد است (Ogbuewu و همکاران، ۲۰۱۰). علاوه بر این اسپرم در انتهای فرایند تمایز مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهد و از آنجایی که بیشتر آنزیم‌ها در سیتوپلاسم سلول قرار دارند، با این حذف سیتوپلاسمی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم کاهش می‌یابد (Walters و همکاران، ۲۰۱۸). در نتیجه عدم تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد در سلول منجر به ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و سرکوب قابلیت زنده‌مانی و باروری

اسپرم یخ‌گشایی شده می‌شود (Agarwal و همکاران، ۲۰۱۴ و Aitken و همکاران، ۲۰۱۴). بنابراین افزودن آنتی‌اکسیدان به رقیق‌کننده اسپرم به عنوان یک سیستم حفاظتی کمکی می‌تواند روشی مؤثر برای غلبه بر اثرات منفی رادیکال آزاد در طول فرایند انجماد و یخ‌گشایی باشد.

کوآنزیم Q10 که به نام‌های یوبی‌کینون و یوبی‌کارانون نیز شناخته می‌شود یک ترکیب شبه ویتامینی و محلول در چربی است که به طور طبیعی در همه سلول‌های یوکاریوتی یافت می‌شود (Bentinger و همکاران، ۲۰۱۰). کوآنزیم Q10 از یک حلقه بنزوکینون و یک زنجیره جانبی ایزوپرنوئید چربی‌دوست تشکیل شده و در درجه اول در غشا داخلی میتوکندری قرار دارد (Ernster و همکاران، ۱۹۹۵). در واقع این ترکیب جزیی از زنجیره انتقال الکترون است که در تنفس هوازی جهت تولید انرژی نقش مهمی دارد (Littarru و Tiano، ۲۰۰۷). علاوه بر این کوآنزیم Q10 به عنوان یک آنتی‌اکسیدان درون سلولی در محافظت از غشا سلول و لیپوپروتئین‌های آن دارای نقشی حیاتی است (Ernster و Forsmark-Andree، ۱۹۹۳). به این ترتیب که کوآنزیم Q10 به‌عنوان یک حامل انرژی در چرخه اکسیداسیون و احیا در حرکت است و همزمان دارای خاصیت احیاکنندگی و اکسیدکنندگی است، اما در فرم احیا شده ترجیح می‌دهد الکترون را نگه دارد تا آن را از دست بدهد. بنابراین، ماهیت آنتی‌اکسیدانی کوآنزیم Q10 ناشی از خاصیت حامل انرژی بودن آن می‌باشد (Littarru و Tiano، ۲۰۰۷). کوآنزیم Q10به عنوان یک آنتی‌اکسیدان شاخه شکن محلول در چربی عمل می‌کند و همچنین پراکسیداسیون لیپیدی را از طریق جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های چربی مهار می‌کند (Masoudi و همکاران، ۲۰۱۹). در بیضه، مقدار قابل توجهی کوآنزیم Q10 سنتز می‌شود که نشان‌دهنده اثر این ترکیب در محافظت از اسپرم در برابر رادیکال‌های آزاد و همچنین تسهیل تولید انرژی است (Mancini و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات متعدد بر روی اثرات کوآنزیم Q10 بر عملکرد اسپرم گونه‌های مختلف انجام شده که نشان‌دهنده نقش مثبت آن در حفظ کیفیت اسپرم در طول فرایند سردسازی و انجماد می‌باشد، از جمله در اسپرم انسان (Talevi و همکاران، ۲۰۱۳)، گاو (Saeed و همکاران، ۲۰۱۶)، نریان (Yousefian و همکاران، ۲۰۱۴)، بز مهابادی (Yousefian و همکاران، ۲۰۱۸)، خروس (Masoudi و همکاران، ۲۰۱۸) و گوسفند (Masoudi و همکاران، ۲۰۱۹). این مطالعه با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 در رقیق‌کننده منی بر فراسنجه‌های حرکتی، مورفولوژی، زنده‌مانی، عملکرد غشا، پراکسیداسیون لیپیدی، عملکرد میتوکندری و سلامت آکروزوم اسپرم بز سانن پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی طراحی شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از تعداد پنج رأس بز نژاد سانن سه تا چهار ساله با میانگین وزنی ۵ ±۸۰ کیلوگرم استفاده شد. طی اجرای آزمایش حیوانات جیره پایه بر اساس ضرایب تجزیه‌پذیری ارائه شده توسط جدول AFRC (۱۹۹۵) دریافت نمودند. علاوه بر این، آب و آجر معدنی به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار گرفت. بزها به مدت دو هفته برای اسپرم‌گیری عادت‌دهی شده و جمع‌آوری منی دو بار در هفته و با استفاده از واژن مصنوعی انجام شد. بلافاصله پس از جمع‌آوری منی ارزیابی اولیه انجام شد و بر این اساس فقط از نمونه‌هایی که به رنگ کرمی تا کرمی غلیظ، حجم یک تا دو میلی‌لیتر و دارای اسپرم‌های با تحرک بیش از ۷۰ درصد، زنده‌مانی بیش از ۸۰ درصد و مورفولوژی غیر طبیعی کمتر از ۱۰ درصد بودند برای آزمایش استفاده شد. سپس با هدف از میان برداشتن اثرات فردی، نمونه‌های منی گرفته شده در هر نوبت با یکدیگر آمیخته و وارد مرحله رقیق‌سازی شدند.

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این آزمایش از شرکت مرک و سیگما تهیه شد. رقیق‌کننده بر پایه‌ی تریس (تریس ۳۰/۷ گرم/ لیتر، فروکتوز ۱۲/۶ گرم/ لیتر، اسیدسیتریک ۱۶/۴ گرم/لیتر، گلیسرول ۵ درصد، جنتامایسین ۰/۶ گرم/ لیتر، زرده تخم مرغ ۱۵ درصد) به عنوان رقیق‌کننده پایه منی استفاده شد و غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 (۰، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به این رقیق‌کننده اضافه شد. پس از رقیق‌سازی نمونه منی و

سردسازی در دمای پنج درجه سانتی‌گراد، منی در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری بارگیری شده، در بخار نیتروژن مایع منجمد و در تانک نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) ذخیره شد.

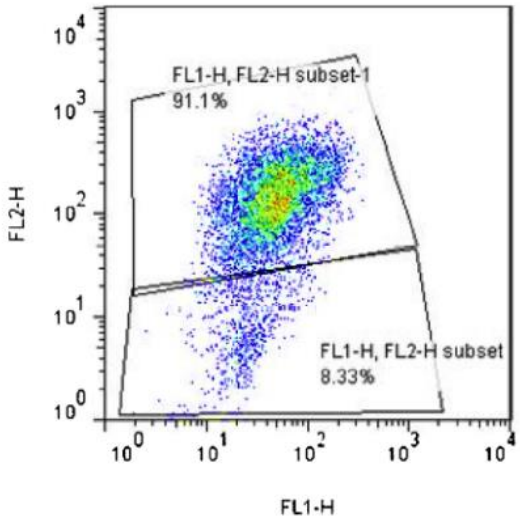
برای بررسی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم پس از فرایند انجماد از نرم افزار کامپیوتری آنالیز اسپرم (CASA) (Version 5.1; Microptic, Barcelona, Spain) استفاده شد. فراسنجه‌های مورد ارزیابی در نرم‌افزار CASA شامل تحرک کل[1] (TM, %)، تحرک پیش‌رونده[2] (PM, %)، درصد خطی بودن حرکت اسپرم[3] (LIN, %)، سرعت در مسیر منحنی[4] (VCL, m/s)، میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر[5] (VAP, m/s) و سرعت در مسیر مستقیم[6] (VSL, m/s) بود (Reed و همکاران، ۲۰۰۹).

برای بررسی سلامت غشا پلاسمایی از تست تورم هیپواسموتیک[7] استفاده شد (Revell و Mrod، ۱۹۹۴). آزمایش هاست بر اساس اسمولاریته محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. اسمولاریته محیط هاست ۱۰۰ میلی‌اسمول و اسمولاریته مورد نیاز برای اسپرم ۳۷۵-۳۲۰ میلی‌اسمول است. بنابراین، اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریته پایین به‌سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن گره می‌خورد. بدیهی است که تنها اسپرم‌های با غشا سالم قادر هستند به این نوع تغییر واکنش نشان دهند و اسپرم‌های مرده که در این محیط قرار می‌گیرند هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند. برای بررسی مورفولوژی اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد و درصد کل اسپرم‌های غیر طبیعی (آکروزوم غیر طبیعی، سر جدا شده، نقص‌های دم و قطعه میانی اسپرم) به کل اسپرم شمارش شد (Schäfer و Holzmann، ۲۰۰۰).

به منظور ارزیابی زنده‌مانی اسپرم از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. ائوزین رنگی است که دارای بار منفی بوده و توسط بار منفی ناشی از اسیدسیالیک غشا پلاسمایی اسپرم زنده دفع می‌شود. بنابراین رنگ ائوزین توانایی عبور از غشا سالم را ندارد، اما با آسیب دیدن غشا این ویژگی از بین رفته و ائوزین می‌تواند از غشا پلاسمایی اسپرم عبور کرده و موجب رنگی شدن اسپرم شود (Salmani و همکاران، ۲۰۱۴).

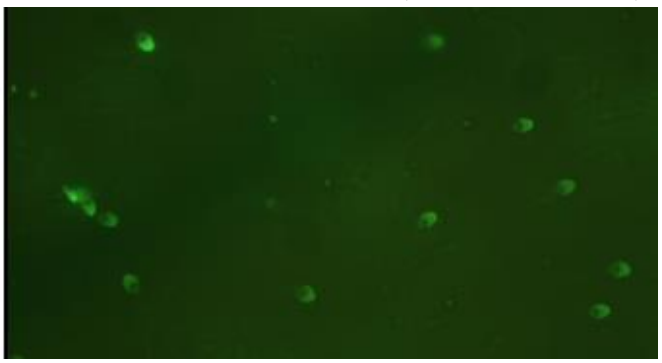
پتانسیل غشا میتوکندری[8] (MMP) اسپرم توسط رنگ رودامین۱۲۳ مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل یک). رودامین۱۲۳ یک پراب فلورسنت کاتیونی است که توسط پتانسیل بین غشایی میتوکندری جذب شده و به غشا داخلی میتوکندری متصل می‌شود. در واقع رنگ رودامین به طور فعال وارد زنجیره تنفسی میتوکندری شده و تجمع آن در میتوکندری موجب تولید رنگ فلورسنس سبز می‌شود. فعالیت میتوکندری نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. در نمودار فلوسایتومتری، نمونه رودامین مثبت و PI منفی (R123+/ PI-) نمونه دارای میتوکندری فعال و نمونه رودامین مثبت و PI مثبت (R123+/PI+)) میتوکندری غیر فعال در نظر گرفته شد (Fattah و همکاران، ۲۰۱۷).

1 _ Total motility
2 _ Progresive motility
3 _ Linearity
4 _ Curvilinear velocity
5 _ Average path velocity
6 _ Straight line velocity
7 _ Hypo-osmotic swelling (HOST) test
8 _ Mitochondrial membrane potential (MMP)



شکل ۱- ارزیابی فعالیت میتوکندری به‌وسیله رنگ رودامین ۱۲۳- (FL1: R123 fluorescence, FL2: PI fluorescence)

برای اندازه‌گیری یکپارچگی آکروزم از رنگ فلورسنت PSA و میکروسکوپ فلورسنت استفاده شد (شکل دو). اسپرم‌های با سر سبز به عنوان اسپرم دارای آکروزوم دست نخورده و سالم و اسپرم‌های با کمربند سبز به عنوان اسپرم با آکروزوم تخریب شده در نظر گرفته شد (Thys و همکاران، ۲۰۰۹).



شکل ۲- ارزیابی سلامت آکروزوم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و رنگ PSA

اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) به عنوان یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدی، توسط تیوباربیوتوریک‌اسید (TBA) یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدی است (Masoudi و همکاران، ۲۰۱۸) که با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. جذب نوری نمونه‌های مختلف یادداشت می‌شود و در پایان نتایج حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتری در فرمول منحنی استاندارد قرار گرفته و غلظت مالون‌دی‌آلدهید (نانومولار در میلی‌لیتر منی) محاسبه می‌شود (Sharafi و همکاران، ۲۰۱۵).

نتایج حاصل از آزمایش غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از Proc GLM به‌وسیله نرم‌افزار آماری SAS آنالیز و سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی انجام شد. مدل آماری طرح به شرح زیر بود:

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

Y_{ij}: مشاهدات

μ: میانگین

T_i: اثر i امین سطح آنتی‌اکسیدان (i=۱-۵)

e_{ij}: اثرات باقیمانده

(j=۱-۶)

نتایج

فراسنجه‌های حرکتی اسپرم

اثر استفاده از تیمارهای مختلف کوآنزیم Q10 بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم بز سانن پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی در جدول یک نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد استفاده از غلظت ۱۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 در رقیق‌کننده منی موجب حفظ تحرک کل (TM)، تحرک پیش‌رونده (PM) و میانگین سرعت در مسیر مستقیم (VAP) پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی شده است که این اختلاف در مقایسه با گروه کنترل و سایر گروه‌ها معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). استفاده از کوآنزیم Q10 تأثیری بر سایر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم مانند سرعت در مسیر مستقیم (VSL)، سرعت در مسیر منحنی (VCL) و درصد خطی بودن حرکت اسپرم (LIN) نداشت.

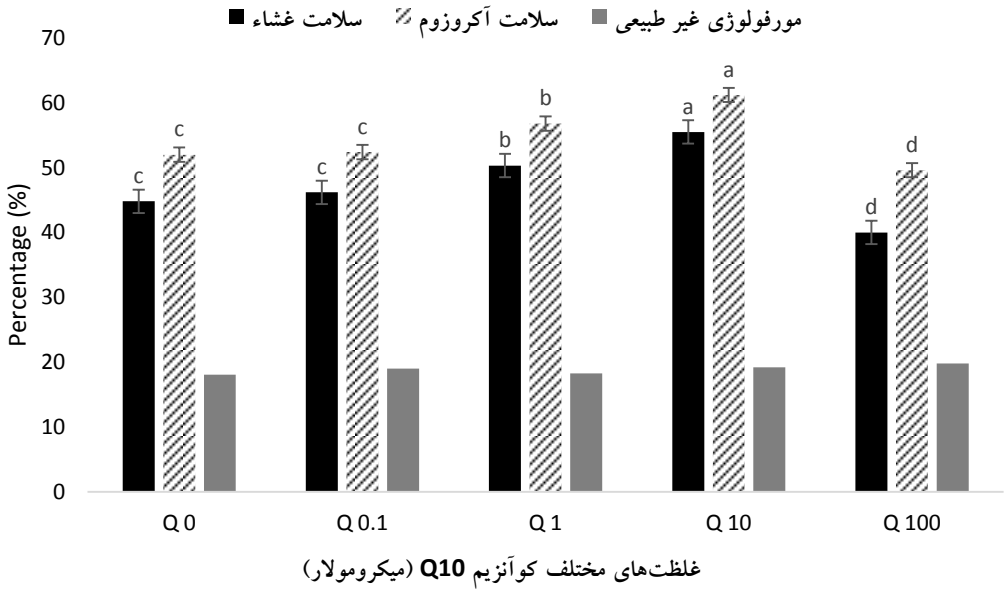
جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی

فراسنجه	کوآنزیم **Q10** (میکرومولار) ۰	۰/۱	۱	۱۰	۱۰۰	SEM
(%)TM	۴۲/۰^{c}	۴۲/۴^{c}	۴۶/۵^{b}	۵۳/۶^{a}	۳۷/۵^{d}	۱/۱
(%) PM	۳۱/۴^{b}	۳۱/۵^{b}	۳۲/۴^{b}	۳۷/۰^{a}	۲۵/۲^{c}	/۶
(µm/s) VAP	۹۳/۶^{b}	۹۴/۰^{b}	۹۴/۵^{b}	۹۸/۷^{a}	۹۰/۲^{c}	/۵
(µm/s) VSL	۷۷/۰	/۵	۷۵/۹	۷۷/۰	/۵	۱/۳
(µm/s) VCL	۱۷۲/۱	۱۷۱/۶	/۰	/۵	۱۷۲/۰	/۶
(%) LIN	۴۴/۷۴	۴۴/۵۸	۴۴/۳۸	۴۴/۶۳	۴۴/۴۷	۱

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

سلامت غشا، سلامت آکروزوم و مورفولوژی اسپرم

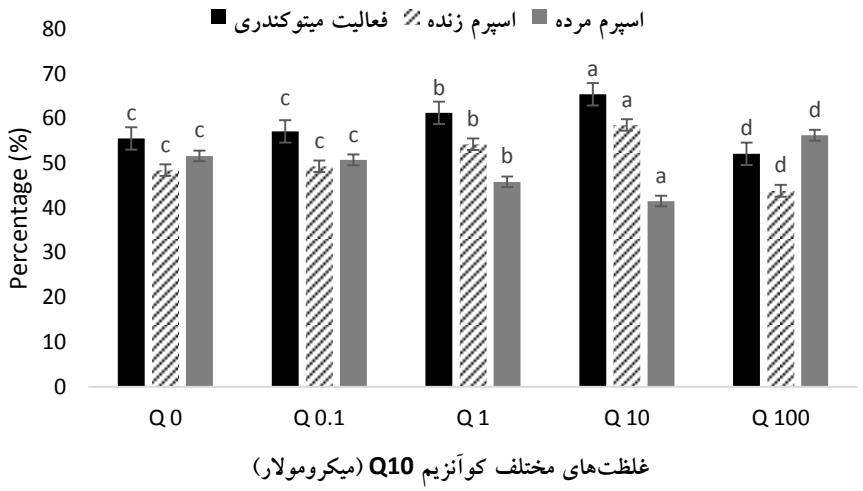
شکل سه تأثیر استفاده از غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 در رقیق‌کننده منی را بر سلامت غشا، سلامت آکروزوم و مورفولوژی اسپرم بز سانن پس از فرایند انجماد نشان می‌دهد. پس از انجام آزمایش هاست، بیشترین درصد اسپرم با غشا سالم در گروه دریافت‌کننده ۱۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 (۱/۸ ± ۵۵/۵) و کمترین درصد اسپرم با غشا سالم مربوط به گروه دریافت‌کننده ۱۰۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 (۱/۸ ± ۴۰) بود که نسبت به گروه‌های Q0 (۱/۸ ± ۴۴/۸)، Q0.1 (۱/۸ ± ۴۶/۲) و Q1 (۱/۸ ± ۵۰/۳) دارای اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵). برای اندازه‌گیری یکپارچگی آکروزوم از رنگ فلورسنت PSA استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی فلورسنت گروه‌های دریافت‌کننده ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 به ترتیب دارای بیشترین (۱/۱ ± ۶۱/۲) و کمترین (۱/۱ ± ۴۹/۶) اسپرم با آکروزوم سالم بودند که با سایر گروه‌ها شامل Q0 (۱/۱ ± ۵۲)، Q0.1 (۱/۱ ± ۵۲/۴) و Q1 (۱/۱ ± ۵۶/۸) اختلاف معنی‌داری نشان داده است (P<۰/۰۵). استفاده از غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 در رقیق‌کننده انجماد اسپرم بز سانن تأثیری بر مورفولوژی اسپرم نداشت و درصد اسپرم با مورفولوژی غیر طبیعی در میان گروه‌ها معنی‌دار نبود (P<۰/۰۵).



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 (میکرومولار) بر سلامت غشا (SEM =1.8)، سلامت آکروزوم (SEM =1.1) و مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم (SEM =1) پس از انجماد و یخ‌گشایی. حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ردیف است (P<۰/۰۵).

فعالیت میتوکندری و زنده‌مانی اسپرم

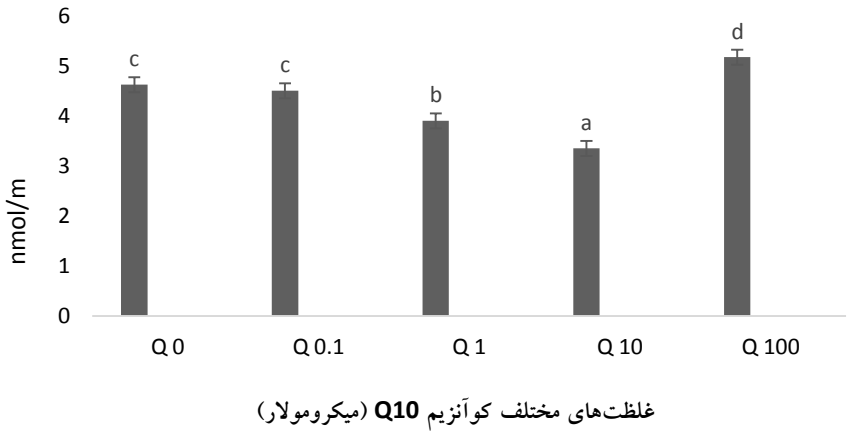
تأثیر استفاده از غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 در رقیق‌کننده انجماد اسپرم بر فعالیت میتوکندری و زنده‌مانی اسپرم بز سانن پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی در شکل چهار نمایش داده شده است. به منظور ارزیابی فعالیت میتوکندری از رنگ فلورسنت رودامین۱۲۳ استفاده شد. نتایج فلوسایتومتری نشان داد بیشترین درصد اسپرم با میتوکندری سالم در گروه دریافت‌کننده ۱۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 (۲/۵ ± ۶۵/۴) و کمترین درصد اسپرم با میتوکندری سالم در گروه دریافت‌کننده ۱۰۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 (۲/۵ ± ۵۲/۱) مشاهد شد که نسبت به سایر گروه‌ها شامل Q0 (۲/۵ ± ۵۵/۵)، Q0.1 (۲/۵ ± ۵۷/۱) و Q1 (۲/۵ ± ۶۱/۲) اختلاف معنی‌داری نشان داده است (P<۰/۰۵). برای ارزیابی زنده‌مانی اسپرم پس از انجماد از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. نتایج نشان داد در میان گروه‌های دریافت‌کننده کوآنزیم Q10 بیشترین و کمترین مقدار اسپرم زنده به ترتیب مربوط به گروه‌های دریافت‌کننده ۱۰ میکرومولار (۱/۳ ± ۵۸/۵) و ۱۰۰ میکرومولار (۱/۳ ± ۴۳/۸) کوآنزیم Q10 بوده است که اختلاف آن با گروه کنترل Q0 (۱/۳ ± ۴۸/۴) و سایر تیمارها شامل Q0.1 (۱/۳ ± ۴۹/۳) و Q1 (۱/۳ ± ۵۴/۲) معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بر این اساس کمترین مقدار اسپرم مرده مربوط به گروه دریافت‌کننده ۱۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 (۱/۲ ± ۴۱/۵) و بیشترین مقدار اسپرم مرده در گروه دریافت‌کننده ۱۰۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 (۱/۲ ± ۵۶/۲) مشاهده شد. نتایج حاصل نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین این دو گروه با سایر گروه‌ها شامل Q0 (۱/۲ ± ۵۱/۶)، Q0.1 (۱/۲ ± ۵۰/۷) و Q1 (۱/۲ ± ۴۵/۸) بود (P<۰/۰۵).



شکل ٤- اثر غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 (میکرومولار) بر فعالیت میتوکندری (SEM =2.5)، اسپرم زنده (SEM =1.3) و اسپرم مرده (SEM =1.2) پس از انجماد و یخ‌گشایی. حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ردیف است (P<۰/۰۵).

میزان پراکسیداسیون لیپیدی

شکل پنج اثر استفاده از کوآنزیم Q10 بر پراکسیداسیون لیپیدهای اسپرم بز سانن پس از فرایند انجماد را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد استفاده از غلظت بهینه کوآنزیم Q10 در رقیق‌کننده اسپرم موجب کاهش تولید مالون‌دی‌آلدهید (MDA) می‌شود، به طوری که کمترین میزان تولید MDA مربوط به گروه دریافت‌کننده ۱۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 (۰/۱۵ ± ۳/۳۵) بود که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها شامل Q0 (۰/۱۵ ± ۴/۶۲)، Q0.1 (۰/۱۵ ± ۴/۵) و Q1 (۰/۱۵ ± ۳/۹) داشت (P<۰/۰۵). بیشترین میزان تولید MDA مربوط به گروه دریافت‌کننده ۱۰۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 (۰/۱۵ ± ۵/۱۷) بود (P<۰/۰۵).



شکل ٥- اثر غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 (میکرومولار) بر میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید (SEM =0.15) پس از انجماد و یخ‌گشایی. حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ردیف است (P<۰/۰۵).

بحث

در تلقیح مصنوعی، حفظ قابلیت زنده‌مانی و باروری اسپرم در کوتاه مدت یا بلند مدت اهمیت بسیاری دارد. در ذخیره‌سازی برون‌تنی منی به صورت مایع یا یخ‌زده، کاهش برگشت‌ناپذیر تحرک و تغییرات مورفولوژیک در اسپرم بروز خواهد کرد (Donoghue وWishart، ۲۰۰۰). بنابراین، بهبود روش‌های ذخیره اسپرم در شرایط مزرعه برای توسعه تلقیح مصنوعی ضروری است. در روند ذخیره سازی اسپرم، اگر چه به کمک سرما سرعت متابولیسم سلول کاهش می‌یابد، ولی وقوع پراکسیداسیون لیپیدها و بروز استرس اکسیداتیو امری اجتناب ناپذیر است (Masoudi و همکاران، ۲۰۱۹). در محیط انجماد، به‌دلیل تنش‌های حرارتی و اکسیداتیو، غلظت رادیکال‌های آزاد بیشتر از آنتی‌اکسیدان‌ها است (Peña و همکاران، ۲۰۰۴). آنتی‌اکسیدان‌های موجود در منی، طی فرآوری و سردسازی اسپرم خصوصیات حفاظتی خود را از دست می‌دهند. علاوه بر این، اسپرم در طول مرحله نهایی اسپرماتوژنز سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهد که موجب می‌شود ترکیب آنتی‌اکسیدانی اسپرم برای مقابله با رادیکال‌های آزاد کافی نباشد. بنابراین، افزودن آنتی اکسیدان‌ها به منی جهت ذخیره‌سازی اسپرم به عنوان یک راه‌کار عملی برای جلوگیری از آسیب‌های ناشی از سردسازی و انجماد مورد توجه قرار گرفته است (Bréque و همکاران، ۲۰۰۳). کوآنزیم Q10 از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است که استفاده از آن در محیط انجماد اسپرم به‌منظور کاهش اثرات رادیکال آزاد توصیه شده است. در این پژوهش نمونه‌های منی از پنج رأس بز نژاد سانن جمع‌آوری و غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 (۰، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به رقیق‌کننده منی اضافه شد. نتایج آزمایش نشان داد استفاده از غلظت ۱۰ میکرومولار کوآنزیم Q10بیشترین تحرک، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشا، سلامت میتوکندری و آکروزوم و کمترین میزان پراکسیداسیون لیپیدی را بعد از فرایند انجماد و یخ‌گشایی اسپرم بز سانن در پی داشت ($P<0/05$) که با نتایج مطالعات قبلی بر روی اسپرم سایر گونه‌ها که در ادامه معرفی می‌شوند مطابقت دارد. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش با افزایش کوآنزیم Q10 میزان تحرک افزایش یافت، اما این افزایش با غلظت کوآنزیم Q10 رابطه خطی نداشت، به‌طوری‌که تا غلظت ۱۰ میکرومولار افزایش فراسنجه‌های حرکتی مشاهده شد و در غلظت ۱۰۰ میکرومولار شاخص تحرک کاهش یافت. این نتایج می‌تواند ناشی از اثرات وابسته به غلظت کوآنزیم Q10 باشد. نتایج مربوط به فراسنجه‌های حرکتی، با نتایج مطالعه بر روی سایر گونه‌ها مانند انسان (Safarinejad، ۲۰۰۹)، اسب (Yousefian و همکاران، ۲۰۱۴)، گوسفند (Masoudi و همکاران، ۲۰۱۹)، خروس (Masoudi و همکاران، ۲۰۱۸) و گاو (Gualtieri و همکاران، ۲۰۱۴) مطابقت دارد. کوآنزیم Q10 در مقادیر بالا در بیضه بیوسنتز می‌شود (Kalen و همکاران، ۱۹۹۰)، در حالی که حجم عمده این تولید در پلاسمای منی مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده نقش حیاتی این ترکیب در متابولیسم و تحرک اسپرم است (Mancini و همکاران، ۱۹۹۸). مطالعات نشان می‌دهد بین کاهش غلظت کوآنزیم Q10 و همچنین شکل احیا شده آن در پلاسمای منی و ابتلا به آستنوسپرمی ایدیوپاتیک[9] (کم تحرکی اسپرم با دلایل ناشناخته) و واریکوسل ارتباط معنی‌داری وجود دارد (Balercia و همکاران، ۲۰۰۲). به این ترتیب که تجویز اگزوژن کوآنزیم Q10 موجب بهبود تحرک اسپرم در مردان مبتلا به آستنوسپرمی شد (Balercia و همکاران، ۲۰۰۹) و همبستگی مثبتی بین غلظت کوآنزیم Q10 و تحرک کل اسپرم وجود داشت (Mancini و همکاران، ۱۹۹۴). علاوه بر این، تجویز کوآنزیم Q10 موجب بهبود سایر فراسنجه‌های منی در مردان مبتلا به آستنوسپرمی (Balercia و همکاران، ۲۰۰۹ و Safarinejad، ۲۰۰۹)، گاو (Gualtieri و همکاران، ۲۰۱۴)، اسب (Yousefian و همکاران، ۲۰۱۴)، بز مهابادی (Yousefian و همکاران، ۲۰۱۸)، خروس (Masoudi و همکاران، ۲۰۱۸) و گوسفند (Masoudi و همکاران، ۲۰۱۹) شد. کاهش حساسیت اسپرم به پراکسیداسیون لیپیدی، یکپارچگی غشا آن را حفظ می‌کند. بنابراین، با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی

[9] - Idiopathic asthenospermia

کوآنزیم Q10 افزودن آن به رقیق‌کننده منی می‌تواند با مهار پراکسیداسیون لیپیدی منجر به محافظت از یکپارچگی غشا اسپرم شود (Littarru و همکاران، ۲۰۰۷). کوآنزیم Q10 همچنین می‌تواند با مهار تشکیل هیدروپراکسیدها، غشا پلاسمایی اسپرم را در برابر اکسیداسیون محافظت کند (Turunen و همکاران، ۲۰۰۴). نتایج به‌دست آمده از ارزیابی سلامت غشا اسپرم نشان داد با افزایش غلظت کوآنزیم Q10 از یک تا ۱۰ میکرومولار سلامت غشا به‌طور معنی‌داری حفظ شد، اما در غلظت ۱۰۰ میکرومولار اثرات افزودن کوآنزیم Q10 منفی بود و یکپارچگی غشا کاهش یافت که احتمالا اثرات منفی غلظت بالای کوآنزیم Q10 عامل این کاهش عملکرد است. نتایج این بخش با نتایج حاصل از مطالعه بر اسپرم منجمد بز مهابادی (Yousefian و همکاران، ۲۰۱۸) و اسب (Yousefian و همکاران، ۲۰۱۴) مطابقت دارد.

نتایج مربوط به فعالیت میتوکندری نشان داد تنها غلظت ۱۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 منجر به حفظ پتانسیل غشا میتوکندری در طول فرایند انجماد شد و سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند. یافته‌ها با نتایج مطالعه یوسفیان و همکاران (۲۰۱۴) در اسب مطابقت دارد (Yousefian و همکاران، ۲۰۱۴). در میتوکندری، کوآنزیم Q10 در انتقال انرژی نقش دارد (Littarru و همکاران، ۲۰۰۷)، در نتیجه سنتز ATP و انتقال آن با میزان فراهمی کوآنزیم Q10 مرتبط است (Lewin و Lavon، ۱۹۹۷). علاوه بر این کوآنزیم Q10 مانع از باز شدن منافذ نفوذپذیری میتوکندری می‌شود. در یک مطالعه نشان داده شد که کوآنزیم Q10 قادر به مقابله با دیپلاریزاسیون بالقوه غشا میتوکندری است که در نتیجه مانع کاهش ATP، آزادسازی سیتوکروم c، فعال شدن کاسپاز-۹ و تکه تکه شدن DNA در کراتینوسیت‌ها در حضور محرک‌های آپوپتوز می‌شود (Turunen و همکاران، ۲۰۰۴). بنابراین، در مطالعه حاضر حفظ فعالیت میتوکندری در طول انجماد احتمالاً به دلیل این دو عملکرد ضروری کوآنزیم Q10 است.

محصول اصلی استرس اکسیداتیو در طول انجماد، رادیکال آزاد است که می‌تواند منجر به تخریب غشا پلاسمایی اسپرم شود. در مطالعه حاضر میزان تولید مالوندی‌آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی مورد ارزیابی قرار گرفت، زیرا فرض بر این بود که در نتیجه افزودن کوآنزیم Q10 میزان پراکسیداسیون لیپیدی کاهش می‌یابد. در این مطالعه غلظت مالوندی‌آلدهید در گروه دریافت‌کننده ۱۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 کمتر از سایر گروه‌ها بود که می‌تواند شاهدی برای پذیرش فرضیه فوق باشد. این نتایج با نتایج حاصل از سایر مطالعات مطابقت دارد (Turunen و همکاران، ۲۰۰۴، Lewin و Lavon، ۱۹۹۷، Yousefian و همکاران، ۲۰۱۴ و Yousefian و همکاران، ۲۰۱۸). کوآنزیم Q10 پراکسیداسیون لیپیدها را از طریق جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های چربی مهار می‌کند (Ernster و همکاران، ۱۹۹۵). علاوه بر این، با شکل‌گیری همزمان یوبی-سمیکینون و H_2O_2، رادیکال‌های اولیه و اکسیژن تک اتمی را نیز احیا می‌کند. این نحوه از بین بردن رادیکال‌های آزاد نه تنها از گسترش پراکسیداسیون چربی جلوگیری می‌کند، بلکه مانع از اکسیداسیون پروتئین‌ها نیز می‌شود. بنابراین، در مقایسه با سایر آنتی‌اکسیدان‌ها این ترکیب با جلوگیری از هر دو مسیر تولید و انتشار اکسیداسیون چربی و پروتئین، عملکرد آنتی‌اکسیدانی خود را نشان می‌دهد (Littarru و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین فرم احیا شده کوآنزیم Q10 با مداخله در مرحله انتشار پراکسیداسیون لیپیدی، به‌صورت مؤثری موجب بازسازی ویتامین E از رادیکال های آلفا-توکوفرول می‌شود (Bentinger و همکاران، ۲۰۰۷).

استفاده از غلظت‌های مختلف کوآنزیم Q10 در رقیق‌کننده انجماد اسپرم بز سانن تأثیری بر مورفولوژی اسپرم نداشت و درصد اسپرم با مورفولوژی غیر طبیعی در میان گروه‌ها معنی‌دار نبود. مورفولوژی اسپرم و تغییرات آن در سطح اسپرماتوژنز انجام می-شود و کمتر دیده شده که تکنیک‌های فراوری بر آن تأثیرگذار باشد (Chenoweth، ۲۰۰۵). نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه شرفی و همکاران در گاو (Sharafi و همکاران، ۲۰۱۵)، مسعودی و همکاران در خروس (Masoudi و همکاران، ۲۰۱۸) و مسعودی و همکاران در گوسفند (Masoudi و همکاران، ۲۰۱۹) مطابقت دارد، اما با نتایج یوسفیان و همکاران (۲۰۱۸) که

در آن مورفولوژی طبیعی اسپرم بز مهابادی پس از انجماد و یخ‌گشایی بهبود یافت مطابقت ندارد (Yousefian و همکاران، ۲۰۱۸). در غلظت ۱۰۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 تمام فراسنجه‌های مورد ارزیابی کاهش نشان داد. این نتایج احتمالا به دلیل اثرات سمی این ترکیب در غلظت بالاست. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها بالاتر از حد آستانه، می‌تواند منجر به تحریک اعمال اکسیداتیو در سلول شود (Nohl و همکاران، ۱۹۹۸ و Breininger و همکاران، ۲۰۰۵). کوآنزیم Q10 در غلظت بالا به شکل ردوکس (واکنش اکسایش کاهش) سمی خود، سمیکوئینون تبدیل می‌شود که می‌تواند اثرات مخرب قابل‌توجهی بر اسپرم داشته باشد (Ernster و همکاران، ۱۹۹۵).

نتیجه گیری کلی

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش استفاده از کوآنزیم Q10 به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در رقیق‌کننده منی بز سانن موجب حفظ فراسنجه‌های کیفی اسپرم در طول فرایند انجماد و یخ‌گشایی شد. کوآنزیم Q10 در غلظت ۱۰ میکرومولار خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نشان داد، به‌طوری که در اسپرم یخ‌گشایی شده بیشترین میزان تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، فعالیت میتوکندری و سلامت آکروزوم و کمترین میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در تیمار دریافت‌کننده ۱۰ میکرومولار کوآنزیم Q10 مشاهده شد. بنابراین، می‌توان استفاده از کوآنزیم Q10 را به عنوان روشی مناسب جهت حفاظت از اسپرم در طول فرایند انجماد و یخ‌گشایی معرفی نمود، اما این اثر وابسته به غلظت است و در مقادیر بالا ممکن است استفاده از آن با بروز اثرات منفی همراه باشد.

منابع

Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & Du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32(1), 1-17. DOI: 10.5534/wjmh.2014.32.1.1

Aitken, R. J., Smith, T. B., Jobling, M. S., Baker, M. A., & De Iuliis, G. N. (2014). Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*, 16(1), 31-38. DOI: 10.4103/1008-682X.122203

Balercia, G., Arnaldi, G., Fazioli, F., Serresi, M., Alleva, R., Mancini, A., ... & Littarru, G. P. (2002). Coenzyme Q10 levels in idiopathic and varicocele-associated asthenozoospermia. *Andrologia*, 34(2), 107-111. DOI: 10.1046/j.0303-4569.2001.00485.x

Balercia, G., Buldreghini, E., Vignini, A., Tiano, L., Paggi, F., Amoroso, S., ... & Littarru, G. (2009). Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Fertility and Sterility*, 91(5), 1785-1792. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.02.119

Bentinger, M., Brismar, K., & Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7, S41-S50. DOI: 10.1016/j.mito.2007.02.006

Breininger, E., Beorlegui, N. B., O'Flaherty, C. M., & Beconi, M. T. (2005). Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 63(8), 2126-2135. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.016

Bréque, C., Surai, P., & Brillard, J. P. (2003). Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 66(3), 314-323. DOI: 10.1002/mrd.10347

Chenoweth, P. J. (2005). Genetic sperm defects. *Theriogenology*, 64(3), 457-468. DOI:10.1016/j.theriogenology.2005.05.005

Donoghue, A. M., & Wishart, G. J. (2000). Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, *62*(1-3), 213-232. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00160-3

Ernster, L., & Dallner, G. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1271(1), 195-204. DOI: 10.1016/0925-4439(95)00028-3

Ernster, L., & Forsmark-Andree, P. (1993). Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *The Clinical Investigator*, 71, S60-S65. DOI: 10.1007/BF00226842

Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., Esmaeili, V., & Najafi, A. (2017). L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*, 74, 148-153. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2016.10.009

Gualtieri, R., Barbato, V., Fiorentino, I., Braun, S., Rizos, D., Longobardi, S., & Talevi, R. (2014). Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. *Theriogenology*, 82(4), 592-598. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.05.028

Kalen, A., Appelkvist, E. L., Chojnacki, T., & Dallner, G. (1990). Nonaprenyl-4-hydroxybenzoate transferase, an enzyme involved in ubiquinone biosynthesis, in the endoplasmic reticulum-Golgi system of rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 265(2), 1158-1164. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)40172-5

Lewin, A., & Lavon, H. (1997). The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Molecular Aspects of Medicine*, 18, 213-219. DOI:10.1016/S0098-2997(97)00036-8

Littarru, G. P., & Tiano, L. (2007). Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q 10: recent developments. *Molecular Biotechnology*, 37, 31-37. DOI:10.1007/s12033-007-0052-y

Mancini, A., Marinis, L. A. U. R. A., Oradei, A., Hallgass, M. E., Conte, G., Pozza, D., & Littarru, G. P. (1994). Coenzyme Q10 concentrations in normal and pathological human seminal fluid. *Journal of Andrology*, 15(6), 591-594. DOI:10.1002/j.1939-4640.1994. tb00504.x

Mancini, A., Conte, G., Milardi, D., De Marinis, L., & Littarru, G. P. (1998). Relationship between sperm cell ubiquinone and seminal parameters in subjects with and without varicocele. *Andrologia*, 30(1), 1-4. DOI:10.1111/j.1439-0272. 1998.tb01374.x

Mancini, A., Milardi, D., Conte, G., Festa, R., De Marinis, L., & Littarru, G. P. (2005). Seminal antioxidants in humans: preoperative and postoperative evaluation of coenzyme Q10 in varicocele patients. *Hormone and Metabolic Research*, 37(07), 428-432. DOI: 10.1055/s-2005-870232

Masoudi, R., Sharafi, M., Shahneh, A. Z., Kohram, H., Nejati-Amiri, E., Karimi, H., ... & Shahverdi, A. (2018). Supplementation of extender with coenzyme Q10 improves the function and fertility potential of rooster spermatozoa after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 198, 193-201. DOI:10.1016/j.anireprosci.2018.09.019

Masoudi, R., Sharafi, M., & Shahneh, A. Z. (2019). Effects of CoQ10 on the quality of ram sperm during cryopreservation in plant and animal based extenders. *Animal Reproduction Science*, 208, 106103. DOI:10.1016/j.anireprosci.2019.06.015

Mocé, E., Fajardo, A. J., & Graham, J. K. (2016). Human sperm cryopreservation. *EMJ*, 1(1), 86-91. DOI:10.33590/emj/10313056

Nohl, H., Gille, L., & Kozlov, A. V. (1998). Antioxidant-derived prooxidant formation from ubiquinol. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(6), 666-675. DOI:10.1016/S0891-5849(98)00105-1

Ogbuewu, I. P., Aladi, N. O., Etuk, I. F., Opara, M. N., Uchegbu, M. C., Okoli, I. C., & Iloeje, M. U. (2010). Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm. *Res. J. Vet. Sci*, 3, 138-164. DOI:10.3923/RJVS.2010.138.164

Peña, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M., & Martinez, H. R. (2004). Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*, 12(2), 117-124. DOI: 10.1017/S096719940400262X

Reed, M. L., Ezeh, P. C., Hamic, A., Thompson, D. J., & Caperton, C. L. (2009). Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1787-1790. DOI:10.1016/j.fertnstert.2009.05.026

Revell, S. G., & Mrode, R. A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2), 77-86. DOI:10.1016/0378-4320(94)90055-8

Saeed, A. M., El-Nagar, H. A., Wafa, W. M., & Hussein, Y. S. (2016). Effect of coenzyme Q10 as an antioxidant added to semen extender during cryopreservation of buffalo and cattle semen. *Journal of Animal and Poultry Production*, 7(11), 403-408. DOI: 10.21608/jappmu.2016.48748

Safarinejad, M. R. (2009). Efficacy of coenzyme Q10 on semen parameters, sperm function and reproductive hormones in infertile men. *The Journal of Urology*, 182(1), 237-248. DOI: 10.1016/j.juro.2009.02.121

Saleh, R. A., & HCLD, A. A. (2002). Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, 23(6), 737-752. DOI: 10.1002/j.1939-4640.2002.tb02324.x

Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M., & Sharafi, M. (2014). In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, 68(2), 276-280. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.02.008

Schäfer, S., & Holzmann, A. (2000). The use of transmigration and Spermac™ stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 59(3-4), 201-211. DOI:10.1016/S0378-4320(00)00073-7

Sharafi, M., Zhandi, M., Shahverdi, A., & Shakeri, M. (2015). Beneficial effects of nitric oxide induced mild oxidative stress on post-thawed bull semen quality. *International Journal of Fertility & Sterility*, 9(2), 230. DOI:10.22074/ijfs.2015.4244

Talevi, R., Barbato, V., Fiorentino, I., Braun, S., Longobardi, S., & Gualtieri, R. (2013). Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11, 1-10. DOI: 10.1186/1477-7827-11-81

Turunen, M., Olsson, J., & Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1660(1-2), 171-199. DOI: 10.1016/j.bbamem.2003.11.012

Thys, M., Nauwynck, H., Maes, D., Hoogewijs, M., Vercauteren, D., Rijsselaere, T., ... & Van Soom, A. (2009). Expression and putative function of fibronectin and its receptor (integrin α5β1) in male and female gametes during bovine fertilization in vitro. *Reproduction*, 138(3), 471-482. DOI: 10.1530/REP-09-0094

Walters, J. L., De Iuliis, G. N., Nixon, B., & Bromfield, E. G. (2018). Oxidative stress in the male germline: A review of novel strategies to reduce 4-hydroxynonenal production. *Antioxidants*, 7(10), 132. DOI:10.3390/antiox7100132

Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. G., & Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1240-1247. DOI:10.1016/j.bbadis.2013.10.015

Yousefian, I., Zare-Shahneh, A., & Zhandi, M. (2014). The effect of coenzyme q10 and α-tocopherol in skim milk–based extender for preservation of caspian stallion semen in cool condition. *Journal of Equine Veterinary*

Science, 34(8), 949-954. DOI:10.1016/j.jevs.2014.04.002

Yousefian, I., Emamverdi, M., Karamzadeh-Dehaghani, A., Sabzian-Melei, R., Zhandi, M., & Zare-Shahneh, A. (2018). Attenuation of cryopreservation-induced oxidative stress by antioxidant: Impact of Coenzyme Q10 on the quality of post-thawed buck spermatozoa. *Cryobiology*, 81, 88-93. DOI:10.1016/j.cryobiol.2018.02.005

Zarei, F., Daghigh-Kia, H., & Masoudi, R. (2022). Supplementation of ram's semen extender with Mito-TEMPO II: Quality evaluation and flow cytometry study of post-thawed spermatozoa. *Andrologia*, 54(1), e14299. DOI:10.1111/and.14299