نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۳۱، تابستان ۱۴۰۰
ص‌ص: ۷۹~۸۸

بررسی اثر افزودن آنتی‌اکسیدان هایپوتائورین بر کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید و بهبود فراسنجه‌های حرکتی اسپرم خروس طی انجماد و یخ گشایی

- **جمیله امامی**[1]، **حسین دقیق کیا** (نویسنده مسئول)[1]، **غلامعلی مقدم**[1] ، **بابک قاسم پناهی**[1]

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

تاریخ دریافت : تیر ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش : مرداد ۱۳۹۹

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۰۸۹۴۳۱
Email: hdk6955@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ASJ.2020.351239.2086

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر آنتی‌اکسیدان هایپوتائورین در سطوح ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار در رقیق‌کننده لیک بر پایه لسیتین طی فرایند انجماد و یخ‌گشایی بر روی فراسنجه‌های حرکتی، درصد زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، میزان مالون‌دی‌آلدهید موجود در مایع‌منی و مورفولوژی اسپرم‌ها بود. بدین منظور نمونه‌های منی از ۱۵ خروس به روش مالش پشتی-شکمی بافاصله‌ی دو بار در هفته جمع‌آوری شدند. پس از رقیق‌سازی و افزودن سطوح مختلفی از آنتی‌اکسیدان‌ها، نمونه‌ها در بالای بخار ازت منجمد شدند. پس از یخ‌گشایی، نمونه‌ها ازنظر پارامترهای عملکردی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج آزمایش نشان داد که افزودن سطح ۰/۷۵ میلی‌مولار آنتی‌اکسیدان هایپوتائورین باعث افزایش معنی دار میزان تحرک پیش‌رونده، درصد تحرک کل، فراسنجه VCL، افزایش درصد زنده‌مانی و افزایش یکپارچگی غشای پلاسمایی نمونه‌ها نسبت به گروه کنترل شد و همچنین سطح ۰/۷۵ میلی‌مولارسبب کاهش معنی‌دار میزان مالون‌دی‌الدهید موجود در مایع منی شد و بالاترین میزان ازنظر این پارامترها در این سطح به دست آمد ($P<0.05$). نتایج حاصل نشان داد که افزودن سطح بهینه از هایپوتائورین می‌تواند نقش محافظتی در برابر پراکسیداسیون لیپید داشته باشد و سبب بهبود فراسنجه‌های اسپرم خروس هنگام انجماد و یخ‌گشایی شود و آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: تنش‌اکسیداتیو، هایپوتائورین ، گونه‌های فعال اکسیژن.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 131 pp: 79-88

The effect of adding hypotaurine antioxidant on reduction of lipid peroxidation and improving motility of Rooster sperm during freezing and thawing

By: J. Emami[1], H. Daghigh Kia[1*], Gh. Moghaddam[1], B Gh.Panahi
[1]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
*Corresponding Author: daghighkia@tabrizu.ac.ir

Received: July 2020 **Accepted: August 2020**

The aim of the present study was to investigate the antioxidant effect of hypotaurine at levels of 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mM in lecithin-based Lake extender during the freezing and thawing process on motility, survival, plasma membrane integrity, the amount of MDA in the semen and sperm morphology parameters. For this purpose, semen samples were collected from 15 roosters by by abdominal massage method twice a week. After diluting and addation of different levels of antioxidants, the samples were frozen on liquid nitrogen vapor. After thawing, the samples were evaluated for sperm performance parameters. Results indicated an increase in sperm velocity parameters, total motility, progressive motility, viability, membrane integrity by adding 0.75 mM/L hypotaurine antioxidant compared with the other groups (P<0.05). Also, the level of 0.75 mM was significantly reduced (P <0.05) in the amount of MDA in the semen and the highest level was obtained in terms of these parameters at this level. The results showed that adding the optimal level of hypotaurine could play a protective role against lipid peroxidation and improve the appearance of rooster sperm during freezing and thawing and reduce the damage caused by oxidative stress.

Key words: Oxidative Stress, Hypotaurine, Reactive Oxygen Species.

مقدمه

انجماد اسپرم طیور سبب کاهش توانایی باروری اسپرم می‌شود که مکانیسم آن هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است. بااین‌حال، نقش گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)[1] در کاهش عملکرد اسپرم و توانایی باروری آن، پس از ذخیره‌سازی آن بصورت مایع و نیز انجماد، در مطالعات زیادی مورد بررسی قرارگرفته است(Zini و همکاران ۲۰۰۰). عوامل متعددی در کاهش باروری اسپرم به هنگام ذخیره برون تنی منی، نقش دارند. یکی از مواردی که همواره مورد توجه بوده است تغییرات غیرقابل برگشت غشای فسفولیپیدی اسپرم در اثر پراکسیداسیون است. فسفولیپیدها از ترکیبات اصلی غشاء بوده و عامل اصلی سیالیت آن می‌باشند؛ این خصوصیت در فرایندهای اکسیداسیون، ظرفیت‌پذیری، واکنش آکروزومی در پستانداران و تحرک اسپرم‌های انسان، خوک و خروس بسیار حائز اهمیت است(Tar vi s و همکاران ۲۰۱۳). حفاظت از لیپیدهای غشای پلاسمایی در مقابل رادیکال‌های آزاد می‌تواند ذخیره اسپرم در مدت‌زمان محدود را بهبود بخشد. لیپیدها به‌عنوان مهم‌ترین اجزای غشای پلاسمایی اسپرم تاثیر مهمی در فرایندهای مهم دخیل در باروری اسپرم مانند بلوغ، ظرفیت‌پذیری و واکنش آکروزومی دارند(Kelso و همکاران ۱۹۹۶). از دیدگاه بیوشیمیایی، فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم پرندگان از اسیدهای چرب غیراشباع نظیر اسید آراشیدونیک و دوکوزاتترااانوئیک تشکیل شده است. میزان بالای اسید چرب در غشای پلاسمایی اسپرم، آن‌ها را به پر اکسیداسیون لیپیدی حساس می‌کند که یکی از دلایل اصلی ناباروری در جنس نر بشمار می آید. غشای پلاسمایی اسپرم باید توسط یک سیستم آنتی‌اکسیدانی محافظت شود تا از آسیب اکسیداتیو طی ذخیره برون‌تنی جلوگیری شود. در این راستا Bréque و همکاران

[1] Reactive Oxygen Species

(۲۰۰۳)نشان دادند که پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم خروس و بوقلمون در ساعت‌های اولیه ذخیره برون‌تنی در دمای صفر و دمای بدن روی می‌دهد. تشکیل پراکسیدها در شرایط نگهداری برون‌تنی اسپرم باعث تغییراتی در جنبایی، توانایی لقاح اسپرم-اووسیت و نهایتا کاهش باروری همراه است (۲۹). رادیکال‌های آزاد به‌وسیله آزادسازی الکترون‌های باعث آسیب‌های برگشت‌ناپذیر به اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌های سلول می‌شوند (Wang و همکاران ۱۹۹۷). رادیکال‌های آزاد بیشتر به‌وسیله سیستم آنتی‌اکسیدانی حذف می‌شوند(S و همکاران ۲۰۱۷). آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد دارند. در صورت آسیب یا از بین رفتن این سیستم، با پراکسیداسیون لیپیدی غشاء پلاسمایی اسپرم، آسیب‌های ساختاری و عملکردی به سلول وارد می‌شود (Baumber و همکاران ۲۰۰۰).

هایپوتائورین یکی از آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی است(Shaikh و همکاران ۲۰۱۶). این آنتی اکسیدان می‌تواند از پر اکسیداسیون لیپیدی و پراکسی نیترات جلوگیری کرده و سیستم تولیدمثلی را از اثرات سوء آسیب‌های اکسیداتیو محافظت کند (Fontana و همکاران ۲۰۰۴; Fontana و همکاران ۲۰۰۵). هایپوتائورین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، ممکن است نقش مهمی در محافظت اسپرم از ROS داشته (HOLMES و همکاران ۱۹۹۲) و جایگزین فعالیت سوپراکسیددیسموتاز شود. هایپوتائورین سبب بهبود فراسنجه های اسپرم می‌شود(Fontana و همکاران ۲۰۰۴). در آزمایشی تاثیر افزودن هایپو تائورین در انجماد اسپرم ماهی خاردار اروپایی بر پارامترهای اسپرمی، میزان فعالیت آنزیم‌های جمله گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و سوپرا اکسید دیسموتاز و میزان یکپارچگیDNA بررسی شد. یافته های این بررسی نشان داد که میزان تحرک اسپرم در گروه دریافت کننده هایپوتائورین نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در تمام گروه برابر بوده این در حالی است که بین گروه‌های غیرانجمادی و گروه انجمادی تفاوت معنی‌دار دیده نشد. میزان شکست DNA در گروه تائورین و هایپوتائورین نسبت به گروه کنترل کاهش یافت(Martínez-Páramo و همکاران ۲۰۱۳). Badr و همکاران (۲۰۱۴) اثر هایپوتائورین را روی پارامترها ، فراساختار و میزان باروری اسپرم گاو بررسی نمودند. پس از فرآیند ذوب، میزان تحرک، زنده‌مانی، تغییرات فراساختاری غشاء و پتانسیل باروری آزمایشگاهی بررسی شد. آن‌ها دریافتند در گروه های دریافت کننده آنتی‌اکسیدان میزان تحرک، زنده‌مانی، سلامت آکروزوم اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشت. همچنین میزان سلامت غشاء و آکروزوم در گروه ذکرشده نسب به دیگر گروه‌ها بالاتر بود. با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی و محافظتی هایپوتائورین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر افزودن هایپوتائورین بر اسپرم خروس طی انجماد- یخ گشایی، بر کاهش میزان پر اکسیداسیون لیپید، افزایش زنده‌مانی و بهبود فراسنجه های حرکتی اسپرم است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در واحد مرغداری ایستگاه تحقیقاتی و پژوهشی خلعت پوشان دانشگاه تبریز انجام شد.

حیوانات و طراحی آزمایش: بدین منظور از ۱۵ قطعه خروس بالغ نژاد راس با سن ۲۸ هفته استفاده شد. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی به ابعاد ۷۰×۷۰×۸۵ و تحت شرایط ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی قرار داشتند. هرکدام از خروس‌ها روزانه با ۱۵۰ گرم جیره یکسان (ذرت ۶۳/۷٪، دانه سویا ۶/۲٪، سبوس گندم ۲۳/۲۸٪، دی کلسیم فسفات ۱/۳۶٪، سنگ‌آهک ۰/۸۱٪، نمک ۰/۳۲، لایزین ۰/۰۱٪، متیونین ۰/۱۱٪ و مکمل‌های ویتامینی و معدنی ۰/۵٪) تغذیه‌شده وهمه خروس‌ها دسترسی آزاد به آب داشتند. اسپرم گیری به روش مالش پشتی-شکمی و به‌صورت دو بار در هفته انجام گرفت. نمونه‌های اسپرم بلافاصله پس از جمع-آوری در دمای ۳۷°C به آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا نمونه‌ها از نظر حجم، غلظت و رنگ بررسی شد و تنها نمونه‌های با حجم ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌لیتر و تحرک بیش از ۸۰ درصد مورد استفاده قرار گرفتند. برای از بین بردن اثرات انفرادی، نمونه‌های

تأییدشده، با یکدیگر مخلوط شده و به‌صورت یک نمونه واحد درآمد. به‌منظور رقیق‌سازی اسپرم‌ها از رقیق‌کننده لیک[2] اصلاح شده (با ترکیبات فروکتوز ۰/۸gr، پتاسیم سیترات ۰/۵gr، سدیم آل گلوتامات ۱/۹۲gr، پلی‌وینیل پیرولیدون ۰/۳gr، منیزیم‌استات ۰/۰۷gr، گلیسین ۰/۳۷۴gr، با فشار اسمزی ۳۱۰ و pH ۷/۲) و لسیتین یک درصد و گلیسرول ۱۱٪ استفاده گردید. رقیق‌کننده پایه را به دو قسمت مساوی تقسیم کرده و به یکی از آن‌ها یک‌چهارم درصدگلیسرول و به دیگری سه‌چهارم درصد گلیسرول افزوده شد. تیمارهای آزمایشی مشتمل بر موارد زیر بودند:

هایپوتائورین۱: ۰/۲۵ میلی‌مولار

هایپوتائورین۲: ۰/۵ میلی‌مولار

هایپوتائورین۳: ۰/۷۵ میلی‌مولار

هایپوتائورین۴: ۱میلی‌مولار

رقیق‌کننده حاوی یک‌چهارم گلیسرول را در ۵ فالکون و به مقدار یک میلی‌لیتر ریخته و سپس چهار تیمار ذکر شده را به هر کدام از لوله ها اضافه گردید و یک لوله بدون دریافت گروه تیماری به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. سپس اسپرم به فالکون‌ها در دمای ۳۷°C اضافه گردید و بلافاصله فالکون‌ها به همراه رقیق‌کننده حاوی سه‌چهارم گلیسرول به یخچال که دمای آن روی ۴ درجه تنظیم‌شده منتقل گردید. بعد از دو ساعت سردسازی و رسیدن دمای نمونه‌ها به ۴°C، یک میلی‌لیتر رقیق‌کننده حاوی گلیسرول سه‌چهارم گلیسرول به هرکدام از فالکن‌ها افزوده شد که حجم محلول به ۲ میلی‌لیتر رسیده و رقیق‌سازی نهایی منی به نسبت ۱:۲۰ انجام شد (غلظت نهایی اسپرم در هر میلی لیتر ۲×۱۰^{۸}). پس از رقیق سازی و به مدت یک ساعت دیگر در یخچال نگهداری شدند (Safa و همکاران ۲۰۱۶). سپس نمونه‌ها را به داخل پایوت ها کشیده و به مدت ۷ دقیقه در ارتفاع ۴ سانتی‌متری از ازت مایع قرار داده و پس از انجماد نمونه‌ها، آن‌ها را به داخل ازت مایع انتقال دادیم .

تحرک اسپرم

پس از یخ گشایی مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی را روی لام از قبل گرم شده قرار داده و بعد از پوشاندن با لامل، روی صفحه گرم میکروسکوپ گذاشته و با استفاده از نرم‌افزار کاسا[3] (CASA, Video Test Sperm 3.1 Russia) و با کمک میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی×۲۰۰ اقدام به شمارش حداقل۲۰۰ اسپرم نموده و فراسنجه‌های تحرک کل[4]، تحرک پیش‌رونده[5] و ویژگی‌های جنبایی اسپرم ها مورد ارزیابی قرار گرفتند (مهدی‌پور و دقیق‌کیا، ۱۳۹۸).

زنده‌مانی (رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین)

برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. بدین منظور پس از یخ گشایی نمونه‌ها، ۱۰ میکرومولار نمونه منی رقیق‌شده از هر گروه بر روی یک لام قرارگرفته و با ۲۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین-نیگروزین مخلوط گردیدند. سپس توسط یک لام دیگر نمونه رنگ‌شده بر روی لام گسترش‌یافته و پس از خشک شدن توسط میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی×۴۰۰ و شمارش ۲۰۰حداقل اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده (رنگ نشده) و مرده (رنگ‌شده) تعیین شدند.

ارزیابی مورفولوژی اسپرم

برای ارزیابی اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی، ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه یخ‌گشایی‌شده به میکروتیوب‌های حاوی ۱۵۰ میکرو لیتر محلول هانکوک که شامل فرمالین ۳۷ درصد (۶۲/۵میلی‌لیتر)، محلول نمکی (محلول سالین) (۱۵۰) میلی‌لیتر، محلول بافر فسفات (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دو بار تقطیر (۵۰۰ میلی‌لیتر)، افزوده شده و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرارگرفته و توسط یک لامل پوشانده شد. با شمارش حداقل۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ×۴۰۰ درصد اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه گردید.

سلامت غشاء پلاسمایی اسپرم

برای ارزیابی یکپارچگی غشا از محلول‌هاست[6] (HOST) (۹ گرم فروکتوز و ۴/۹ گرم سیترات در یک لیتر آب دوبار تقطیر) استفاده شد. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی را با ۱۰۰

[2] Lake
[3] Computer Assisted Sperm Analysis
[4] Total Motility
[5] Progressive Motility
[6] Hypo Osmotic Swelling Test

میکرولیتر از محلول هاست مخلوط کرده و به مدت نیم ساعت در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه را زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰× قرار داده، و چندین نقطه از محیط را به‌وسیله سیستم M SHOT Image analysis عکس‌برداری می‌کنیم. اسپرم‌هایی با دم خمیده، پیچیده یا متورم به‌عنوان اسپرم سالم در نظر گرفته شدند (Mehdipour و همکاران ۲۰۱۸).

مالون‌دی آلدهید

به‌منظور تعیین میزان پر اکسیداسیون لیپیدهای اسپرم ، از آزمون TBARs استفاده شد. در این آزمون، میزان مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان شاخصی از میزان پر اکسیداسیون لیپیدها از طریق واکنش با اسید تیوباربیتوریک اندازه‌گیری شد. بدین منظور، ابتدا به‌منظور رسوب پروتئین‌ها، ۱ میلی‌لیتر از محلول هر گروه تیماری بعد از یخ‌گشایی در دمای ۳۷°C با ۲ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (TBA)، در یک لوله استریل مخلوط شده و سپس جهت جلوگیری از وقوع پر اکسیداسیون لیپیدی در طی زمان انجام آزمایش، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول هیدروکسی تولوئن بوتیله شده یا (BHT دو درصد در اتانول) به همراه ۱ میلی‌لیتر EDTA به محلول موردنظر افزوده شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور g× ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی را برداشته و با ۱ میلی‌لیتر از محلول اسید تیوباربیتوریک ۰/۶۷ درصد در یک فالکن مخلوط کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در آب ۹۵°C قرار گرفتند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) اندازه‌گیری شدند.

آنالیز آماری

این طرح دارای ۴ تیمار در ۵ تکرار بود. داده‌های بدست‌آمده برای فراسنجه‌های درصد تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، پاسخ به محلول HOST، هانکوک و سطح مالون‌دی‌آلدهید با رویه GLM نرم‌افزار (۹.۳) SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آنالیز قرار گرفتند. سطح معنی‌داری ۵ درصد در نظر گرفته شد، برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی استفاده شد.

نتایج

افزایش آسیب سلولی ناشی از تنش اکسیداتیو مربوط به اکسیدان-های مشتق از اکسیژن (ROS) است. زمانی که ROS تولیدی از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی فراتر رود، این امر منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود. گزارش شده است که همه اجزای سلولی شامل لیپیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای *اسید نوکلئیک* و قندها از اهداف احتمالی تنش اکسیداتیو هستند(Seifi-Jamadi و همکاران ۲۰۱۹). مشخص‌شده است که فرایند انجماد- ذوب با افزایش پر اکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم، سبب تغییر یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم می‌شود(Aksoy و همکاران ۲۰۱۲). شاخص‌های میکروسکوپی اسپرم یخ گشایی شده مانند میزان تحرک، درصد زنده مانی و یکپارچگی اسپرم درنتیجه افزایش پر اکسیداسیون لیپیدیو(Chatterjee and Gagnon ، ۲۰۰۱) و نیز پس از فرایند انجماد- ذوب کاهش می‌یابد. این امر در نتیجه تنش‌های اکسیداتیو ایجاد می‌شود که با تغییر در سیالیت غشا، سبب اختلال در تحرک اسپرم می‌شود. از سوی دیگر تغییر در سیالیت غشا به پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشای پلاسمایی اسپرم نسبت داده‌شده است(Mocé and Vicente و همکاران ۲۰۰۹). بر اساس نتایج گزارش شده در جدول یک افزودن ۰/۷۵ میلی‌مولار آنتی‌اکسیدان هایپوتائورین سبب افزایش معنی دار تحرک کل، تحرک پیش رونده و فراسنجه VCL نسبت به گروه شاهد شد ($P<0.05$)؛

جدول ۱. مقایسه میانگین ویژگی‌های حرکتی اسپرم منجمد شده خروس در بین سطوح مختلف تیماری

Table 1. Comparison of the mean motor characteristics of frozen rooster sperm between different treatment levels

متغیر	TM (%)	PM (%)	STR (%)	BCF (Hz)	ALH (%)	LIN (µm)	VAP (µm.sec)	VCL (µm.sec)	VSL (µm.sec)
شاهد	۶۹/۶۰^{b}	۵۲/۲۰^{b}	۶۶/۰۵	۱۴/۶۳	۲/۵۶	۳۱/۱۸	۵۹/۸۲	۸۸/۹۸^{b}	۴۶/۰۸
۰/۲۵میلی‌مولار	۷۰/۲۰^{ab}	۵۲/۴۰^{b}	۶۷/۰۲	۱۴/۷۳	۲/۷۴	۳۲/۲۶	۶۲/۱۶	۸۹/۹۷^{ab}	۴۸/۶۴
۰/۵میلی‌مولار	۷۰/۲۰^{ab}	۵۳/۲۰^{ab}	۶۷/۸۰	۱۳/۵۷	۳/۰۱	۳۵/۵۳	۶۲/۵۷	۹۰/۱۰^{ab}	۴۷/۹۷
۰/۷۵میلی‌مولار	۷۲/۴۰^{a}	۵۵/۴۰^{a}	۶۸/۳۴	۱۵/۰۴	۳/۱۲	۳۲/۵۸	۶۵/۳۳	۹۴/۶۹^{a}	۵۰/۸۰
۱میلی‌مولار	۶۹/۶۰^{b}	۵۲/۲۰^{b}	۶۲/۳۹	۱۳/۹۷	۲/۷۰	۳۰/۲۹	۶۱/۵۱	۸۸/۰۶^{b}	۵۰/۴۸
SEM	۰/۵۹	۰/۵۷	۱/۸۱	۰/۷۴	۰/۲۴	۱/۲۷	۲/۸۴	۱/۱۳	۲/۲۱
P-value	۰/۰۱۹	۰/۰۰۳	۰/۱۹	۰/۶۳	۰/۴۵	۰/۶۰	۰/۷۴	۰/۰۰۶	۰/۵۶

میانگین‌ها با حروف ناهمسان (a, b, c) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P< ۰/۰۵).

TM: جنبایی کل، PM: جنبایی پیش‌رونده، STR: حرکت مستقیم، BCF: فرکانس حرکت جانبی، ALH: حرکت جانبی سر، LIN: حرکت خطی، VAP: سرعت متوسط مسیر، VCL: سرعت منحنی، VSL: سرعت در خط مستقیم.

با نگاهی بر نتایج به‌دست‌آمده از گروه‌های انجمادی هایپوتائورین می‌توان دریافت این آنتی‌اکسیدان به‌خوبی توانسته است آسیب‌های انجمادی را کاهش دهد. نتایج جدول ۲ حاکی از آن است که افزودن سطوح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار باعث افزایش میزان زنده‌مانی و سلامت غشاء نسبت به گروه شاهد شده و این افزایش در سطح۰/۷۵ میلی‌مولار معنی‌دار بود (P<0.05).

همچنین افزودن ۰/۷۵ میلی‌مولار آنتی‌اکسیدان هایپوتائورین سبب کاهش معنی‌دارمیزان مالون‌دی‌آلدهید موجود در مایع منی شد(P<0.05). افزودن سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان هایپوتائورین در مایع منی طی انجماد و یخ گشایی تاثیر معنی‌داری در کاهش اسپرم‌هایی با ریخت‌شناسی ناسالم نداشت.

جدول ۲. تأثیر آنتی‌اکسیدان هایپوتائورین بر صفات زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء پلاسمایی، میزان مورفولوژی غیرطبیعی و سطح مالون دی‌آلدهید اسپرم خروس

Table 2. Effect of antioxidants on hypothalamus on vital traits, integrity of plasma membrane, abnormal morphological level and level of malondialdehyde sperm rooster

متغیر	زنده‌مانی(%)	سلامت غشا(%)	درصد اسپرم غیرطبیعی(%)	مالون‌دی‌آلدهاید(nmol/dl)
شاهد	۷۲/۸۹^{b}	۷۷/۳۳^{b}	۱۷/۳۲	۳/۱۰^{a}
هایپو۱(۰/۲۵میلی‌مولار)	۷۴/۹۸^{ab}	۷۸/۴۵^{b}	۱۶/۷۵	۲/۶۵^{ab}
هایپو۲(۰/۵میلی‌مولار)	۷۵/۲۱^{ab}	۷۸/۸۶^{ab}	۱۶/۹۲	۲/۶۵^{b}
هایپو۳(۰/۷۵میلی‌مولار)	۷۶/۵۸^{a}	۸۲/۲۶^{a}	۱۶/۶۹	۲/۵۷^{b}
هایپو۴(۱میلی‌مولار)	۷۲/۸۴^{b}	۷۶/۶۷^{b}	۱۷/۴۸	۳/۱۵^{a}
SEM	۰/۶۸	۰/۸۹	۰/۵۷	۰/۱۰۳
P-value	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۲۶	۰/۸۲	۰/۰۰۲

میانگین‌ها با حروف ناهمسان (a, b, c) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P< ۰/۰۵)

بحث

اطلاعات به‌دست‌آمده نشان‌دهنده تأثیر مثبت آنتی‌اکسیدان هایپوتائورین در سطح ۰/۷۵ میلی مولار بر حفظ مورفولوژی، زنده‌مانی و سلامت غشا است. هایپوتائورین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در غلظت‌های بالا در اسپرم پستانداران و لوله‌های تولیدمثلی وجود دارد. این آنتی‌اکسیدان، پیش ساز تائورین بوده و محصول نهایی متابولیسم سیستئین در پستانداران به شمار می‌رود(Brugnon و همکاران ۲۰۱۳). مطالعاتی که از سال ۱۹۸۰در خصوص تأثیر حفاظتی این ترکیب روی ظرفیت پذیری، واکنش آکروزومی و همین‌طور نقش مثبت آن در حفظ اسپرم در طی انجماد انجام شده است، این فرضیه را که هایپوتائورین توان لقاح را در اسپرم منجمد شده را بهبود می‌بخشد، را تقویت می‌نمایند(Brugnon و همکاران ۲۰۱۳). علاوه بر این، ازآنجا که تائورین و هایپوتائورین، توانایی تنظیم اسمولالیته سلولی و فشار اسمزی را دارا هستند، در کنار پایدارسازی غشا سلولی، می‌توانند از اسپرم در مقابل تنش های اسمزی و اکسیداتیو انجمادی به‌خوبی محافظت نمایند(Lambert و همکاران ۲۰۱۴). در مطالعه حاضر افزودنای آنتی‌اکسیدان باعث گردید تا آسیب غشاء به حداقل میزان خود نسبت به گروه کنترل برسد. افزودن هایپوتائورین باعث کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدهید شد و از آنجا که این ماده سبب افزایش درصد یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم طی انجماد و یخ گشایی شده است پس می‌توان انتظار بهبود جنبایی و دیگر فراسنجه‌های حرکتی را نیز داشت. نتایج تحقیق حاضر همسو با مطالعات Mrsny و همکاران (۱۹۷۹) بود که اعلام کردند غلظت ۰/۱ میکرومولار باعث بهبود فراسنجه‌های جنبایی هامستر می‌شود. از آنجا که هایپوتائورین قادر به عبور از غشا لیپیدی اسپرم نیست، بنابراین می‌تواند به عنوان یک عامل پوشش دهنده سطح خارجی اسپرم عمل نماید و از غشا پلاسمایی در مقابل آسیب های انجمادی محافظت کنند. این محصول آنتی اکسیدانی قادر است با کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی در غشای پلاسمایی، سبب پایداری غشا اسپرم شود(Pasantes-Morales and Cruz و همکاران ۱۹۸۵).

Badr و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که استفاده از ۲۵ میلی‌مول هایپوتائورین سبب کاهش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپید و همچنین سبب افزایش نرخ زنده‌مانی و تحرک اسپرم گاومیش طی انجماد نسبت به گروه شاهد شد.

. Singh و همکاران (۲۰۱۲) نیز با تشریح نحوه عملکرد تائورین در جریان واکنش آکروزومی اعلام کردند این آنتی‌اکسیدان با تعدیل سیگنال‌های درون‌سلولی مانند جریان کلسیم و cAMP از وقوع زود هنگام این پدیده و تغییرات شبه ظرفیت پذیری جلوگیری می‌کند. Aruoma و همکاران (۱۹۸۸)گزارش کردند که عملکرد آنتی‌اکسیدانی مؤثر برای هایپوتائورین، غلظت ۱۰ میکرومولار است. همچنین حداقل غلظت مؤثر هایپوتائورین برای جنبایی اسپرم هامستر، ۰/۱ میکرومولار است (Gutteridge and Halliwell و همکاران ۲۰۰۰). هایپوتائورین یک آنتی‌اکسیدان پیشگیری‌کننده است که رادیکال‌های هیدروکسیل را که آسیب‌های پر اکسیداتیو را راه‌اندازی می‌کنند، از بین می‌برد(Donnelly و همکاران ۲۰۰۰). بنابراین، هایپوتائورین از پر اکسیداسیون لیپیدی اسپرم جلوگیری می‌کند(Alvarez and Storey و همکاران ۱۹۸۳). این نظریه وجود دارد که هایپوتائورین قادر است با آلدئیدهای که در طی پر اکسیداسیون لیپیدی تولید می‌شود، به‌طور مستقیم واکنش داده و بنابراین از گروه‌های تیولی غشای پلاسمایی اسپرم محافظت کند. هایپوتائورین به‌عنوان یک خنثی‌کننده سوپر اکسید درون‌سلولی عمل می‌کند که نه‌تنها پر اکسیداسیون لیپیدی را مهار می‌کند، بلکه جایگزین سوپراکسیددیسموتاز (SOD) برای از بین بردن H_2O_2 می‌شود(Sinet and Garber و همکاران ۱۹۸۱). این آنتی اکسیدان یکی از اولین دفاع‌های آنزیمی در برابر پر اکسیداسیون لیپیدی در اسپرم است. Alvarez and Storey و همکاران (۱۹۸۳)گزارش دادند که غیرفعال شدن SOD ارتباط نزدیکی با کاهش جنبایی و پر اکسیداسیون لیپیدی در این سلول‌ها دارد و SODبیرونی و کاتالاز – به‌تنهایی یا باهم- نمی‌توانند اسپرم را در برابر آسیب‌ها محافظت کنند. چون هیچ‌کدام از این دو پروتئین

نمی‌توانند از غشای پلاسمایی اسپرم عبور کنند. این نتایج همچنان با این فرضیه که اصلی‌ترین القاءکننده پر اکسیداسیون، سوپراکسیداز است، مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که افزودن ۰/۷۵ میلی‌مولار آنتی‌اکسیدان هایپوتائورین سبب بهبود فراسنجه‌های کمی و کیفی اسپرم خروس طی انجماد و یخ گشایی می‌شود.آنتی‌اکسیدان‌ها بسته به نوع آنتی‌اکسیدان، دوز مصرفی و گونه تحت تیمار نتایج متفاوتی دارند و با شناخت مکانیسم آنتی‌اکسیدان و دستیابی به دوز بهینه می‌توان بهترین نتیجه را کسب کرد.

منابع

Aksoy, N., Dogan, Y., Iriadam, M., Bitiren, M., Uzer, E., Ozgonul, A., Aksoy, S. (2012). Protective and therapeutic effects of licorice in rats with acute tubular necrosis. *Journal of Renal Nutrition.* 22 (3): 336-343.

Alvarez, J.G., Storey, B.T .(۱۹۸۳) .Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of Reproduction.* 29 (3): 548-555.

Aruoma, O., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J. (1988). The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochemical Journal.* 256 (1): 251-255.

Badr, M., Azab, A., Rawash, Z. (2014). Effect of trehalose, cysteine and hypotaurine on buffalo bull sperm freezability, ultrastructure changes and fertilizing potentials. *Assiut Vet Med J.* 60 (142): 38-45.

Baumber, J., Ball, B.A., GRAVANCE, C.G., Medina, V., DAVIES-MOREL, M.C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of andrology.* 21 (6): 895-902.

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.

Brugnon, F., Ouchchane, L., Pons-Rejraji, H., Artonne, C., Farigoule, M., Janny, L. (2013). Density gradient centrifugation prior to cryopreservation and hypotaurine supplementation improve post-thaw quality of sperm from infertile men with oligoasthenoteratozoospermia. *Human reproduction.* 28 (8): 2045-2057.

Chatterjee, S., Gagnon, C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research.* 59 (4): 451-458.

Donnelly, E.T., McClure, N., Lewis, S.E. (2000). Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*.۶۸-۶۱ :(۱) ۱۵ .

Fontana, M., Pecci, L., Duprè, S., Cavallini, D. (2004). Antioxidant properties of sulfinates: protective effect of hypotaurine on peroxynitrite-dependent damage. *Neurochemical research.* 29 (1): 111-116.

Fontana, M., Amendola, D., Orsini ,E., Boffi, A., Pecci, L. (2005). Oxidation of hypotaurine and cysteine sulphinic acid by peroxynitrite. *Biochemical Journal.* 389 (1): 233-240.

Gutteridge, J.M., Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 899 (1): 136-147.

HOLMES, R.P., GOODMAN, H.O., SHIHABI, Z.K., JAROW, J.P. (1992). The taurine and hypotaurine content of human semen. *Journal of Andrology.* 13 (3): 289-292.

Kelso, K., Cerolini, S ,.Noble, R., Sparks, N.C., Speake, B. (1996). Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. *Reproduction.* 106 (2): 201-206.

thaw variables and oxidative status of rooster semen. *Animal reproduction science*.

Seifi-Jamadi, A., Zhandi, M., Ansari, M. (2019). The effect of Chrysin inclusion to Beltsville extender on cooling storage of rooster sperm. *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology).* 32.٤٨-٣٦ :(١)

Shaikh, K., SUTHAR, H.N.B., SUTARIA, P., SHARMA, V. (2016). 13. COMPARISON OF FRESH SEMEN PARAMETERS WITH FROZEN THAWED SEMEN FOLLOWING INCORPORATION OF TREHALOSE by KQ SHAIKH, HC NAKHASHI1, BN SUTHAR2, PT SUTARIA3 AND VK SHARMA4. *Life Sciences Leaflets.* 76 107 to 115-107 to 115.

Sinet, P.-M., Garber, P. (1981). Inactivation of the human CuZn superoxide dismutase during exposure to O2− and H2O2. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 212 (2): 411-416.

Singh, V., Atreja, S., Kumar, R., Chhillar, S., Singh, A. (2012). Assessment of intracellular Ca2+, cAMP and 1, 2-Diacylglycerol in cryopreserved buffalo (Bubalus bubalis) spermatozoa on supplementation of taurine and trehalose in the extender. *Reproduction in domestic animals.* 47 (4): 584-59.٠

Tarvis, K.M., 2013. New methods for cryopreserving rooster spermatozoa, Colorado State University. Libraries.

Wang, Y., Sharma, R., Agarwal, A. (1997). Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. *Urology.* 5.٤١٣-٤٠٩ :(٣) ٠

Zini, A., Garrels, K., Phang, D. (2000). Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology.* 55 (6): 922-926.

Lambert, I.H., Jensen, J.V., Pedersen, P.A. (2014). mTOR ensures increased release and reduced uptake of the organic osmolyte taurine under hypoosmotic conditions in mouse fibroblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 306 (11): C1028-C1040.

Martínez-Páramo, S., Diogo, P., Dinis, M., Soares, F., Sarasquete, C., Cabrita, E .(٢٠١٣) . Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (Dicentrarchus labrax) sperm cryopreservation. *Cryobiology.* 66 (3): 333-338.

Mehdipour, M., Daghigh Kia, H., Moghaddam, G., Hamishehkar, H. (2018). Effect of egg yolk plasma and soybean lecithin on rooster frozen-thawed sperm quality and fertility. *Theriogenology.* 116 89-94.

Mocé, E., Vicente, J.S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: a review. *Animal reproduction science.* 110 (1-2): 1-24.

Mrsny, R.J., Waxman, L ,.Meizel, S. (1979). Taurine maintains and stimulates motility of hamster sperm during capacitation in vitro. *Journal of Experimental Zoology.* 210 (1): 123-128.

Pasantes-Morales, H., Cruz, C. (1985). Taurine and hypotaurine inhibit light-induced lipid peroxidation and protect rod outer segment structure. *Brain research.* 330 (1): 154-157.

S, S., M, G., J, R., D, H., J, H., N, Z. (2017). Evaluation the effects of different levels of vitamin E and Nano Selenium on sperm quality parameters of Leghorn rooster during chilled storage on 4◦C. *Journal of Animal Science Researches.* 26 (4): 59-70.

Safa, S., Moghaddam, G., Jozani, R.J., Daghigh Kia, H., Janmohammadi, H. (2016). Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-