

تأثیر افزودن میتوتمپو به رقیق کننده حاوی لستین سویا بر قابلیت سردسازی و انجماد اسپرم بز

فاطمه زارعی (نویسنده مسئول)^۱، نادر اسدزاده^۲، حسین دقیق کیا^۱، علی غلامی کرکان^۲، محمد عزیزی^۲، محمد حیدری^۱ و شهروز خرمی^۲

^۱- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۲- موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۳

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۸۵۹۶۶۱۶۶

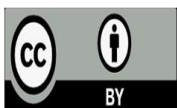
Email: F.zarei@tabrizu.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ASJ.2024.367520.2430

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر افزودن غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی میتوتمپو (Mito-TEMPO) به رقیق کننده حاوی لستین سویا بر قابلیت سردسازی و انجماد منی بز بود. به این منظور از پنج رأس بز بالغ نژاد سانن استفاده شد. پس از اسپرم‌گیری به وسیله واژن مصنوعی و ارزیابی اولیه به منظور حذف اثرات فردی، نمونه‌های منی مخلوط شدند. در آزمایش اول، نمونه منی به رقیق کننده حاوی سطوح مختلف میتوتمپو (۰، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) افزوده و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ساعت ذخیره شد. سپس فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل جنبایی، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشا پلاسمایی اسپرم در زمان‌های ۰، ۳۰ و ۶۰ ساعت ارزیابی شد. در آزمایش دوم، نمونه منی به رقیق کننده حاوی سطوح مختلف میتوتمپو (۰، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) افزوده و منجمد شد. ارزیابی میکروسکوپی اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی انجام شده و فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل فراسنجه‌های حرکتی، مورفولوژی غیر طبیعی، سلامت غشا پلاسمایی و سلامت آکروزوم مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج فرایند سردسازی اسپرم نشان داد در زمان صفر تفاوتی بین تیمارها وجود نداشته است. در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ ساعت سردسازی و همچنین پس از انجماد استفاده از غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار میتوتمپو سبب حفظ بهتر جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، سلامت غشا و زنده‌مانی اسپرم بز شد. در نتیجه استفاده از آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی میتوتمپو می‌تواند راهکاری مؤثر برای حفظ کیفیت اسپرم بز برای ذخیره سازی کوتاه مدت و بلند مدت آن باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی، میتوتمپو، اسپرم، بز.



Research Journal of Livestock Science No 148 pp: 175-184

The effect of adding Mito-TEMPO to soybean lecithin-based extender on cooling and freezing ability of buck semenBy: Fatemeh Zarei ^{*1}, Nader Asadzadeh², Hossein Daghigh Kia¹, Ali Gholami Karkan², Mohammad Azizi², Mohammad Heidari¹ and Shahrouz Khorrami²

1-Department of Animal Science, College of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

2-Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

* Corresponding Author's Email: f.zarei@tabrizu.ac.ir

Received: October 2024

Accepted: November 2024

The current study was aimed to investigate the effect of adding different concentrations of mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO to soybean lecithin-based extender on the cooling and freezing ability of buck semen. For this purpose, five adult Saanen bucks were used. After semen collection by using an artificial vagina and primary evaluation, semen samples were pooled in order to eliminate individual differences. In experiment 1, semen samples were added to extenders containing 0, 1, 10, 100 and 1000 μ M Mito-TEMPO. The prepared samples were stored at 4 °C up to 60 h. Chilled sperm motility, progressive motility, viability and membrane functionality were analyzed during 0, 30 and 60 h. In experiment 2, semen was added to the extenders containing 0, 1, 10, 100 and 1000 μ M Mito-TEMPO and were frozen. Microscopic evaluation of spermatozoa was done after freeze-thawing and quality parameters including motion parameters, abnormal morphology, membrane integrity and acrosome integrity were assessed. The results of the cooling process showed that at time 0, no difference was observed among groups but at 30 and 60 h storage and after the freezing process, higher ($P \leq 0.05$) sperm total motility, progressive motility, membrane functionality and viability were observed in 10 and 100 μ M Mito-TEMPO groups than the others. In conclusion, supplementation of buck cooling and freezing medium with Mito-TEMPO as a novel mitochondria-targeted antioxidant could be an impressive method to conserve of buck's semen quality during the storage process.

Key words: Mitochondria-targeted antioxidant, Mito-TEMPO, Sperm, Buck

مقدمه

ایمنی در گله، کاهش هزینه‌های نگهداری حیوانات نر، آسان‌تر شدن ورود ژنوم جدید، افزایش امکان دورگ‌گیری برای تغییر نوع تولید حیوانات، افزایش سرعت پیشرفت ژنتیکی در گله و افزایش تولید حیواناتی با توان تولیدی بالاتر اشاره کرد (Zarei و همکاران، ۲۰۲۱). اما تلقیح مصنوعی با اسپرم تازه، محدودیت‌هایی از قبیل کمبود بز با ویژگی‌های خاص در گله، اسپرم‌گیری و تلقیح به طور هم‌زمان در گله، عدم امکان استفاده مفید از بزهای برتر در سطح وسیع‌تر و محدودیت در حمل و نقل اسپرم دارد. بنابراین، برای غلبه بر این مشکلات استفاده از اسپرم منجمد توصیه می‌شود (Heidari و همکاران، ۲۰۲۲). طی فرآیند

پرورش بز در ایران دارای قدمت تاریخی بسیار طولانی می‌باشد، اما محدودیت مراتع و شرایط آب و هوایی در ایران از یک سو و بازده پایین تولید مثلی و عدم استفاده بهینه از تلقیح مصنوعی در صنعت پرورش بز از سوی دیگر، موجب عدم صرفه اقتصادی پرورش بز شده است (Heidari و همکاران، ۲۰۲۲). بهبود بازده تولیدمثل از طریق بکارگیری فناوری‌های تولیدمثل یکی از مؤثرترین راه کارهای افزایش بهره‌وری در پرورش دام است. یکی از مهم‌ترین فناوری‌ها برای افزایش کارایی تولیدمثل، تلقیح مصنوعی می‌باشد (Wishart و Donoghue، ۲۰۰۰). از جمله مزایای تلقیح مصنوعی می‌توان به افزایش بهداشت گله، بهبود

(SOD) می‌باشد (Zarei و همکاران، ۲۰۲۱). میتوتمپو شامل یک واحد نیتروکسید پیریدینی تمپو است که با قطعه کاتیون لیوفیلی تری‌فنیل فوسفونیوم^۳ (TPP) ترکیب شده و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی کاربرد دارد. واحد تمپو به عنوان یک نیتروکسید، به میتوتمپو امکان کاتالیز واکنش خنثی کردن سوپراکسید را می‌دهد (Dikalova و همکاران، ۲۰۱۰). تری‌فنیل فوسفونیوم کاتیونی است که با اتصال به آنتی‌اکسیدان‌ها، یک کمپلکس با بار مثبت ایجاد می‌کند. در داخل میتوکندری پتانسیل غشا منفی در اثر انتقال جریان الکترون و پروتون از ماتریکس به فضای بین دو غشا ایجاد می‌شود و این بار منفی ایجاد شده در درون ماتریکس سبب جذب کمپلکس مثبت تری‌فنیل فوسفونیوم و آنتی‌اکسیدان همراه آن می‌شود. بنابراین این کمپلکس می‌تواند به طور خود به خود وارد ماتریکس میتوکندری گردد. در نتیجه آنتی‌اکسیدانی که به تری‌فنیل فوسفونیوم متصل شده باشد می‌تواند تا چند صد برابر در میتوکندری که محل اصلی تولید رادیکال آزاد است تجمع یابد (Murphy و Smith، ۲۰۰۰). نیتروکسیدهایی مانند تمپو رادیکال‌های آزاد پایداری هستند که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و از سلول‌ها در برابر عوامل ایجاد تنش اکسیداتیو از جمله سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و تشعشعات یونیزه محافظت می‌کنند. انواع مکانیسم‌های شیمیایی برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیتروکسیدها پیشنهاد شده، از جمله تقلید از فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (Samuni و Barenholz، ۲۰۰۳). سوپراکسید دیسموتازها گروهی از متالوآنزیم‌ها هستند که خط مقدم دفاع در برابر صدمات ناشی از رادیکال آزاد را تشکیل می‌دهند (Yang و همکاران، ۲۰۱۸). سوپراکسید منگنز دیسموتاز (SOD2)، یک آنزیم آنتی‌اکسیدان کلیدی است که رادیکال آزاد میتوکندریایی را جاروب می‌کند و می‌تواند تولید آن را کاهش داده و از این طریق سلول‌ها را در برابر تنش اکسیداتیو محافظت می‌کند (Sarsour و همکاران، ۲۰۱۴). این آنزیم‌ها باعث خنثی شدن رادیکال آزاد آنیون سوپر اکسید و تبدیل آن به اکسیژن مولکولی و پراکسید هیدروژن می‌شوند. رادیکال سوپراکسید در غلظت بالا موجب آسیب به

انجماد، تنش‌های اسمزی، شیمیایی و مکانیکی مهم‌ترین دلایلی هستند که تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی را در اسپرم به وجود می‌آورد که نتیجه آن، کاهش باروری اسپرم است (Bréque و همکاران، ۲۰۰۳). غشا پلاسمایی اسپرم دارای اسیدهای چرب غیر اشباع با پیوند دوگانه^۱ (PUFA) فراوان است. وجود اسیدهای چرب غیر اشباع موجب تقویت این غشا و انعطاف‌پذیری بیشتر در مقابل تنش‌های ناشی از انجماد می‌شود، اما این اسیدهای چرب خود مستعد واکنش با رادیکال‌های آزاد می‌باشند که در نهایت آسیب‌های پراکسیداتیو را به دنبال دارند (Zarei و همکاران، ۲۰۲۱). آسیب‌های پراکسیداتیو انجمادی موجب کاهش یکپارچگی غشا، آسیب به عملکرد سلول، کاهش جنبایی و کاهش توانایی باروری اسپرم برای تلقیح مصنوعی می‌شوند (Asadzadeh و همکاران، ۲۰۲۱). بنابراین تنها راه استفاده بهینه از دام‌های با صفات برتر بهبود بازده انجماد اسپرم می‌باشد. در سال‌های اخیر، محققین تلاش‌های بسیاری برای حذف رادیکال‌های آزاد از محیط‌های انجماد داشته‌اند. بر این اساس، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در رقیق‌کننده انجماد اسپرم می‌تواند سبب بهبود بازده تولید مثلی اسپرم منجمد پس از یخ‌گشایی شود. از آنجا که به طور طبیعی در سلول‌ها یک تا دو درصد از الکترون‌های منتقل شده توسط زنجیره انتقال الکترون میتوکندری از این مسیر نشت کرده و تولید رادیکال‌های آزاد می‌کنند (Yang و همکاران، ۲۰۱۸)، بنابراین میتوکندری محل اصلی تولید رادیکال آزاد اکسیژن در سلول است و امروزه به عنوان هدفی مؤثر برای تحویل آنتی‌اکسیدان‌ها مورد توجه محققین قرار گرفته است (Asadzadeh و همکاران، ۲۰۲۱).

آنتی‌اکسیدان‌های هدفمند میتوکندریایی گروه جدیدی از آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که برای تجمع در میتوکندری طراحی شده‌اند و پتانسیل بالایی در مقابله با تنش اکسیداتیو میتوکندریایی دارند (Asadzadeh و همکاران، ۲۰۲۱). میتوتمپو یکی از انواع آنتی‌اکسیدان‌های هدفمند میتوکندریایی است که دارای خصوصیات قدرتمند تجمع انتخابی در ماتریکس میتوکندری و قابلیت تقلید از عملکرد آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز^۲

³ - Triphenylphosphonium (TPP)

¹ - Polyunsaturated fatty acid (PUFA)

² - Superoxide dismutase (SOD)

قرار گرفت. بر این اساس فقط از نمونه‌هایی برای آزمایش استفاده شد که به رنگ کرمی تا کرمی غلیظ، حجم یک تا دو میلی‌لیتر و دارای اسپرم‌های با جنبایی بیش از ۷۰ درصد و زنده‌مانی بیش از ۸۰ درصد بودند.

فرایندهای سردسازی و انجماد اسپرم

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش محصولات دو شرکت مرک (Darmstadt Germany) و سیگما (St. Louis Missouri United States) بود. رقیق‌کننده بر پایه‌ی تریس به عنوان رقیق‌کننده پایه منی استفاده شد. به ازای هر میلی‌لیتر رقیق‌کننده، ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین و یک میلی‌گرم استرپتومایسین به رقیق‌کننده اضافه شد. در مرحله بعد، غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان میتومتپو (۰، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) به رقیق‌کننده پایه اضافه شد. رقیق‌سازی منی به نسبت یک حجم منی و ۱۰ حجم رقیق‌کننده پایه در دمای اتاق انجام شد. به‌طوری که غلظت نهایی اسپرم ۴۰۰ میلیون در هر میلی‌لیتر بود. تعداد اسپرم در انزال با استفاده از لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری شمارش شد. سپس نمونه‌های رقیق شده به دو قسمت تقسیم شدند. یک بخش برای سردسازی و بخش دیگر برای انجماد مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله سردسازی، نمونه‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در زمان‌های صفر، ۳۰ و ۶۰ ساعت پس از سردسازی مورد ارزیابی کیفی قرار گرفتند. نمونه‌های مورد نظر برای فرایند انجماد پس از اتمام دوره سردسازی (دو ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد) به درون پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شدند و به مدت هشت دقیقه در ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری نیتروژن مایع قرار گرفتند. پس از آن نمونه‌ها در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. سپس پایوت‌های منجمد شده به تانک ازت ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. به‌منظور یخ‌گشایی اسپرم، پایوت حاوی منی از نیتروژن مایع خارج شده و به مدت یک دقیقه در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس فراسنجه‌های کیفی آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

سلول و بروز تنش اکسیداتیو می‌شود، بنابراین سوپراکسید دیسموتاز با کاهش سطح سلولی آنیون سوپراکسید مانع از این آسیب می‌شود (Baba و Yasui، ۲۰۰۶). مکانیسم احتمالی میتومتپو در کاهش صدمات ناشی از فرایند انجماد اسپرم، مربوط به اثر آن در جلوگیری از تولید بیش از حد و سرریز رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از سردسازی و انجماد از طریق ساختار شبه هیدروکسیلامینی خود است. میتومتپو به عنوان سوپراکسید دیسموتاز برای حفظ پایداری زنجیره انتقال الکترون و غشا دو لایه فسفولیپیدی عمل می‌کند (Yang و همکاران، ۲۰۱۸). از آنجا که نیتروکسیدها به عنوان مقلد سوپراکسید دیسموتاز شناخته می‌شوند، میتومتپو به عنوان یک سوپراکسید میتوکندریایی و جاروبگر رادیکال آزاد به طور مستقیم در خنثی‌سازی رادیکال‌های اکسیژن میتوکندریایی عمل می‌کند (Dikalova و همکاران، ۲۰۱۰). بنابراین، هدف از طراحی این پژوهش بررسی اثرات حفاظتی میتومتپو در محیط سردسازی و انجماد اسپرم حاوی لسیتین سویا در بز نژاد سانن می‌باشد. به این منظور، سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان میتومتپو به رقیق‌کننده پایه اسپرم افزوده شد و فراسنجه‌های کمی اسپرم پس از سردسازی و انجماد-یخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشی و نمونه‌گیری

تعداد پنج رأس بز نژاد سانن سه تا چهار ساله با میانگین وزنی $5 \pm$ ۸۰ کیلوگرم برای این مطالعه انتخاب شدند. 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 انجام شد. نمونه‌های منی دو بار در هفته با استفاده از واژن مصنوعی جمع‌آوری شد. نمونه‌های منی گرفته شده در هر نوبت با هدف از بین بردن اثرات فردی با یکدیگر آمیخته شدند. پیش از مخلوط شدن نمونه‌های اسپرم، کمیت و کیفیت (شامل رنگ، بو، حجم، غلظت منی و جنبایی اسپرم) آن مورد ارزیابی

نظر گرفته شدند (Zarei و همکاران، ۲۰۲۲).

ارزیابی مورفولوژی اسپرم

برای بررسی مورفولوژی اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد. برای ارزیابی اسپرم‌های غیر طبیعی، حداقل سه 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 فازکنتراست و با بزرگنمایی ۴۰۰ تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و به صورت درصد کل اسپرم‌های غیر طبیعی (آکروزوم غیر طبیعی، سر جدا شده، نقص-های دم و قطعه میانی اسپرم) به کل اسپرم شمارش و گزارش شد (Zarei و همکاران، ۲۰۲۱).

سلامت آکروزوم

برای اندازه‌گیری یکپارچگی آکروزوم از رنگ فلورسنت PSA^۶ استفاده شد. برای انجام این رنگ‌آمیزی، مقدار ۲۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپرم به لوله ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه و با دور ۱۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از برداشتن پلت رویی و تنظیم غلظت پلت اسپرم به میزان یک میلیون اسپرم در میلی‌لیتر، ۱۰ میکرولیتر از نمونه سوسپانسیون اسپرم در ۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد حل شد و محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا تثبیت شود. سپس ۱۰ میکرولیتر محلول اسپرم و اتانول روی لام قرار گرفت، به طوری که بتوان یک گسترش از آن تهیه کرد. پس از خشک شدن اتانول، ۲۰ میکرولیتر PSA (۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر) روی لام قرار گرفت و لام به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده شد. سپس لام ۱۵ بار در آب مقطر غوطه‌ور شده و پس از خشک شدن آن، با گلیسرول پوشش داده شد و توسط میکروسکوپ فلورسنت (Olympus ; 51BX) با بزرگنمایی ۴۰۰ تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید مورد ارزیابی قرار گرفت. اسپرم‌های با سر سبز به عنوان اسپرم دارای آکروزوم سالم و اسپرم‌های با کمر بند سبز به عنوان اسپرم با آکروزوم تخریب شده در نظر گرفته شد (Zarei و همکاران، ۲۰۲۲).

ارزیابی جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده اسپرم

به منظور بررسی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم در گروه‌های مختلف تیماری، نرم‌افزار کامپیوتری آنالیز اسپرم^۴ (CASA) مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب، محتویات دو پایوت از هر گروه تیماری به داخل میکروتیوب انتقال داده شد. سپس با استفاده از سمپلر، ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام منتقل شد و یک لامل تمیز روی آن قرار گرفت. لام مورد نظر به زیر میکروسکوپ فازکنتراست منتقل شده و فراسنجه‌های حرکتی 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 (Heidari و همکاران، ۲۰۲۲).

سلامت غشا اسپرم

در این مطالعه برای بررسی فعالیت و یکپارچگی غشا از تست تورم هیپواسموتیک^۵ (HOST) استفاده شد. به این منظور ۳۰ میکرولیتر از اسپرم رقیق‌شده را با ۳۰۰ میکرولیتر از محلول HOST مخلوط کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه را روی یک گوشه لام قرار داده و با لام دیگر به آرامی گسترش تهیه شد و پس از خشک شدن با استفاده از میکروسکوپ نوری نمونه‌ها ارزیابی شدند. تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و سپس درصد اسپرم‌های با غشا سالم و آسیب‌دیده محاسبه شد (Masoudi و همکاران، ۲۰۲۲).

زنده مانی اسپرم

درصد اسپرم‌های زنده و مرده با روش رنگ‌آمیزی اتوزین-نیگروزین مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا پنج میکرولیتر از نمونه منی با پنج میکرولیتر رنگ روی لام به آرامی مخلوط و با لام دیگر گسترش تهیه شد. جهت خشک کردن، نمونه گسترش‌یافته به مدت سه دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. تعداد ۲۰۰ اسپرم به وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر ارزیابی شد. اسپرم‌هایی که رنگ قرمز مایل به بنفش جذب کرده بودند، مرده و اسپرم‌هایی که رنگ جذب نکرده بودند، زنده در

^۶ - Pisum sativum agglutinin (PSA)

^۴ - Computer aided semen analyses (CASA)

^۵ - Hypoosmotic swelling test (HOST)

آنالیز آماری

نتایج آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از رویه GLM به وسیله نرم افزار آماری SAS 9.4 آنالیز و سطح معنی داری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن 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 آنتی اکسیدان ($i=1-4$)

e_{ij} : اثرات باقیمانده

($j=1-5$)

نتایج و بحث

آزمایش اول (سردسازی)

نتایج مربوط به اثر استفاده از آنتی اکسیدان میتوتمپو بر جنبایی کل و جنبایی پیش رونده اسپرم پس از فرایند سردسازی در جدول یک نشان داده شده است. در زمان صفر، تیمارها تأثیری بر درصد جنبایی کل و جنبایی پیش رونده نداشتند. در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ ساعت سردسازی، درصد جنبایی کل و جنبایی پیش رونده در گروه‌های دریافت کننده تیمارهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار میتوتمپو نسبت به سایر گروه‌ها بالاتر بود ($P < 0.05$).

جدول ۱- تأثیر استفاده از مقادیر مختلف میتوتمپو بر جنبایی کل و جنبایی پیش رونده اسپرم بز پس از فرایند سردسازی

فراسنجه			جنبایی کل اسپرم (%)			جنبایی پیش رونده اسپرم (%)		
تیمار میتوتمپو (میکرومولار)			۰ h	۳۰ h	۶۰ h	۰ h	۳۰ h	۶۰ h
۰	۸۵/۰	۵۶/۰ ^b	۱۸/۱ ^b	۶۵/۳	۱۹/۴ ^b	۹/۵ ^b		
۱	۸۵/۰	۵۷/۹ ^{ab}	۱۹/۰ ^b	/۸	۲۰/۱ ^b	۱۰/۰ ^b		
۱۰	۸۴/۵	۵۹/۰ ^a	۲۲/۱ ^a	۶۵/۱	۲۴/۲ ^a	۱۴/۱ ^a		
۱۰۰	۸۴/۰	۶۰/۵ ^a	۲۳/۶ ^b	/۰	۲۵/۰ ^a	۱۴/۵ ^a		
۱۰۰۰	۸۶/۰	۵۵/۶ ^b	۱۶/۴ ^b	۶۶/۲	۱۸/۵ ^b	۹/۰ ^b		
SEM	۱/۰	/۳	/۶	/۹	/۲	۱/۵		

حروف غیر مشترک نشان دهنده اختلاف معنی دار میان تیمارها در ستون است ($P < 0.05$).

در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ ساعت سردسازی، درصد زنده ماندی و سلامت غشا اسپرم پس از فرایند سردسازی در جدول دو نشان داده شده است. در زمان صفر، تیمارها تأثیری بر زنده ماندی و سلامت غشا اسپرم نداشتند.

نتایج مربوط به اثر استفاده از آنتی اکسیدان میتوتمپو بر زنده ماندی و سلامت غشا اسپرم پس از فرایند سردسازی در جدول دو نشان داده شده است. در زمان صفر، تیمارها تأثیری بر زنده ماندی و سلامت غشا اسپرم نداشتند.

جدول ۲- تأثیر استفاده از مقادیر مختلف میتوتمپو بر زنده ماندی و سلامت غشا اسپرم بز پس از فرایند سردسازی

فراسنجه			زنده ماندی اسپرم (%)			سلامت غشا اسپرم (%)		
تیمار میتوتمپو (میکرومولار)			۰ h	۳۰ h	۶۰ h	۰ h	۳۰ h	۶۰ h
۰	۸۵/۸	۵۵/۲ ^b	۱۶/۰ ^b	/۰	۵۶/۰ ^b	۲۱/۵ ^b		
۱	۸۶/۵	۵۸/۴ ^{ab}	۱۶/۵ ^b	۸۶/۰	۵۸/۴ ^{ab}	۲۳/۰ ^{ab}		
۱۰	۸۶/۲	۶۰/۱ ^a	۲۱/۰ ^a	/۰	۶۰/۰ ^a	۲۵/۹ ^a		
۱۰۰	۸۵/۰	۶۱/۳ ^a	۲۲/۶ ^a	/۵	۶۰/۵ ^a	۲۶/۸ ^a		
۱۰۰۰	۸۷/۰	۵۵/۸ ^b	۱۴/۶ ^b	/۸	۵۵/۵ ^b	۲۱/۵ ^b		
SEM	۱/۱	۱/۵	۲/۰	/۰	/۸	/۰		

حروف غیر مشترک نشان دهنده اختلاف معنی دار میان تیمارها در ستون است ($P < 0.05$).

آزمایش دوم (انجماد)

جنبایی پیش‌رونده، سلامت غشا و سلامت آکروزوم در گروه‌های دریافت‌کننده تیمارهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار میتوتمپو نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ($P < 0.05$). استفاده از غلظت‌های مختلف میتوتمپو تأثیری بر مورفولوژی اسپرم نداشت.

نتایج مربوط به اثر استفاده از آنتی‌اکسیدان میتوتمپو بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم (جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، سلامت غشا، سلامت آکروزوم و مورفولوژی غیر طبیعی) پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی در جدول سه نشان داده شده است. جنبایی کل،

جدول ۳- تأثیر استفاده از مقادیر مختلف میتوتمپو بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی

تیمار میتوتمپو (میکرومولار)						فراسنجه
SEM	۱۰۰۰	۱۰۰	۱۰	۱	۰	
۱/۹	۴۸/۱ ^b	۵۵/۰ ^a	۵۳/۴ ^a	۵۱/۵ ^{ab}	۴۸/۶ ^b	جنبایی کل اسپرم (%)
/۵	۲۶/۵ ^c	۳۵/۴ ^a	۳۳/۷ ^a	۳۰/۰ ^b	۲۶/۴ ^c	جنبایی پیش‌رونده اسپرم (%)
/۵	۵۴/۵ ^c	۶۰/۰ ^a	۵۸/۵ ^{ab}	۵۶/۵ ^{bc}	۵۴/۲ ^c	سلامت غشا اسپرم (%)
۱/۷	۱۸/۲	/۵	۱۷/۰	/۹	۱۷/۰	مورفولوژی غیر طبیعی (%)
/۵	۵۹/۵ ^c	۶۸/۸ ^a	۶۷/۱ ^{ab}	۶۶/۱ ^b	۶۰/۵ ^c	یکپارچگی آکروزوم (%)

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

بحث

کافی نباشد. بنابراین، افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به منی جهت ذخیره سازی اسپرم به عنوان یک راه کار عملی برای جلوگیری از آسیب‌های ناشی از سردسازی و انجماد مورد توجه قرار گرفته است (Bréque و همکاران، ۲۰۰۳).

در این مطالعه نمونه‌های منی از پنج رأس بز نژاد سانن جمع‌آوری شد. غلظت‌های مختلف میتوتمپو به عنوان آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی به رقیق‌کننده اسپرم اضافه شد. پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی و همچنین پایان زمان سردسازی اسپرم، فراسنجه های کیفی شامل جنبایی، زنده‌مانی، سلامت غشا، مورفولوژی غیر طبیعی و یکپارچگی آکروزوم در اسپرم ارزیابی شد. نتایج آزمایشات نشان داد که استفاده از غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار میتوتمپو بیشترین جنبایی، جنبایی پیش‌رونده، زنده مان، سلامت غشا و سلامت آکروزوم را پس از فرایندهای سردسازی و انجماد-یخ‌گشایی اسپرم در پی داشت ($P < 0.05$) که با مطالعات قبلی در اسپرم انسان (Lu و همکاران، ۲۰۱۸)، گوسفند (Asadzadeh و همکاران، ۲۰۲۱)، (Zarei و همکاران، ۲۰۲۱)

در تلقیح مصنوعی، حفظ قابلیت زنده‌مانی و باروری اسپرم به صورت کوتاه یا بلندمدت اهمیت بسیاری دارد. در ذخیره‌سازی برون‌تنی منی به صورت مایع یا یخ‌زده، کاهش برگشت‌ناپذیر جنبایی و تغییرات مورفولوژیک در اسپرم بروز خواهد کرد (Donoghue و Wishart، ۲۰۰۰). بنابراین، بهبود روش‌های ذخیره اسپرم در شرایط مزرعه برای توسعه تلقیح مصنوعی ضروری است. در روند ذخیره‌سازی اسپرم، اگر چه به کمک سرما سرعت متابولیسم سلول کاهش می‌یابد ولی وقوع پراکسیداسیون لیپیدها و بروز تنش اکسیداتیو امری اجتناب‌ناپذیر است (Zhandi Sharafi، ۲۰۱۵). در محیط‌های سردسازی و انجماد به دلیل تنش‌های حرارتی و اکسیداتیو، غلظت رادیکال‌های آزاد بیشتر از آنتی‌اکسیدان‌ها است (Peña و همکاران، ۲۰۰۴). در فرآوری و سردسازی اسپرم، آنتی‌اکسیدان‌های موجود در منی خصوصیات حفاظتی خود را از دست می‌دهند و علاوه بر این اسپرم طی مرحله نهایی اسپرماتوژنز سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهد و این باعث می‌شود جزء آنتی‌اکسیدانی اسپرم برای مقابله با رادیکال آزاد

میتومپو افزایش سطح تنش اکسیداتیو در موش‌ها را معکوس کرده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که میتومپو تنش اکسیداتیو را کاهش داده و درد نوروپاتیکی را در سطح محیطی کاهش می‌دهد. یک اثر غیر مستقیم میتوکندری در تامین انرژی اسپرم ارتباط آن با آنزیم گلوکز-۶-فسفات ایزومراز^۸ (GPI) است. در اسپرم پستانداران، آنزیم گلوکز-۶-فسفات ایزومراز یک آنزیم محلول است که به سستی به میتوکندری متصل می‌شود و به آسانی از اسپرم استخراج می‌شود (Lu و همکاران، ۲۰۱۸). هنگامی که اسپرم در معرض انجماد یا شوک هیپواسموتیک قرار می‌گیرد، مقدار قابل توجهی از این آنزیم به محیط خارج سلولی آزاد می‌شود (Harrison، ۱۹۷۴)، این رخداد احتمالاً علت کاهش جنبایی اسپرم ناشی از فرایند انجماد می‌باشد. گلوکز-۶-فسفات ایزومراز یک آنزیم مهم در مسیر گلیکولیتیک است که ارتباط نزدیک آن با کیفیت اسپرم مورد تایید است (Jiang و همکاران، ۲۰۱۵). این آنزیم به عنوان فسفوگگروز ایزومراز، یک آنزیم سیتوزولی همه‌جا حاضر است که در هر دو مسیر گلیکولیتیک و گلوکزینیک، در تبدیل گلوکز-۶-فسفات به فروکتوز-۶-فسفات نقشی حیاتی دارد (Harrison، ۱۹۷۴). ترکیباتی که دارای خاصیت ضد اسپرماتوژنیک هستند می‌توانند جنبایی اسپرم را مهار کرده و فعالیت آنزیم گلوکز-۶-فسفات ایزومراز را در بیضه و اسپرم کاهش دهند (Ranga و همکاران، ۱۹۹۰) بنابراین به نظر می‌رسد بین فعالیت آنزیم گلوکز-۶-فسفات ایزومراز و جنبایی اسپرم ارتباط برقرار است. مطابق با مطالعات انجام شده، پروتئین آنزیم مذکور پس از انجماد به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد، اما این روند با افزودن میتومپو به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته که نشان‌دهنده اثر میتومپو بر بهبود متابولیسم انرژی در اسپرم پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی است (Lu و همکاران، ۲۰۱۸). نتایج پژوهش حاضر نشان داد استفاده از غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار میتومپو در رقیق‌کننده اسپرم بز اثر معنی‌داری در حفظ جنبایی و جنبایی پیش‌رونده اسپرم پس از سردسازی و انجماد داشته که می‌تواند ناشی از حفظ سلامت میتوکندری و پتانسیل غشا آن به عنوان فاکتور حیاتی تامین انرژی توسط میتوکندری اسپرم باشد.

و (۲۰۲۲) و خروس (Masoudi و همکاران، ۲۰۲۰ و ۲۰۲۱) مطابقت دارد. لو و همکاران در سال ۲۰۱۸ اثرات غلظت‌های مختلف میتومپو (۰، ۵، ۵۰، ۵۰۰ میکرومولار) بر کیفیت اسپرم انسان پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی را مورد بررسی قرار دادند و پیشنهاد کردند که افزودن دو سطح ۵ و ۵۰ میکرومولار میتومپو به طور قابل توجهی باعث بهبود جنبایی اسپرم، زنده‌مانی، سلامت غشا و پتانسیل غشا میتوکندری پس از یخ‌گشایی می‌شود (Lu و همکاران، ۲۰۱۸). علاوه بر این ژنگ و همکاران در سال ۲۰۱۹ در مطالعه خود در بیماران استئوزوسپرمی دریافتند افزودن غلظت‌های مختلف میتومپو (۰، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به محیط انجماد باعث بهبود قابل توجهی در زنده‌مانی، جنبایی، سلامت غشا، پتانسیل غشا میتوکندری، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش تشکیل محصولات اکسیداسیون می‌شود (Zhang و همکاران، ۲۰۱۹).

مکانیسم احتمالی عملکرد میتومپو در کاهش صدمات ناشی از فرایند انجماد و سردسازی اسپرم، مربوط به اثر آن در جلوگیری از تولید بیش از حد و سرریز رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از سردسازی و انجماد از طریق ساختار شبه هیدروکسیلامینی آن است. میتومپو به عنوان سوپراکسیددیسموتاز برای حفظ پایداری زنجیره انتقال الکترون و غشا دو لایه فسفولیپیدی عمل می‌کند (Yang و همکاران، ۲۰۱۸). از آنجا که نیتروکسیدها به عنوان مقلد آنزیم سوپراکسیددیسموتاز شناخته می‌شوند، میتومپو به عنوان یک سوپراکسید میتوکندریایی و جاروبگر رادیکال آلکیل به طور مستقیم در خنثی‌سازی رادیکال‌های اکسیژن میتوکندریایی عمل می‌کند (Dikalova و همکاران، ۲۰۱۰). بر این اساس ژان و همکاران در سال ۲۰۱۸ اثر میتومپو بر درد نوروپاتیکی (CCI)^۷ در موش صحرایی را مورد بررسی قرار دادند. در این عارضه تنش اکسیداتیو موجب آسیب بافتی و درد عصبی می‌شود (Naik و همکاران، ۲۰۰۶). نتایج این آزمایش نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید در سرم موش‌های صدمه دیده افزایش یافته و میزان گلوکاتایون و فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز کاهش یافته است و در مقابل، درمان با

^۷ - Chronic constrictive injury (CCI)

^۸ - Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، استفاده از میتوتمپو در فرایند سردسازی و انجماد موجب بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز نژاد سانن شد. به‌طوری که در اسپرم سرد شده و یخ‌گشایی شده بیشترین میزان جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت آکروزوم در تیمارهای

منابع

- Asadzadeh, N., Abdollahi, Z., Esmaeilkhani, S., & Masoudi, R. (2021). Fertility and flow cytometry evaluations of ram frozen semen in plant-based extender supplemented with Mito-TEMPO. *Animal Reproduction Science*, 233, 106836. Doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106836
- 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.org/10.1002/mrd.10347
- Dikalova, A. E., Bikineyeva, A. T., Budzyn, K., Nazarewicz, R. R., McCann, L., Lewis, W., ... & Dikalov, S. I. (2010). Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circulation research*, 107(1), 106-116. Doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.214601
- Donoghue, A. M., & Wishart, G. J. (2000). Storage of poultry semen. *Animal reproduction science*, 62(1-3), 213-232. Doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00160-3
- Harrison, R. A. P. (1974). The detection of hexokinase, glucosephosphate isomerase and phosphoglucomutase activities in polyacrylamide gels after electrophoresis: a novel method using immobilized glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Analytical biochemistry*, 61(2), 500-507. Doi.org/10.1016/0003-2697(74)90417-5
- Heidari, M., Qasemi-Panahi, B., Moghaddam, G., Daghigh-Kia, H., & Masoudi, R. (2022). L-carnitine improves quality parameters and epigenetic patterns of buck's frozen-thawed semen. *Animal Reproduction Science*, 247, 107092. Doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107092
- Jiang, X. P., Wang, S. Q., Wang, W., Xu, Y., Xu, Z., Tang, J. Y., ... & Zhang, W. (2015). Enolase1 (ENO1) and glucose-6-phosphate isomerase (GPI) are good markers to predict human sperm freezability. *Cryobiology*, 71(1), 141-145. Doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.04.006
- Lu, X., Zhang, Y., Bai, H., Liu, J., Li, J., & Wu, B. (2018). Mitochondria-targeted antioxidant MitoTEMPO improves the post-thaw sperm quality. *Cryobiology*, 80, 26-29. Doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.12.009
- Masoudi, R., Asadzadeh, N., & Sharafi, M. (2020). The mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO conserves rooster's cooled semen quality and fertility potential. *Theriogenology*, 156, 236-241. Doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.07.018
- Masoudi, R., Asadzadeh, N., & Sharafi, M. (2021). Effects of freezing extender supplementation with mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO on frozen-thawed rooster semen quality and reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, 225, 106671. Doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106671
- Masoudi, R., Esmaeilkhani, S., Sharafi, M., Abdollahi, Z., Jafari, V., Hatefi, A., ... & Banabazi, M. H. (2022). Cysteamine

- enhances quality and fertility potential of rooster semen in cooled storage. *Theriogenology*, 177, 29-33. Doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.023
- Murphy, M. P., & Smith, R. A. (2000). Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 41(2), 235-250. Doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00069-1
- Naik, A. K., Tandan, S. K., Dudhgaonkar, S. P., Jadhav, S. H., Kataria, M., Prakash, V. R., & Kumar, D. (2006). Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *European Journal of Pain*, 10(7), 573-579. Doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.08.006
- 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.org/10.1017/S096719940400262X
- Ranga, A., Kalla, N. R., & Kanwar, U. (1990). Effect of gossypol on the fertility of male rats. *Acta Europaea Fertilitatis*, 21(1), 7-15. PMID: 1706128
- Samuni, A. M., & Barenholz, Y. (2003). Site-activity relationship of nitroxide radical's antioxidative effect. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(2), 177-185. Doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01238-8
- Sarsour, E. H., Kalen, A. L., & Goswami, P. C. (2014). Manganese superoxide dismutase regulates a redox cycle within the cell cycle. *Antioxidants & redox signaling*, 20(10), 1618-1627. Doi.org/10.1089/ars.2013.5303
- Yang, S. G., Park, H. J., Kim, J. W., Jung, J. M., Kim, M. J., Jegal, H. G., ... & Koo, D. B. (2018). Mito-TEMPO improves development competence by reducing superoxide in preimplantation porcine embryos. *Scientific Reports*, 8(1), 10130. Doi.org/10.1038/s41598-018-28497-5
- Yasui, K., & Baba, A. (2006). Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. *Inflammation Research*, 55, 359-363. Doi.org/10.1007/s00011-006-5195-y
- Zarei, F., Kia, H. D., Masoudi, R., Moghaddam, G., & 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. Doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.018
- Zarei, F., Daghighi-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.org/10.1111/and.14299
- Zhandi, M., & Sharafi, M. (2015). Negative effect of combined cysteine and glutathione in soy lecithin-based extender on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and tissue banking*, 16, 443-448. DOI.org/10.1007/s10561-014-9488-z
- Zhang, X., Lu, X., Li, J., Xia, Q., Gao, J., & Wu, B. (2019). Mito-Tempo alleviates cryodamage by regulating intracellular oxidative metabolism in spermatozoa from asthenozoospermic patients. *Cryobiology*, 91, 18-22. Doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.11.005