مجله
تحقیقات دام و طیور
جلد۲- شماره ۲- تابستان ۱۳۹۲- ص ص۱۱-۱۸

تاریخچه مقاله:
دریافت:۹۲/۰۱/۱۸
پذیرش: ۹۲/۱۲/۲۷

# اثر آنتی اکسیدان‌ها برآنزیم‌های داخل سلولی و پراکسیداسیون چربی غشای اسپرم‌ها در رقیق کننده منی گاو نژادهای هلشتاین و سیمنتال

**حسین دقیق کیا[1*] و رستگار الفتی کرجی[2]**

۱- دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

**چکیده**

غشای سلول اسپرم به واسطه افزایش انواع اکسیژن فعال ناشی از فرآیند انجماد مستعد استرس اکسیداتیو و آسیب پراکسیداتیو است. هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر سطوح مختلف آنتی اکسیدان‌های گلوتاتیون احیاء شده (GSH) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD ) بر پارامترهای بیوشیمیایی اسپرم منجمد-یخ گشایی شده گاونر بود. ۳۵ انزال (۵ انزال ازهر گاو در هر نژاد) از نژادهای هلشتاین (n=۴) و سیمنتال (n=۳) جمع آوری شدند. نمونه‌های منی دارای شرایط مناسب، مخلوط شده (بطور جداگانه در هر تکرار از هر نژاد) و توسط رقیق کننده تریس– زرده تخم مرغ که حاوی سطوح ۵ و ۷/۵ میلی مولار GSH و ۱۰۰ و ۱۵۰ واحد بین المللی در میلی لیتر SOD بود و یک رقیق کننده فاقد افزودنی (شاهد) رقیق شدند. نمونه‌های منی به مدت ۲ ساعت تا دمای ۵°C خنک شده و سپس در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتر منجمد شدند. سطح مالونیل دی آلدهاید، فعالیت آندوژنوسی آنزیم‌های SOD و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) پس از یخ‌گشایی ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که افزودن هر دو سطح GSH به رقیق کننده انجماد منی‌گاو، بطور معنی‌داری سطح مالون دی آلدهاید را نسبت به گروه کنترل، در هر دو نژاد کاهش داد (P<۰/۰۵). همچنین افزودن سطح ۵ میلی مولار از GSH فعالیت GPx اسپرم‌های نژاد سمینتال را نسبت به گروه شاهد بهبود بخشید (P<۰/۰۵). بطورکلی، نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن ۷/۵ یا ۵ میلی مولار از GSH به رقیق کننده تأثیر مثبتی بر سیستم دفاع داخل سلولی و کاهش پراکسیداسیون غشاء اسپرم دارد.

**کلمات کلیدی:** انجماد منی، آنتی اکسیدان، پراکسیداسیون چربی

نگارنده پاسخگو: حسین دقیق‌کیا. آدرس: تبریز، بلوار ۲۹ بهمن تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی
پست الکترونیک: daghighkia@tabrizu.ac.ir

## مقدمه

تکنیک انجماد اسپرم و استفاده از اسپرم منجمد شده در تلقیح مصنوعی و تولید آزمایشگاهی رویان (فرانکو و باروفی ۲۰۰۲) و تزریق درون سیتوپلاسمی اووسیت (حافظ و همکاران، ۲۰۰۴)، موجب بهبود راندمان تولیدمثل می‌شود. بنابر این استفاده از اسپرم طبیعی و کارآمد برای حصول به راندمان بالای باروری در این تکنیک‌ها ضروری بوده و روش‌های بکار برده شده برای فرآوری سلول اسپرم، نقش مهمی در بهره‌وری این تکنیک‌ها دارد. با وجود استفاده از پیشرفته‌ترین امکانات و روش‌های انجماد اسپرم، همواره مشاهده می‌شود که پس از انجماد درصد چشمگیری از سلول‌های اسپرم مرده و یا توان باروری خود را از دست می‌دهند (بیلی و همکاران، ۲۰۰۰؛ واتسون، ۲۰۰۰؛ گیدیا و همکاران، ۲۰۰۴؛ استرادیولی و همکاران، ۲۰۰۷).

تحت تأثیر فرآیند انجماد-یخ‌گشایی غلظت آنزیم‌ها و مواد آنتی‌اکسیدانی به شدت کاهش می‌یابد. مطالعات پیشین کاهش غلظت آنزیم‌های GSH در اسپرم انسان، گاو و خوک و SOD در اسپرم گاو (بیلودو و همکاران، ۲۰۰۰؛ گیدیا و همکاران، ۲۰۰۴؛ استرادیولی و همکاران، ۲۰۰۷؛ گیدیا و همکاران، ۲۰۱۱) را بعد از فرآیند انجماد، گزارش کرده‌اند. اختلال در سیستم دفاع سلولی که در آن آنزیم‌هایی نظیر SOD، کاتالاز، GPx و گلوتاتیون ردوکتاز و کوفاکتور GSH دخالت دارند، موجب کاهش خنثی‌سازی اثر انواع اکسیژن فعال (ROS)، افزایش تجمع آنها و ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو می‌شود. باتوجه به اینکه غشاء سلول‌های اسپرم پستانداران نسبت بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع دارند (ماکسول و واتسون، ۱۹۹۶؛ بنسال و بیلاسپوری، ۲۰۱۱)، اولین محلی که توسط ROSها مورد حمله قرار می‌گیرد اسیدهای چرب با پیوند دوگانه است (جونز و همکاران، ۱۹۷۹؛ آیتکن، ۱۹۹۵). علاوه بر آسیب غشای سلولی در اثر این حملات، مشتقات حاصل از پراکسیده شدن اسیدهای چرب (MDA) به سازوکارهای متابولیسمی و ارگان‌های سلولی از جمله DNA و پروتئین‌ها، آسیب‌های جبران ناپذیری وارد می‌کنند (وایت، ۱۹۹۳). این اختلالات در نهایت با کاهش فعالیت آنزیم‌های داخل سلولی، قدرت تحرک و زنده‌مانی اسپرم، منجر به افت محسوس باروری اسپرم‌ها می‌شود (وایت، ۱۹۹۳؛ آیتکن، ۱۹۹۵؛ ژاو و بوهر، ۱۹۹۵؛ آیتکن و همکاران، ۱۹۹۸).

غنی نمودن محیط رقیق‌کننده انجماد اسپرم توسط آنتی-اکسیدان‌ها، یکی از استراتژی‌های مؤثر در حفظ راندمان باروری اسپرم، پس از انجماد است (میکائیل و همکاران، ۲۰۰۹). تأثیر مثبت استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانی نظیر بوتیلات هیدروکسی تولوئن، ویتامین E، سیتئین، تائورین، گلوتاتیون احیاء شده و سوپراکسید دیسموتاز و بسیاری از مواد آنتی اکسیدانی دیگر در مطالعات پیشین گزارش شده است (روکا و همکاران، ۲۰۰۵؛ بوکاک و همکاران، ۲۰۰۸؛ شوآ و ضمیری، ۲۰۰۸؛ ساری اوزجان و همکاران، ۲۰۰۹؛ هو و همکاران، ۲۰۱۱؛ پرومال و همکاران، ۲۰۱۱). افزودن آنتی اکسیدان‌ها به محیط انجماد اسپرم سبب حفظ یا بهبود عملکرد متابولیکی و ساختمانی سلول اسپرم می‌شود (بنسال و بیلاسپوری، ۲۰۱۱) که در طول مراحل رقیق‌سازی، انجماد و یخ‌گشایی به آنها آسیب وارد می‌شود. این آسیب‌ها عمدتاً ناشی از تولید چشمگیر رادیکال‌های آزاد بویژه ROSها ($H_2O_2$، $O_2^-$، $OH^-$) می‌باشد (سیکا و همکاران، ۱۹۹۵؛ وانگ و همکاران، ۱۹۹۷؛ آگروال و همکاران، ۲۰۰۲؛ تامسون و همکاران، ۲۰۰۹).

نتایج تحقیقات پیشین حاکی از آن است که استفاده از آنتی اکسیدان GSH در رقیق کننده انجماد منی گاو، گوسفند و خوک باعث حفظ پارامترهای دینامیکی (حرکتی) اسپرم پس از یخ گشایی آن می‌شود (بیلودو و همکاران، ۲۰۰۱؛ گیدیا و همکاران، ۲۰۰۸؛ پرومال و همکاران، ۲۰۱۱). گیدیا و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که استفاده از GSH در رقیق کننده منی پس از انجماد، عملکرد اسپرم گاو را بهبود می‌بخشد. با توجه به اینکه اسپرم سلولی هاپلوئید بوده و بخشی از سیتوپلاسم خود را در جریان بلوغ از دست می‌دهد، بنابراین توانایی آن در تعدیل آسیب‌های انجماد نسبت به سایر سلول‌ها درسطح پائین‌تری قرار دارد (گیدیا و همکاران، ۲۰۰۴؛ بوکاک و همکاران، ۲۰۰۸؛ گیدیا و همکاران، ۲۰۰۸؛ پرومال و همکاران، ۲۰۱۱) ؛ لذا هدف از این تحقیق بررسی تأثیر سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان‌های GSH و SOD بطور همزمان بر فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx و میزان پراکسیده شدن چربی غشاء اسپرم در رقیق کننده انجماد منی گاو نر بود.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق در مرکز اصلاح نژاد شمال غرب و غرب کشور در استان آذربایجان شرقی، تبریز انجام شد. مجموع ۳۵ انزال (۵ انزال از هر گاو) از ۴ رأس گاو نر هلشتاین و ۳ رأس گاو نر سیمنتال سالم و بارور با سن ۵-۴ سال، شرایط پرورش

یکسان، دو بار در هفته و با کمک مهبل مصنوعی جمع آوری شد. در هر انزال، نمونه‌های منی با غلظت بیش از $۵×۱۰^{۷}$ اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک بالای ۷۰٪ و ناهنجاری کل اسپرم غیرطبیعی کمتر از ۱۰٪ به عنوان نمونه منی مناسب در نظر گرفته شدند؛ در غیر اینصورت منی جمع‌آوری شده از دام مورد نظر حذف گردید. در هر تکرار آزمایش، به منظور حذف اثرات فردی، نمونه‌های منی دام‌ها در مقادیر مساوی با هم مخلوط شدند.

رقیق‌سازی منی با استفاده از رقیق‌کننده بر پایه تریس-زرده تخم مرغ (۶۰ میلی مولار اسید سیتریک، ۶۹ میلی مولار فرکتوز، ۰/۲۵ مول تریس، ۲۰٪ زرده تخم مرغ، ۷٪ گلیسرول، ۲۵۰ میلی گرم در لیتر جنتامایسین، ۱۵۰ میلی گرم در لیتر لینکومایسین، ۳۰۰ میلی گرم در لیتر اسپکتینومایسین و ۵۰ میلی گرم در لیتر تایلوزین با pH ۶/۸) صورت گرفت (بیلودو و همکاران، ۲۰۰۲؛ مارتینز و همکاران، ۲۰۰۶). آنتی‌اکسیدان‌های GSH در دو سطح (۵ و ۷/۵ میلی مولار) و SOD در دو سطح (۱۰۰ و ۱۵۰ واحد بین المللی در میلی لیتر ) به رقیق کننده پایه افزوده شد و پس از ۲ ساعت زمان تعادل گلیسرول و سرد سازی تا $۵^{o}C$، نمونه‌ها توسط دستگاه فیلینگ- سیلینگ (IMV, Franc) در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتر به تعداد $۳۰×۱۰^{۶}$ اسپرم پر و بسته‌بندی شدند.

## آنالیزهای بیوشیمیایی

پس از یخ‌گشایی پایوت‌های اسپرم، ۱ میلی لیتر محلول NaCl ۰/۹ درصد به آنها اضافه شده و سپس سانتریفیوژ شد (۱۰۰۰g × در ۵ دقیقه). برای آنالیزهای تعیین میزان پراکسیداسیون چربی و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، پلت اسپرم جدا شده و در دمای $-۷۰^{°C}$ ذخیره شدند.

## سطح مالونیل دی آلدئید (MDA)

با اندازه‌گیری سطح MDA توسط اسید تیوباربیتوریک، میزان پراکسیداسیون چربی اسپرم بر اساس روش اوکاوا و همکاران (۱۹۷۹) برآورد شد. برای تعیین سطح MDA، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون پلت سلول اسپرم به محلول TBA-TCA (۱/۲۵ میلی‌لیتر از ۲۰٪ واحد حجمی TCA، ۱ میلی‌لیتر از ۰/۲٪ واحد حجمی TBA و ۱/۲۵ میلی‌لیتر از ۰/۰۵ مول $H_2So_4$) اضافه گردید. مخلوط حاصل در آب جوش (۹۵ درجه) به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. پس از جوشیدن، ۴ میلی مولار بوتانول به مخلوط اضافه شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی جدا شده و جذب نوری آن در ۵۳۵ نانومتر توسط بایوفتومتر (اپندروف پلاس آلمان) اندازه‌گیری شد. غلظت MDA توسط ضریب جذب ویژه (۱/۵۶×۱۰۵ µmol/cm3) تعیین شد. MDA تولید شده به صورت پیکومول بر میلی‌گرم پروتئین پلت سلول اسپرم ثبت گردید.

## فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز مطابق روش پاگلیا و والنتاین (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. اساس آزمایش بدین صورت است که GPX با اکسیداسیون GSH توسط کومن هیدروپراکسیداز کاتالیز می‌شود. در حضور گلوتاتیون ردوکتاز و نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات (NADPH) بلافاصله گلوتاتیون اکسید شده و همزمان با اکسید شدنNADPH به NADP به شکل احیا تبدیل می‌شود. اکسیداسیون NADPH به NADP با کاهش در جذب نوری ۳۴۰ نانومتری ارتباط دارد که در این آزمایش بوسیله دستگاه اسپکتوفتومتر، فعالیت GPx تشخیص داده شد. نرخ کاهش جذب نوری نسبت مستقیمی با فعالیت GPx دارد. مخلوط واکنش شامل ۲۰ میکرولیتر از نمونه (۳ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر از پلت سلول اسپرم)، ۱ میلی‌لیتر از محلول (۴ میلی‌مول گلوتاتیون، ۰/۰۵ واحد در هر لیتر گلوتاتیون ردوکتاز، ۰/۳۴ میلی‌مولار NADPH، ۰/۰۵ میلی‌مولار بافر فسفات، pH ۷/۲ و ۴/۳ میلی‌مولار EDTA) و ۴۰ میکرولیتر کومن هیدرو پراکسیداز بود. میزان جذب نوری نمونه مخلوط پس از ۲۰ دقیقه توسط بایوفتومتر (اپندروف پلاس آلمان) در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار GPx بصورت میلی واحد در هر میلی‌گرم پروتئین پلت سلول اسپرم ثبت گردید.

## فعالیت سوپراکسید دیسموتاز

میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از روش پیشنهاد شده توسط میسرا و فردیوویچ (۱۹۷۲) تعیین گردید. اساس این آزمایش بر این استوار است که در این روش از گزانتین و گزانتین اکسیداز برای تولید رادیکال سوپراکسید که با 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5- phenyl tetrazolium chloride (I.N.T) بکار برده شد که در نهایت واکنش به رنگ قرمز فورمازان تظاهر پیدا می‌کند. فعالیت SOD با درجه ممانعت از انجام این واکنش اندازه‌گیری می‌شود.

یک واحد از SOD عامل ۵۰٪ ممانعت از کاهش NT تحت شرایط این آزمایش می‌باشد. مخلوط واکنش برای هر استاندارد شامل ۳۰ میکرولیتر از نمونه (پلت سلول اسپرم) و ۱ میلی‌لیتر از محلول (۰/۰۵ میلی مولارارگزانتین، ۰/۰۲۵ میلی مولار INT، ۴۰ میلی مولار CAPS با pH۱۰/۲ و ۰/۹۴ میلی مولار EDTA) و ۱۵۰ میکرولیتر از گزانتین اکسیداز بود. کیوویت حاوی مخلوط نمونه توسط بایوفتومتر (اپندروف پلاس آلمان) در طول موج ۵۰۵ نانومتر در دو مرحله تشخیص داده شد: ۱) جذب نوری اولیه پس از ۳۰ ثانیه و ۲) دومین جذب نوری ۳ دقیقه پس از افزودن گزانتین اکسیداز به مخلوط نمونه ثبت شد. همچنین یک گروه شاهد نیز مورد استفاده قرار گرفت. مقدار SOD بصورت واحد بین المللی بر گرم پروتئین پلت سلول اسپرم بیان شد.

## آنالیز آماری

آنالیز واریانس داده‌های تشخیص بیوشیمیایی با استفاده از رویه GLM و بدنبال آن توسط آزمون حداقل مربعات میانگین، تیمارهای آزمایشی مقایسه شدند. مدل آماری بکار رفته در این مطالعه و اجزای آن عبارتند از :

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

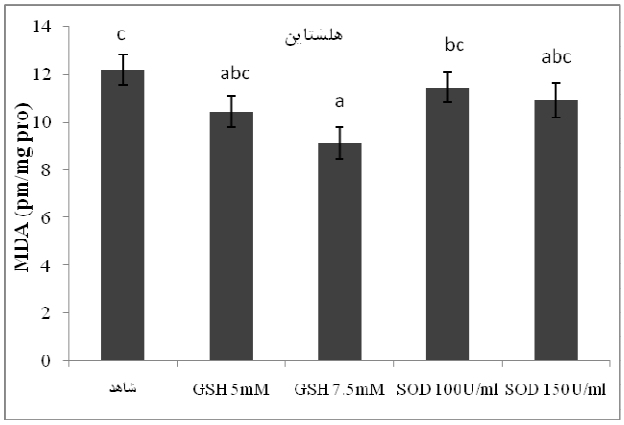
$Y_{ij}$ =مشاهده ij ام، $T_i$=اثر تیمار i ام

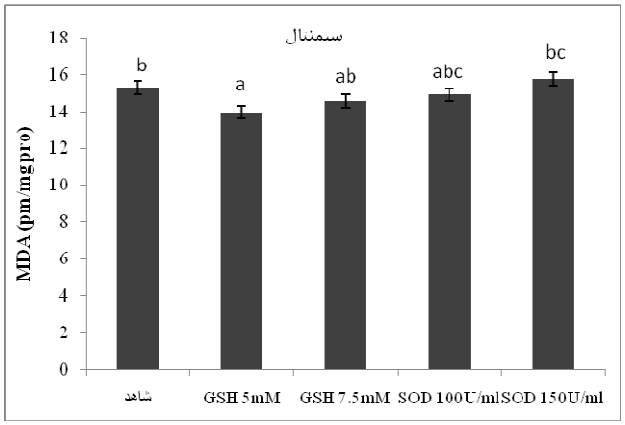
$\mu$ =میانگین مشاهده، $e_{ij}$ =اثر خطای آزمایشی ij ام

## نتایج

نتایج حاصل از آنالیز داده‌های این تحقیق نشان داد که در اسپرم های منجمد-یخ‌گشایی شده هر دو نژاد هلشتاین و سیمنتال میزان MDA بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی کاهش یافت. میزان MDA در تیمارGSH (۷/۵ میلی مولار) نژاد هلشتاین بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) از تیمار شاهد و SOD (۱۰۰ واحد) پائین‌تر بود (شکل ۱) و تیمار GSH (۵ میلی مولار) در نمونه‌های نژاد سیمنتال بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) از تیمار شاهد و SOD (۱۵۰ واحد) (شکل ۱) پائین‌تر بود (شکل ۱). بعلاوه، در نژاد سیمنتال سطح MDA تیمار GSH (۵ میلی مولار) بطورمعنی دار (P<۰/۰۵) کمتر از SOD (۱۵۰واحد) مشاهده شد (شکل ۱).

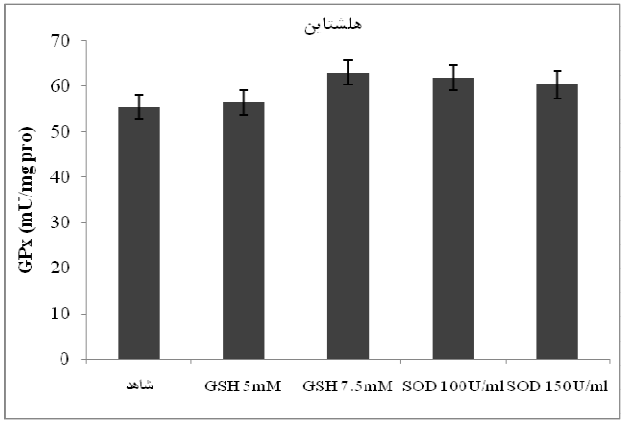
داده‌های مربوط به میزان فعالیت آنزیم GPx اسپرم در شکل ۲ نشان داده شده است. استفاده از تیمارهای آزمایشی در این مطالعه باعث بهبود فعالیت آنزیم GPx در نمونه‌های منی پس از انجماد، در نژاد هلشتاین نشد. در حالیکه فعالیت این آنزیم در نمونه‌های نژاد سیمنتال بطور معنی‌دار افزایش یافت (P<۰/۰۵). در نژاد سیمنتال، فعالیت آنزیم GPX در نمونه‌های منی یخ‌گشایی با آنتی اکسیدان GSH (سطح ۵ میلی مولار)، نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت (P<۰/۰۱).

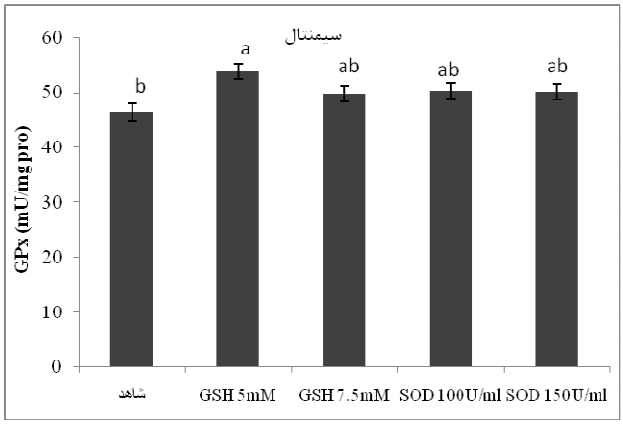



شکل ۱. تاثیر سطوح مختلف آنتی اکسیدان‌های گلوتاتیون احیاء شده (GSH) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بر میزان مالون دی آلدئید (MDA) اسپرم منجمد/یخ گشایی شده گاو نر (هلشتاین؛ سیمنتال). حروف متفاوت، اختلاف معنی داری را نشان می‌دهند (P< ۰/۰۵).

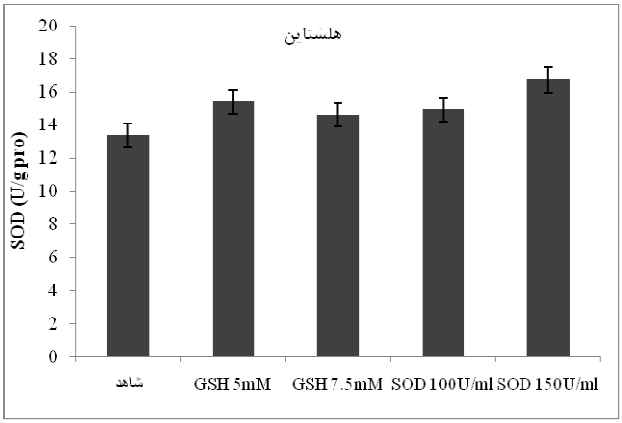
آزمایش نمونه‌های منی یخ‌گشایی شده هردو نژاد هلشتاین و سیمنتال نشان داد که با افزودن غلظت‌های مختلفی از آنتی‌اکسیدان‌های GSH و SOD به رقیق‌کننده تریس-زرده تخم مرغ، فعالیت آنزیم SOD را بهبود نداد.

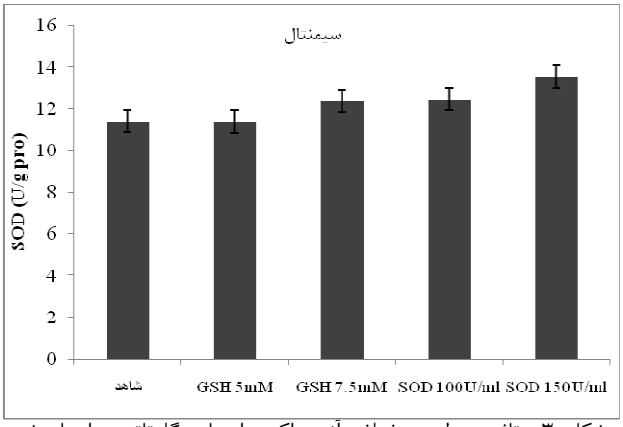



شکل ۲- تاثیر سطوح مختلف آنتی اکسیدان‌های گلوتاتیون احیاء شده (GSH) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) اسپرم منجمد/یخ گشایی شده گاو نر (هلشتاین؛ سیمنتال).

حروف متفاوت، اختلاف معنی داری را نشان می‌دهند (P< ۰/۰۵).




شکل ۳- تاثیر سطوح مختلف آنتی اکسیدان‌های گلوتاتیون احیاء شده (GSH) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اسپرم منجمد/یخ گشایی شده گاو نر (هلشتاین؛ سیمنتال).

## بحث

نتایج این بررسی نشان داد که افزودن غلظت ۵ میلی مولار از GSH به رقیق‌کننده انجماد منی گاو سیمنتال، سبب بهبود فعالیت آنزیم GPx شد. تفاوت‌هایی که در تأثیر غلظت GSH در بین دو نژاد بر فعالیت این آنزیم دیده می‌شود احتمالاً مربوط به تفاوت در میزان مقاومت فیزیکی و شیمیایی سلول‌های اسپرم در طی مراحل انجماد و آسیب‌های انجمادی باشد. آنتی اکسیدان GSH بعنوان کوفاکتور آنزیم GPx نقش تعیین کننده‌ای در پاکسازی پراکسید هیدروژن بازی می‌کند (سیکا، ۱۹۹۶؛ بیلودو و همکاران، ۲۰۰۰؛ گیدیا و همکاران، ۲۰۰۴). بعبارت دیگر بعلت کاهش شدید غلظت GSH داخل سلولی در طول انجماد، چنانچه غلظت مناسبی از آن مورد استفاده قرار گیرد، می‌تواند با بهینه نمودن عملکرد آنزیم GPx بخش قابل توجهی از آسیب‌های سلولی ناشی از افزایش مقدار رادیکال پراکسید هیدروژن را، با تبدیل نمودن به اکسیژن و آب، کاهش داده و تأثیر مثبتی بر کاهش میزان ROS داخل سلولی داشته باشد. بهبود فعالیت آنزیم GPx با افزودن GSH بطور غیر مستقیم نشان دهنده کاهش شدید این کوفاکتور در فرآیند انجماد و یخ‌گشایی منی است؛ این نتایج همسو با نتایج بدست آمده توسط دیگر محققان (استبیلودو و همکاران، ۲۰۰۰؛ گیدیا و همکاران، ۲۰۰۴؛ استرادیولی و همکاران، ۲۰۰۷؛ گیدیا و همکاران، ۲۰۱۱) می‌باشد. در این مطالعه افزودن GSH به رقیق کننده انجماد منی در هر دو نژاد تغییری در میزان فعالیت آنزیم SOD داخل سلولی ایجاد نکرد. با توجه به نقش GSH (کوفاکتور آنزیم GPx) در پاکسازی متابولیت $H_2O_2$ حاصل از واکنش یا مکانیسم سم زدایی آنزیم SOD (سیکا، ۱۹۹۶)، واضح است که افزودن این ترکیب تغییری در فعالیت آنزیم SOD ایجاد نمی کند. بنابراین نتایج این آزمایش فرضیه فوق را به درستی تأیید می‌کند.

تحقیقات نشان می‌دهد که آنزیم SOD در طی فرآیند

انجماد اسپرم بطور غیرقابل برگشتی از سلول خارج می‌شود (لاسو و همکاران، ۱۹۹۴؛ بیلودو و همکاران، ۲۰۰۰). باتوجه به نقش مهم این آنزیم درپاکسازی رادیکال‌آزاد یون‌پراکسید ($O_2^-$)، کاهش یا عدم فعالیت این آنزیم می‌تواند سبب افزایش سطح ROS در سلول شود. در این مطالعه افزودن سطح ۱۵۰ واحد SOD به رقیق‌کننده انجماد منی هر دو نژاد، سبب بالا رفتن فعالیت داخل سلولی این آنزیم در ارزیابی‌های پس از انجماد نسبت به سایر تیمارها شد، با این وجود نتایج آنالیز واریانس داده‌های حاصل از میزان فعالیت آنزیم SOD تفاوت معنی داری (P=۰/۰۷) را در هر دو نژاد نشان نداد. افزایش فعالیت داخل سلولی آنزیم SOD با افزودن آن به رقیق کننده تریس- زرده تخم مرغ تأیید کننده گزارشات (لاسو و همکاران، ۱۹۹۴؛ بیلودو و همکاران، ۲۰۰۰) مبنی بر کاهش معنی‌دار در فعالیت داخل سلولی این آنزیم در طول فرایند انجماد- یخ گشایی می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که با افزودن آنزیم SOD به رقیق‌کننده انجماد، (در هر دو نژاد) فعالیت آنزیم GPx تغییر محسوسی پیدا نمی‌کند.

اسیدهای چرب غشاء اسپرم در برابر حملات ROS به شدت آسیب پذیرند که بواسطه آن صدماتی از جمله کاهش زنده‌مانی و تحرک و از سوی دیگر، افزایش نرخ گسیختگی DNA و اختلال در عملکرد فعالیت میتوکندری‌های اسپرم وارد ساخته و نهایتاً موجب کاهش باروری اسپرم خواهد شد (ژولین و همکاران، ۱۹۸۹؛ هموررستدت و همکاران، ۱۹۹۰؛ وایت، ۱۹۹۳؛ بامبر و همکاران، ۲۰۰۰). بهترین استراتژی حفاظت از تخریب اسیدهای چرب غیر اشباع غشا، کاهش یا کنترل تولید ROSها تا محدوده مقدار بی‌خطر آن‌ها می‌باشد. تشخیص سطح MDA معیاری از میزان پراکسیداسیون چربی می‌باشد که در این آزمایش استفاده شده است. در این مطالعه افزودن ۷/۵ و ۵ میلی مولار GSH به رقیق‌کننده تریس- زرده تخم مرغ پیش از انجماد آن، به ترتیب در نمونه‌های نژادهای هلشتاین و سیمنتال، سطح MDA را بطور معنی‌داری کاهش داد. این نتایج با مطالعات پرومال و همکاران (۲۰۱۱) همخوانی دارد. بعلاوه در این مطالعه ما مشاهده شد که در هر دو نژاد هلشتاین و سیمنتال سطوح ۷/۵ و ۵ میلی‌مولار GSH عملکرد بهتری به ترتیب نسبت به سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ واحد SOD داشت. باتوجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً با افزایش فعالیت آنزیم GPx در نمونه‌های اسپرم منجمد-یخ گشایی شده حاوی افزودنی GSH در سطوح ۷/۵ و ۵ میلی‌مولار به ترتیب در نژاد هلشتاین و سیمنتال، میزان پراکسیده شدن اسپرماتوزوآ کاهش می‌یابد. اما همزمان با بهبود فعالیت آنزیم SOD داخل سلولی، در هر دو نژاد، تحت تأثیر اضافه کردن ۱۵۰ واحد SOD، میزان پراکسیداسیون چربی‌ها بشدت افزایش یافت، به این دلیل که در تیمار مورد نظر همزمان افزایش سطح MDA و فعالیت آنزیم SOD مشاهده شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اولاً، همسو با گزارش سیکا (۱۹۹۶) فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx با نرخ پراکسیداسیون چربی ارتباط دارد؛ ثانیاً فعالیت سمی پراکسید هیدروژن نسبت به یون پراکسید بسیار بیشتر است؛ بدین دلیل است که افزایش فعالیت SOD بدون افزایش فعالیت GPx، سبب تجمع بیش از حد ترکیب پراکسید هیدروژن در سلول می‌گردد که بدنبال آن آسیب بیشتری به اسیدهای چرب بویژه گروهای غیر اشباع را وارد می‌نماید. اما در مقابل افزایش فعالیت آنزیم GPx داخل سلولی سبب کاهش معنی‌دار میزان پراکسیده شدن چربی می‌شود. این فرضیه با مطالعات روکا و همکاران (۲۰۰۵) همسو می‌باشد.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با عملکرد بهینه آنتی اکسیدان‌های آنزیمی (SOD) و غیرآنزیمی (GSH) نرخ پراکسیده شدن چرب‌های غشاء اسپرماتوزوآ کاهش یافته و بدنبال آن سایر ارگان‌های سلولی نیز از آسیب در امان می‌مانند. نرخ پراکسیداسیون چربی غشاء سلولی با نرخ باروری اسپرم رابطه معکوسی دارد (پرومال و همکاران، ۲۰۱۱). به نظر می‌رسد با کاهش نرخ پراکسیداسیون چربی غشا اسپرماتوزوآ در رقیق کننده‌های انجماد حاوی سطوح ۷/۵ و ۵ میلی مولار GSH (به ترتیب در نژاد هلشتاین و سیمنتال) بهبود باروری دور از انتظار نباشد.

به نظر می‌رسد بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش، تأمین سطوح مناسب آنتی اکسیدان‌های GSH، SOD بصورت ترکیبی بتواند تأثیر مناسبی در فعالیت‌های متابولیکی علیه ROSها نشان دهند. ارتباط‌های پیوسته سوبسترا و محصولات آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در مکانیسم پاکسازی ROSها دلیل قانع کننده‌ای بر این فرضیه می‌باشد. بنابراین جهت اثبات این فرضیه، مطالعات آینده نیازمند تعیین تأثیر استفاده از سطوح ترکیبی مناسب آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی در فرآیند انجماد منی گاو نر می‌باشد.

## نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن ۵ میلی مولار GSH به رقیق کننده تریس-زرده تخم مرغ پیش از انجماد منی گاو نژاد سیمنتال و تا حدودی ۷/۵ میلی مولار GSH میزان پراکسید شدن چربی‌های غشاء اسپرم را کاهش داده و فعالیت آنزیم GPx را افزایش می‌دهد. احتمال می‌رود که بهبود این دو پارامتر با یکدیگر ارتباط داشته باشد. ممکن است مقاومت به انجماد اسپرم‌های نژادهای مختلف به علت تفاوت در الگوهای فراساختاری آنها از یکدیگر باشد؛ بطوریکه در این تحقیق پاسخ‌های یکسانی در هر یک از تیمارها بر پارامترهای ارزیابی شده پس از یخ‌گشایی آنها بدست نیامد.

## تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری صمیمانه مدیریت و کلیه کارکنان مرکز اصلاح نژاد شمال غرب و غرب کشور، استان آذربایجان شرقی بویژه آقایان مهندس حسن علیخانی و مهندس ایرج غفاری به دلیل مساعدت‌های بی‌دریغ‌شان در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

Agarwal, A., Makker, K. and Sharma, R., 2007. Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update. American Journal of Reproductive Immunology. 59(1): 2-11.

Agarwal, A. and Saleh, R.A., 2002. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urologic Clinics of North America. 29(4): 817-827.

Aitken, R.J., 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reproduction Fertility and Development. 7(4): 659-668.

Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D ,.Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z. and Irvine, D.S., 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biology of Reproduction. 59(5): 1037-1046.

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

Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S., 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Veterinary Medicine International. 10: 1-7.

Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V. and 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.

Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Gagnon, C. and Sirard, M.A., 2001. Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology. 56(2): 275-286.

Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Cormier, N. and Sirard, M.A., 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. Theriogenology. 57(3): 1105-1122.

Bilodeau, J.F., Chatterjee, S., Sirard, M.A. and Gagnon, C., 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Molecular Reproduction and Development. 55(3): 282-288.

Bucak, M.N., Ateşşahin, A. and Yüce, A., 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. Small Ruminant Research. 75(2): 128-134.

de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H. and Gagnon, C., 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. Reviews of Rreproduction. 2: 48-54.

Devroey, P. and Steirteghem, A., 2004. A review of ten years experience of ICSI. Human Reproduction Update. 10(1): 19-28.

Franco, J.G. and Baruffi, R.L., 2002. Introduction to methods for collecting human gametes in assisted reproduction. Reproductive Biomedicine Online. 5(2):187-197.

Gadea, J., Gumbao, D., Cánovas, S., García-Vázquez, F.A., Grullón, L.A. and Gardón, J.C., 2008. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. International Journal of Andrology. 31(1): 40-49.

Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M.A., Garcia-Vazquez, F.A. and Gardon, J.C., 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. Cryobiology. 62(1): 40-46.

Gadea, J., Sellés, E., Marco, M.A., Coy, P., Matás, C., Romar, R. and Ruiz, S., 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. Theriogenology. 62(3): 690-701.

Gonçalves, F.S., Barretto, L.S., Arruda, R.P., Perri, S.H. and Mingoti, G.Z., 2010. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. Reproduction in Domestic Animals. 45(1): 129-135.

Hafez, E.S., Goff, L., Hafez, B., 2004. Mammalian fertilization, IVF, ICSI: physiological/molecular parameters, clinical application. Arhives of Andrology. 50(2): 69-88.

Hammerstedt, R.H., Graham, J.K. and Nolan, J.P., 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. Journal of Andrology. 11(1): 73-88.

Hu, J.H., Zhao, X.L., Tian, W.Q., Zan, L.S. and Li, Q.W., 2011. Effects of vitamin E supplementation in the extender on frozen-thawed bovine semen preservation. Animal. 5(1): 107-112.

Jeulin, C., Soufir, J.C., Weber, P., Laval-Martin, D. and Calvayrac, R., 1989. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. Gamete Research. 24(2): 185-196.

Jones, R., Mann, T. and Sherins, R., 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. Fertility and Sterility. 31(5): 531.-537.

Lasso, J.L., Noiles, E.E ,.Alvarez, J.G. and Storey, B.T., 1994. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. Journal of Andrology. 15(3): 255-265.

Martínez, C.O., Juárez-Mosqueda, M.L., Hernández, J. and Valencia, J., 2006. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. Theriogenology. 66(8): 1969-1975.

Maxwell, W.M.C. and Watson, P.F., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. Animal Reproduction Science. 42: 55-65.

Michael, A.J., Alexopoulos, C., Pontiki, E.A., Hadjipavlou-Litina, D.J., Saratsis, P., Ververidis, H.N. and Boscos, C.M., 2009 . Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Animal Reproduction Science. 112(1): 119-135.

Misra, H.P. and Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. The journal of Biological Chemistry. 247: 3170-3175.

Ohkawa, H., Ohishi N. and Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry. 95(2): 351-358.

Paglia, D.E. and Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 70(1): 158-169.

Perumal, P., Selvaraju, S., Selvakumar ,S., Barik, A.K., Mohanty, D.N., Das, S., Das, R.K. and Mishra, P.C., 2011. Effect of Pre-freeze Addition of Cysteine Hydrochloride and Reduced Glutathione in Semen of Crossbred Jersey Bulls on Sperm Parameters and Conception Rates. Reproduction in Domestic Animals. 46(4):636-641.

Roca, J., Rodriguez, M.J., Gil, M.A., Carvajal, G., Garcia, E.M., Cuello, C., Vazquez, J.M. and Martinez, E.A., 2005. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. Journal of Andrology. 26(1): 15-24.

SarIözkan, S., Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Ulutas, P.A. and Bilgen, A., 2009. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. Cryobiology. 58(2): 134-138.

Shoae, A. and Zamiri, M.J., 2008. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. Animal Reproduction Science. 104(2): 414-418.

Sikka, S.C., 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Frontiers in Bioscience. 1: e78-86.

Sikka, S.C., Rajasekaran, M. and Hellstrom, W.J., 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. Journal of Andrology. 16(6): 464-468.

Stradaioli, G., Noro, T., Sylla, L. and Monaci, M., 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. Theriogenology. 67(7): 1249-1255.

Thomson, L.K., Fleming, S.D., Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., Zieschang, J.A. and Clark, A.M., 2009. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Human Reproduction. 24(9): 2061-2070.

Wang, A.W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D.J. and Loughlin, K.R., 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. Urology. 49(6): 921-925.

Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal reproduction science. 60: 481-492.

White, I.G., 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation :a review. Reproduction, Fertility and Development. 5(6): 639-658.

Zhao, Y. and Buhr, M.M., 1995. Cryopreservation extenders affect calcium flux in bovine spermatozoa during a temperature challenge. Journal of Andrology. 16(3): 278-285.