Journal of Cell and Tissue 14(2), Summer (2023) 107-115

Journal of Cell and Tissue
http://jct.araku.ac.ir

Improving the quality of ram epididymal sperm by adding rutin antioxidant during storage 48 hours after cooling

Mohammadi H [a], Najafi A[b*]

[a] Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Environmental Sciences, University of Arak, Markazi, Iran
[b] Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Science, Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Tehran, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Mohammadi H a, Najafi A. Improving the quality of ram epididymal sperm by adding rutin antioxidant during storage 48 hours after cooling. Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(2):107-116

https://10.52547/JCT/14.2.107

KEYWORDS

Antioxidant,
Cooling,
Ram,
Rutin,
Sperm

ABSTRACT

Aim: The sperm membrane is rich in unsaturated fatty acids, which is very sensitive to the damage caused by ROS as a result of lipid peroxidation. Using suitable antioxidants in semen extenders can reduce the level of ROS. Rutin is a naturally occurring antioxidant polyphenolic flavonoid with powerful radical scavenging and lipid peroxidation inhibition properties. However, no studies have investigated the potential impact of rutin supplementation in cooling preservation of ram epididymal sperm. The current research was aimed to compare different concentrations of rutin antioxidant in the cooling process.

Material and methods: In this experimental study, testes of mature rams were collected from a local slaughterhouse and transferred to the laboratory within 1 hours in saline (0.9% NaCl) solution. In the laboratory, the epididymis was separated from the testis and cleaned from any connective tissues and blood vessels. For sperm recovery, the cauda epididymis was trimmed with a scalpel and epididymal sperm was obtained by cutting into small pieces in 5 ml of tris base extender pre-warmed at 37°C and incubated for 10 min to allow sperm swim out. The diluted sperm samples were divided into five equal experimental groups including: 1) tris base extender (Control), 2) extender containing 0.5 mM rutin, 3) extender containing 0.75 mM rutin, 4) extender containing 1 mM rutin, and 5) extender containing 1.25 mM rutin. The sperm samples were cooled gradually from 37°C to 4°C in 2 hours and held at 4°C. Sperm motility, viability, membrane integrity and lipid peroxidation were evaluated after extension (0 h) and at 24 and 48 hours of storage. The motility, viability, membrane integrity and morphology of sperm samples were evaluated immediately after extension (0 h) and at 24 and 48 h of storage at 4°C. The sperm motion kinematics were objectively evaluated by using the

* Corresponding author. Tel.: 021-36040907 Fax: 02136040730
E-mail address: abozar.najafi@ut.ac.ir
DOI: : https://10.52547/JCT/14.2.107
Received: 2 Feb. 2023; Received in revised form: 16 Jul. 2023; Accepted: 19 Jul. 2023
Original Article
© Author

computer-assisted sperm analysis (CASA) system. The eosin-nigrosin staining technique was applied to evaluate viability. The hypo-osmotic swelling test (HOST) was performed to assess membrane integrity. Sperm morphology was determined by staining sperm smears with Hancock's solution. Lipid peroxidation was evaluated by measuring malondialdehyde (MDA) concentration.

Results: The data obtained from this experiment show that after 24 and 48 hours of cooling, the addition of rutin antioxidant at a concentration of 0.75 and 1 mM causes a significant increase in total motility, progressive motility and straight path velocity. The results of the present study show that experimental treatments at 0, 24 and 48 hours after cooling have no effect on VAP, VCL and STR. The results of this experiment show that after 24 and 48 hours of cooling, the addition of rutin antioxidants at concentrations of 0.75 and 1 mM significantly increases the viability and integrity of the membrane. Also, the results show that the experimental treatments reduce the amount of MDA. The results show that the applied treatments have no effect on sperm morphology.

Conclusion: The results show that using rutin antioxidant in concentrations of 0.75 and 1 mM improves the quality of ram sperm.

سلول و بافت، دوره ۱۴، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲، صفحات ۱۰۷ تا ۱۱۵

سلول و بافت

بهبود کیفیت اسپرم اپیدیدیمی قوچ با افزون آنتی‌اکسیدان روتین طی نگه‌داری ۴۸ ساعت بعد از سردسازی

حسین محمدی[۱]، ابوذر نجفی[۲]*

۱-استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، مرکزی، ایران

۲- استادیار، گروه علوم دام و طیور، دانشکده فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

واژگان کلیدی

اسپرم، آنتی‌اکسیدان، روتین، سردسازی، قوچ

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۳

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۴/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۲۸

چکیده

هدف: غشای اسپرم سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع است که نسبت به آسیب به‌وجود آمده توسط ROS در نتیجه پراکسیداسیون چربی‌ها بسیار حساس می‌باشد. استفاده از آنتی‌اکسیدان مناسب در رقیق‌کننده‌های منی می‌تواند سطح ROS را کاهش دهد. پژوهش حاضر در جهت مقایسه غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان روتین در فرآیند سردسازی اسپرم قوچ بود.

مواد و روش‌ها: بعد از فراوری ا سپرم اپی‌دیدمی پارامترهای جنبایی (CASA)، یکپارچگی غ شا (HOST)، زنده‌مانی، پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) در زمان‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از سردسازی مورد ارزیابی قرار گرفتند. **نتایج:** داده‌های حاصل از این آزمایش نشان دهنده آن است که در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از سردسازی افزون آنتی‌اکسیدان روتین در غلظت ۰/۷۵ و ۱ میلی مولار باعث افزایش معنی‌دار جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده و سرعت در مسیر مستقیم می‌شود. نتایج پژوهش حاضر نشان دهنده آن است که تیمارهای آزمایشی در زمان صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از سردسازی تاثیری روی VAP، VCL و STR ندارد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان دهنده آن است که در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از سردسازی افزون آنتی‌اکسیدان روتین در غلظت ۰/۷۵ و ۱ میلی مولار باعث افزایش معنی‌دار زنده‌مانی، یکپارچگی غشا می‌شوند. همچنین نتایج نشان دهنده‌ی آن است که تیمارهای آزمایشی باعث کاهش میزان MDA می‌شوند. نتایج گویای آن است که تیمارهای اعمال شده تاثیری در مورفولوژی اسپرم ندارد. **نتیجه‌گیری**: نتایج نشان دهنده‌ی آن است که استفاده از آنتی‌اکسیدان روتین در غلظت‌های ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار باعث بهبود کیفیت اسپرم قوچ می‌شود.

۱- مقدمه

معمولا اسپرم طی نگه‌داری در شرایط سرمایی با کاهش خواص حیاتی خود مثل جنبایی و زنده‌مانی روبرو می‌شود که این امر می‌تواند یک عامل نامطلوب در توسعه تلقیح مصنوعی باشد. آسیب‌های ساختاری و غیر ساختاری غشا به‌علت نگه‌داری در دمایی

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۱-۳۶۰۴۰۹۰۷؛ فکس: ۰۲۱۳۶۰۴۰۷۳۰

آدرس پست الکترونیک: abozar.najafi@ut.ac.ir

بسیار پایین، نقص‌های ریخت‌شناسی و غیرطبیعی بودن آکروزوم می‌توانند از عوامل عمده پایین‌تر بودن کیفیت اسپرم‌های نگه‌داری شده در دماهای پایین باشند (۳-۱).

در پرورش گوسفند، تلقیح مصنوعی ابزار مهمی برای بهبود نژاد است. تلقیح مصنوعی که با استفاده از مایع منی رقیق شده تازه یا سرد شده انجام می‌شود. اخیرا، مطالعاتی که استفاده از مایع منی قوچ را در مدت زمان کوتاهی پس از جمع‌آوری برای تلقیح مصنوعی، برای جلوگیری از آسیب‌های ناشی از انجماد/ذوب شدن اسپرم مورد بررسی می‌کنند قرار داده‌اند که نتایج این آزمایشات نشان می‌دهد که استفاده از مایع منی سرد و رقیق شده یک جایگزین عملی خواهد بود. تقویت کننده‌های مختلف با زرده تخم مرغ، لسیتین سویا و پایه‌های شیر برای محافظت از سلول‌های اسپرم در برابر صدمات در طول پردازش یا انجماد استفاده می‌شود (۴, ۵).

با این‌حال، ذخیره سازی مایع یا فرآیند انجماد-ذوب نیز باعث ایجاد اختلالات فیزیکی و بیوشیمیایی در غشای اسپرم گونه‌های مختلف حیوانات می‌شود که منجر به کاهش تحرک و زنده ماندن اسپرم، آسیب غشا و از دست دادن یکپارچگی DNA و واکنش زودرس آکروزوم منجر به کاهش لقاح می‌شود. علاوه بر این، پردازش اسپرم پستانداران باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود و به دلیل تغییرات ایجاد شده در غشای پلاسمایی اسپرم، تاثیر مخربی بر تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی آکروزومی و توانایی لقاح اسپرم دارد. به‌منظور غلبه بر این اختلالات، افزودنی‌های مختلفی به مایع منی رقیق‌شده با رقیق‌کننده‌های مختلف در طول نگه‌داری اسپرم اضافه شده است (۶, ۷).

روتین (RUT) یک گلیکوزید فلاونول است که از فلاونول کوئرستین و دی ساکارید روتینوز تشکیل شده است. ثابت شده است که آن‌ها آنتی‌اکسیدان‌های قوی هستند و خواص بیولوژیکی، و دارویی مهمی دارند. به‌عنوان مثال، RUT دارای فعالیت‌های ضد تومور، ضدالتهابی، ضد جهش‌زایی، ضدویروسی و تعدیل کننده ایمنی است. علاوه بر این، خواص دفاعی آنتی‌اکسیدانی RUT در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از مواد شیمیایی در چندین مدل تجربی نشان داده شده است. مشاهده‌شده است که روتین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، روتین می‌تواند با اتصال به یون آهن، از اتصال آن به پراکسید هیدروژن جلوگیری نموده و با این کار سبب مهار تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (۸). در تحقیقات نشان داده‌شده است که روتین نقش موثری در کاهش اثرات اکسیداتیو دارد (۹). تا به حال مطالعه‌ای روی آنتی‌اکسیدان روتین روی سردسازی اسپرم قوچ صورت نگرفته است. در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدان روتین بر کیفیت اسپرم قوچ مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش بیضه قوچ تازه کشتار شده جمع‌آوری و به‌همراه یخ به آزمایشگاه بیولوژیکی تولیدمثل منتقل شدند. سپس قسمت دم اپی‌دیدیم از بافت بیضه جدا شد. پس از ایجاد چند برش طولی در بافت آن، بخش‌های جدا شده درون پتری دیش حاوی محیط تریس به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. سپس اپی‌دیدیم از ظرف خارج شده و محلول باقی‌مانده (محیط تریس و اسپرم) با سرعت ۷۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۶ دقیقه سانتریفوژ شد (۱۰). مایع بالای رسوب، برداشت شده و اسپرم اپی‌دیدیمی به‌دست آمد. اسپرم اپی‌دیدیمی به‌دست آمده در تمام مراحل ارزیابی پیش از سردسازی در حمام آب گرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه اسپرم با غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان روتین (۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵) بر پایه رقیق‌کننده تریس رقیق شدند. سپس در زمان‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از رقیق‌سازی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جنبایی: اولین فراسنجه ارزیابی در این تحقیق، بررسی جنبایی اسپرم پس از فرایند سردسازی بود. جنبایی اسپرم با استفاده از سامانه کامپیوتری ارزیابی اسپرم (CASA) ارزیابی شد (۱۱). برای این منظور از سیستم CASA ، مدل video test sperm 3.1 کالیبره شده استفاده شد. با استفاده از سمپلر متغیر ۳ تا ۵ میکرولیتر از نمونه بر روی لام گذاشته شده و با گذاشتن یک لامل تمیز بر روی آن، جنبایی اسپرم با استفاده از CASA ارزیابی شد.

یکپارچگی غشا: در این مطالعه برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از تست‌هاست استفاده شد. ده میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاست که حاوی فروکتوز و سیترات سدیم بود، اضافه شد. سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل سه قطره (۱۰ میکرولیتر) از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست بررسی شد. بررسی میکروسکوپ (Labomed LX400, CA, USA) با استفاده از یک صفحه داغ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با بزرگنمایی ۴۰۰ صورت گرفت. در هر گروه تیماری، حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های با دم گره خورده (اسپرم با یکپارچگی غشا) نسبت به گره نخورده محاسبه و گزارش شد (۱۲).

زنده‌مانی: برای ارزیابی زنده‌مانی، از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. برای این رنگ‌آمیزی ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم را برداشته و روی لام قرار داده شد. ۱۰ میکرولیتر از رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین برداشته و روی نمونه ریخته و با سر سمپلر به‌آرامی نمونه را هم زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. سپس با یک لام دیگر به‌آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک‌شدن، لام را زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ قرار داده و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد (۱۳).

اسپرم غیرطبیعی: برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول هانکوک افزوده شده و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شده و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فاز کنتراست اسپرم‌های غیرطبیعی محاسبه شد (۱۴).

اندازه‌گیری غلظت *MDA*: اندازه‌گیری غلظت MDA با تیوباربیوتوریک اسید (TBA) یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها است. یک میلی‌لیتر از هر نمونه منی با یک میلی‌لیترEDTA ، یک میلی‌لیتر BHT و دو میلی‌لیتر TCA با هم مخلوط شده و به‌داخل لوله‌های مخروطی ریخته شدند. لوله مخروطی در 1200 g برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ شدن، یک میلی‌لیتر از محلول بالای لوله مخروطی با یک میلی‌لیتر TBA در میکروتیوب آمیخته شدند. لوله مخروطی برای مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار خواهند گرفت. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شد و سپس جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر (با اسپکتروفتومتر) اندازه‌گیری شد. جذب نوری نمونه‌های مختلف یادداشت شدند و در پایان، غلظت MDA (نانو مول در میلی‌لیتر) محاسبه شد (۱۵).

۳- آنالیز آماری: این آزمایش ۷ مرتبه تکرار شد. داده‌های حاصل در قالب طرح کاملا تصادفی و بر اساس مدل‌های آماری زیر به‌کمک رویه GLM نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون Tukey انجام گرفت.

۴- نتایج

نتایج پژوهش حاضر نشان دهنده آن است که تیمارهای آزمایشی در زمان صفر تاثیری روی پارامترهای جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده و سرعت در مسیر مستقیم ندارد (جدول ۱). نتایج حاصل از این آزمایش نشان دهنده آن است که در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از سردسازی افزون آنتی‌اکسیدان روتین در غلظت ۰/۷۵ و ۱ میلی مولار باعث افزایش معنی‌دار جنبایی کل، جنبایی

پیش‌رونده و سرعت در مسیر مستقیم شد (جدول ۱).

جدول ۱: تاثیر افزودن آنتی‌اکسیدان روتین به مایع منی اسپرم قوچ بر پارامترهای جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده و سرعت در مسیر مستقیم

	جنبایی کل (%)			جنبایی پیش‌رونده (٪)			سرعت در مسیر مستقیم (VSL)		
	۰	۲۴	۴۸	۰	۲۴	۴۸	۰	۲۴	۴۸
۰	۸۶/۴	۵۸/۹^{b}	۲۶/۹^{b}	۵۴/۴	۲۴/۱^{b}	۱۲/۸^{b}	۵۸/۵	۳۸/۲^{b}	۲۱^{b}
۰/۵	۸۸/۳	۶۱/۵^{b}	۲۷/۱^{b}	۵۷/۷	۲۶/۶^{b}	۱۳/۹^{b}	۶۰/۳	۴۰/۴^{b}	۲۳/۳^{b}
۰/۷۵	۹۰/۴	۷۰/۲^{a}	۳۶/۸^{a}	۵۵/۶	۳۵/۱^{a}	۲۱/۴^{a}	۶۲/۱	۵۰/۱^{a}	۲۷/۴^{a}
۱	۸۹/۵	۶۹/۳^{a}	۳۵/۵^{a}	۵۵	۳۴/۶^{a}	۲۰/۳^{a}	۶۰/۹	۴۹/۳^{a}	۲۶/۷^{a}
۱/۲۵	۸۸/۶	۵۸/۲^{b}	۲۵/۹^{b}	۵۶/۸	۲۳/۸^{b}	۱۲/۳^{b}	۵۷/۱	۳۷/۹^{b}	۲۰/۹^{b}
SEM	۲/۷	۱/۵	۱/۳	۱/۸	۲/۴	۱/۶	۲/۴	۱/۳	۱/۱

SEM : خطای استاندارد میانگین‌ها. حروف غیر مشابه در یک ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P/۰۵>۰)

نتایج پژوهش حاضر نشان دهنده آن است که تیمارهای آزمایشی در زمان صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از سردسازی تاثیری روی VAP، VCL و STR نداشت (جدول ۲).

جدول ۲: تاثیر افزودن روتین آنتی‌اکسیدان به مایع منی اسپرم قوچ بر پارامترهای **VAP**، **VCL** و **STR**

	VAP (µm/s)			VCL (µm/s)			STR (%)		
	۰	۲۴	۴۸	۰	۲۴	۴۸	۰	۲۴	۴۸
۰	۶۸/۸	۵۰/۴	۳۹/۱	۱۲۶/۵	۱۱۱/۲	۹۰/۲	۷۹/۹	۷۱/۷	۴۹/۷
۰/۵	۶۹/۹	۵۱/۶	۴۰/۱	۱۲۸/۶	۱۱۲/۷	۹۲/۵	۷۹/۱	۷۴/۲	۵۴/۱
۰/۷۵	۷۱/۲	۶۰/۳	۴۴/۳	۱۲۹/۴	۱۱۶/۴	۹۴	۸۱/۲	۷۹/۱	۵۷/۸
۱	۷۰/۴	۵۹/۵	۴۳/۹	۱۲۸/۹	۱۱۵/۷	۹۳/۴	۸۰/۶	۷۸/۸	۵۶/۸
۱/۲۵	۶۹/۷	۴۹/۱	۳۸/۴	۱۲۷/۴	۱۱۰/۳	۸۹/۶	۷۸/۳	۷۳/۱	۵۰/۴
SEM	۳/۴	۱/۱	۲/۹	۴/۲	۲/۶	۲/۸	۳/۷	۱/۹	۳/۴

SEM : خطای استاندارد میانگین‌ها. STR؛ راستی مسیر طی شده (درصد) VCL؛ سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر بر ثانیه)، VAP؛ میانگین سرعت در مسیر (میکرومتر بر ثانیه)، VSL؛ سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر بر ثانیه). حروف غیر مشابه در یک ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P<0/05)

همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده آن است که تیمارهای آزمایشی در زمان صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از سردسازی تاثیری روی ALH، BCF و LIN نداشت (جدول ۳).

جدول ۳: تاثیر افزودن آنتی‌اکسیدان روتین به مایع منی اسپرم قوچ بر پارامترهای **LIN**، **BCF** و **ALH**

	LIN			BCF			ALH		
	۰	۲۴	۴۸	۰	۲۴	۴۸	۰	۲۴	۴۸
۰	۴۹/۳۲	۴۲/۳	۴۰/۳	۲۲/۵	۱۶/۵	۱۲/۸	۸/۲	۶/۶	۵/۴
۰/۵	۵۱/۴	۴۲/۷	۴۱/۳	۲۳/۳	۱۷/۲	۱۳/۲	۷/۹	۶/۳	۵/۳
۰/۷۵	۵۲/۳	۴۸/۸	۴۴/۱	۲۴/۳	۱۸/۳	۱۴/۵	۷/۶	۵/۹	۴/۹
۱	۵۱/۸	۴۸/۴	۴۴	۲۳/۸	۱۸/۱	۱۴/۳	۷/۷	۶/۱	۵
۱/۲۵	۴۹/۲	۴۱/۶	۳۹/۸	۲۲/۳	۱۶/۴	۱۲/۶	۷/۹	۶/۸	۵/۵
SEM	۲/۵	۲/۷	۱/۹	۱/۸	۰/۹	۰/۸	۰/۳	۰/۴	۰/۲

SEM : خطای استاندارد میانگین‌ها. LIN: درصد خطی بودن جنبایی ALH؛ جنبایی عرضی سر (میکرومتر)، BCF؛ تناوب عرضی زنش (هرتز). حروف غیر مشابه در یک ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P<0/05).

نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده آن است که تیمارهای آزمایشی در زمان صفر تاثیری روی پارامترهای زندمانی، یکپارچگی غشا و مالون دی‌آلدئید ندارد (جدول ۴). نتایج حاصل از این آزمایش نشان دهنده آن است که در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از سردسازی افزون آنتی‌اکسیدان روتین در غلظت ۰/۷۵ و ۱ میلی مولار باعث افزایش معنی‌دار زندمانی، یکپارچگی غشا شد. همچنین نتایج نشان دهنده آن است که تیمارهای آزمایشی باعث کاهش میزان MDA می‌شوند. نتایج گویای آن است که تیمارهای اعمال شده تاثیری در مورفولوژی اسپرم نداشت (جدول ۴).

جدول ۴: درصد قابلیت زنده‌مانی اسپرم، یکپارچگی غشاء، ناهنجاری کل، و پراکسیداسیون لیپید (اندازه‌گیری مالون دی آلدئید، MDA) در مایع منی قوچ سرد شده پس از افزودن غلظت‌های مختلف روتین در رقیق‌کننده مایع منی

	یکپارچگی غشاء(%)			ناهنجاری کل(%)			زنده‌مانی(%)			MDA		
	۰	۲۴	۴۸	۰	۲۴	۴۸	۰	۲۴	۴۸	۰	۲۴	۴۸
۰/۵	۸۴/۲	۵۴/۷^{b}	۲۴/۱^{b}	۸/۹	۱۸/۵	۲۸/۱	۸۹/۶	۶۰/۶^{b}	۲۷/۳^{b}	۳/۲	۴/۲^{a}	۵/۶^{a}
۰/۷۵	۸۵/۵	۵۷/۵^{b}	۲۵/۶^{b}	۸/۵	۱۷/۴	۲۶/۴	۹۰/۵	۶۳/۴^{b}	۲۸/۸^{b}	۲/۹	۳/۸^{a}	۵/۳^{a}
۱	۸۷/۳	۶۹/۲^{a}	۴۳/۳^{a}	۷/۸	۱۵/۵	۲۳/۸	۹۳/۴	۷۴/۱^{a}	۳۷/۹^{a}	۲/۶	۲/۴^{b}	۳/۲^{b}
۱/۲۵	۸۶/۱	۶۸/۳^{a}	۳۲/۵^{a}	۸	۱۶/۲	۲۴/۵	۹۲/۱	۷۲/۵^{a}	۳۶/۵^{a}	۲/۷	۲/۶^{b}	۳/۴^{b}
۱/۲۵	۸۳/۳	۵۳/۱^{b}	۲۳/۸^{b}	۹/۱	۱۹/۳	۲۸/۳	۸۸/۳	۵۹/۴^{b}	۲۶/۶^{b}	۳/۱	۴/۳^{a}	۵/۸^{a}
SEM	۲/۹	۱/۷	۱/۳	۰/۹	۱/۹	۲/۶	۲/۳	۱/۴	۱/۲	۰/۳	۰/۲	۰/۴

SEM : خطای استاندارد میانگین‌ها. حروف غیر مشابه در یک ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P<0/05).

۵- بحث

در آزمایش حاضر ما سعی کردیم تاثیر مستقیم روتین بر روی اسپرم را از بسیاری از جهات مختلف بررسی کنیم. ثابت شده است که افزودن روتین در غلظت ۰/۷۵ میلی‌مول باعث حفظ اسپرم، از لحاظ تحرک و زنده‌مانی می‌شود. روتین اثر آنتی‌اکسیدانی

روی غشاهای لیپیدی دارد. این اثر را می‌توان به خواص ضد رادیکال آزاد آن نسبت داد (۱۶).

زمان طولانی ذخیره منی، تحرک و توان زنده‌مانی اسپرم‌ها را به‌تدریج کاهش می‌دهد و اضافه کردن مکمل روی به‌میزان کافی به رقیق‌کننده، به حفظ کیفیت منی کمک می‌کند در منی بدون مکمل، بعضی اسپرم‌ها این فرآیند را تحمل نکرده از بین می‌روند. خیلی از اسپرم‌ها طی فرآیند سردسازی آسیب می‌بینند که به کاهش درصد اسپرم‌های متحرک به جلو، اسپرم‌های زنده و اسپرم‌های با آکروزوم یکپارچه منجر می‌شود، توان آنتی‌اکسیدانی تام منی کاهش‌یافته سلول‌های با DNA آسیب‌دیده افزایش می‌یابد (۱۷, ۱۸).

تحرک اسپرم مهم‌ترین فراسنجه ارزیابی کیفیت منی و بررسی قدرت باروری حیوان نر است. تنش سرمایی به‌شدت فعالیت تنفس سلولی، توانایی سنتز ATP و تحرک سلول اسپرم را کاهش و به نفوذپذیری انتخابی غشاء اسپرم نسبت به کلسیم آسیب رسانده و منجر به افزایش سطح کلسیم درون‌سلولی و نکروز اسپرم می‌شود (۱۹).

نتایج ما نشان می‌دهد که حضور ۰/۷۵ میلی‌مول روتین در طی سردسازی اسپرم قوچ در مقایسه با گروه شاهد اثر مثبتی بر جنبایی کل اسپرم‌ها داشت. در مطالعه‌ای اثر آنتی‌اکسیدانی روتین مورد بررسی قرار دادند، نتایج این آزمایش نشان دهنده آن است که پارامترهای جنبایی اسپرم پس از ذوب، از جمله VCL، VSL، به‌طور قابل‌توجهی در اکستندرهای مکمل شده با روتین افزایش یافت، به خصوص روتین ۰/۷۵ میلی مولار اثر محافظتی بهتری نسبت به سایر گروه‌ها در این مطالعه نشان داده بود. جالب توجه است که افزایش دوزهای روتین همچنین اثر محافظتی بر روی پارامترهای جنبایی اسپرم انجماد نشان داد، که نشان می‌دهد روتین یک آنتی‌اکسیدان با اثر سمی پایین‌تر است. غلظت بالای روتین (۱/۲۵ میلی مولار) هیچ اثر بهبودی قابل‌توجهی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی اسپرم نداشت. ممکن است تصور شود که محیط لیپیدی جدید به‌دلیل غلظت بالای روتین ایجاد شده است و پراکسیداسیون لیپیدی ممکن است همچنان دلیلی برای آسیب اسپرم و کاهش کیفیت اسپرم باشد (۲۰).

این مطلب توضیح احتمالی این موضوع است که چرا روتین در غلظت ۱/۲۵ میلی‌مول نمی‌تواند باعث حفظ تحرک و زنده‌مانی اسپرم شود. به‌علت این‌که نمی‌تواند بین ROS و آنتی‌اکسیدان تعادل ایجاد کند. همان‌طور که قبلا اشاره شد، ROS در مقادیر کم، برای عملکرد مناسب سلول، نیاز است، اما روتین با حذف بیش از حد رادیکال‌های آزاد، باعث کاهش میزان تحرک اسپرم می‌شود. علاوه بر این، روتین در غلظت ۱/۲۵ میلی‌مول از PUFA غشا از اثر مضر ROS محافظت نمی‌کند. به احتمال زیاد، مقادیر کم و کنترل هیدروکسی اکسیدهای چربی (تولید شده توسط متابولیسم PUFAs) برای حفظ جریان غشا ضروری است (۲۱). پراکسیداسیون لیپید می‌تواند باعث اکسیداسیون پروتئین شود که منجر به از دست رفتن جنبایی می‌شود. بنابراین سطوح بالای MDA با پارامترهای تحرک اسپرم و توانایی نفوذ اسپرم به ZP ارتباط منفی دارد. برعکس سطح ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مول روتین برای سلول‌ها مفید بود، زیرا اسپرم‌ها از LPO محافظت می‌شدند. اکسو و همکاران (۲۲) نشان داد که پتانسیل آنتی‌اکسیدانی روتین آسیب اسپرم را کاهش می‌دهد).

یکی از دلایل کاهش زنده‌مانی تاثیر رادیکال‌های آزاد بر ساختار غشا و همچنین تنش سرمایی می‌باشد (۲۳). اسپرم به پراکسیداسیون چربی که درنتیجه اکسیداسیون چربی‌های غشا توسط گونه‌های فعال اکسیژن از قبیل رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و هیدروکسیل رخ می‌دهد، بسیار حساس است.

با وجود این‌که اکسیژن برای بقای موجودات لازم است، ولی در فرآیندهای احیا و تبدیل اکسیژن به آب، چندین ماده سمی مانند یون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل در بدن تولید می‌کند. این ترکیبات از سازه‌های اکسیدکننده

نیرومندی هستند و تهدیدی برای سلول‌های زنده بشمار می‌روند، زیرا می‌توانند سبب تخریب بخش‌های پروتئینی و لیپیدی سلول‌ها شوند (۲۴, ۲۵). درواقع، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می‌تواند سبب پراکسیداسیون پروتئین‌های غشا شود. غشای اسپرم شامل غلظت بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع است که وجود این اسیدهای چرب غیراشباع باعث حساسیت زیاد لیپیدهای غشای اسپرم به فرآیند پراکسیداسیون می‌شود (۲۶). عمل پراکسیداسیون به‌وسیله مولکول‌های اکسیژن سوپراکسید، پرکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل صورت می‌گیرد. پراکسیداسیون خودبه‌خودی لیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم پستانداران سبب تخریب ساختار و ماتریکس لیپیدی غشا در برابر گروه‌های فعال اکسیژن می‌شود که منجر به آسیب به اسپرم، کاهش جنبایی، سلامت غشا و باروری اسپرم، آسیب اکسیداتیو و تولید آلدئیدهای سمی می‌شود (۲۷). در مطالعه حاضر افزودن روتین باعث حفظ یکپارچگی غشای اسپرم در زمان سردسازی اسپرم قوچ شد.

۶- نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن آنتی‌اکسیدان روتین به مایع منی اسپرم گوسفند در زمان سردسازی اثرات مثبتی بر کیفیت اسپرم داشت. غلظت ۰/۷۵ میلی مولار روتین موجب افزایش معنی‌دار جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده و سرعت در مسیر مستقیم شد. همچنین غلظت ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار روتین باعث افزایش زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم و کاهش مالون دی آلدئید شد. به‌نظر می‌رسد روتین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، اثر محافظتی خود را از طریق حذف رادیکال‌های آزاد ناشی از سرما و نیز پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم اعمال می‌کند. با این‌حال، غلظت بالای روتین (۱/۲۵ میلی‌مولار) نتوانست تحرک و زنده‌مانی اسپرم را حفظ کند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که روتین در غلظت ۰/۷۵ تا ۱ میلی‌مولار می‌تواند در زمان سردسازی اسپرم گوسفند بر کیفیت اسپرم اثر مثبت داشته باشد. این اثر به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی روتین است که موجب کاهش آسیب اکسیداتیو به غشای اسپرم می‌شود.

۷- منابع

1. Falchi L, Galleri G, Dore GM, Zedda MT. et al. Effect of exposure to CeO2 nanoparticles on ram spermatozoa during storage at 4 degrees C for 96 hours. Reproductive biology and endocrinology: RB&E. 2018;16(1):19.

2. Mohit A, Mohammadi M. Effect of different levels of vitamins E and C on quality of diluted sperm of taleshi ram during storage at 5 °C. Journal of Veterinary Research. 2011;66(2):161-64.

3. Vodjgani M, Vojgani M, Niassari Naslaji A, Bahonar AR. et al. Influence of melatonin treatment on scrotal circumference and semen parameters in Shall rams on out of season. Journal of Veterinary Research. 2008;63(4):297-300.

4. Soltani L, Samereh S, Mohammadi T. Effects of different concentrations of zinc oxide nanoparticles on the quality of ram cauda epididymal spermatozoa during storage at 4 degrees C. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene. 2022.

5. Martinez-Fresneda L, Castano C, Boveda P, Tesfaye D. et al. Epididymal and ejaculated sperm differ on their response to the cryopreservation and capacitation processes in mouflon (Ovis musimon). Scientific reports. 2019;9(1):15659.

6. Shayestehyekta M, Mohammadi T, Soltani L, PooyanMehr M. Effect of different concentrations of melatonin on ram epididymal spermatozoa recovered post-mortem under oxidative stress conditions and storage at 4 degrees C. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene. 2022.

7. Daghigh Kia H, Olfati Karaji R. Effect of reduced glutathione and superoxide dismutase antioxidant levels on some of the characteristics of sperm after freezing bull semen. Journal of Veterinary Research. 2017;72(3):377-84.

8. Luo H, Jiang BH, King SM, Chen YC. Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. Nutr Cancer. 2008;60(6):800-9.

9. Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodriguez M, del Olmo E, Fernandez-Santos MR. et al. Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37 degrees C in presence of several antioxidants. Theriogenology. 2012;78(5):1005-19.

10. Alvarez M, Tamayo-Canul J, Martinez-Rodriguez C, Lopez-Uruena E. et al. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). Animal reproduction science. 2012;132(3-4):145-54.

11. Najafi A, Mehdipour M, Mohammadi H, Mehdipour Z. et al. Effect of tempol and straw size on rooster sperm quality and fertility after post-thawing. Scientific reports. 2022;12(1):12192.

12. Mehdipour M, Daghigh-Kia H, Najafi A, Mehdipour Z. et al. Protective effect of rosiglitazone on microscopic and oxidative stress parameters of ram sperm after freeze-thawing. Scientific reports. 2022;12(1):13981.

13. Nazari M, Daghigh-Kia H, Mehdipour M, Najafi A. Comparison of the performance of targeted mitochondrial antioxidant mitoquinone and non-targeted antioxidant pentoxifylline in improving rooster sperm parameters during freezing and thawing. Poultry science. 2022;101(9):102035.

14. Mehdipour M, Daghigh-Kia H, Najafi A, Martinez-Pastor F. Type III antifreeze protein (AFP) improves the post-thaw quality and in vivo fertility of rooster spermatozoa. Poultry science. 2021;100(8):101291.

15. Abdalkarim Salih S, Daghigh-Kia H, Mehdipour M, Najafi A. Does ergothioneine and thawing temperatures improve rooster semen post-thawed quality? Poultry science. 2021;100(10):101405.

16. Abarikwu SO, Njoku RC, John IG, Amadi BA. et al. Antioxidant and anti-inflammatory protective effects of rutin and kolaviron against busulfan-induced testicular injuries in rats. Systems biology in reproductive medicine. 2022;68(2):151-61.

17. Varesi S, Vernocchi V, Morselli MG, Luvoni GC. DNA integrity of fresh and frozen canine epididymal spermatozoa. Reproductive biology. 2014;14(4):257-61.

18. Izanloo H, Soleimanzadeh A, Bucak MN, Imani M. et al. The effects of varying concentrations of glutathione and trehalose in improving microscopic and oxidative stress parameters in Turkey semen during liquid storage at 5 degrees C. Cryobiology. 2021.

19. Mendoza N, Casao A, Del Valle I, Serrano E. et al. Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2012;880(1):74-81.

20. Xu D, Wu L, Yang L, Liu D. et al. Rutin protects boar sperm from cryodamage via enhancing the antioxidative defense. Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho. 2020;91(1):e13328.

21. Amorim EA, Graham JK, Spizziri B, Meyers M. et al. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology. 2009;58(2):210-4.

22. Aksu EH, Kandemir FM, Ozkaraca M, Omur AD. et al. Rutin ameliorates cisplatin-induced reproductive damage via suppression of oxidative stress and apoptosis in adult male rats. Andrologia. 2017;49(1).

23. Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. Animal reproduction science. 2000;62(1-3):77-111.

24. Zadeh Hashem E, Eslami M. Kinetin improves motility, viability and antioxidative parameters of ram semen during storage at refrigerator temperature. Cell and tissue banking. 2016.

25. Bucak MN, Keskin N, Taspinar M, Coyan K. et al. Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. Cryobiology. 2013;67(1):34-9.

26. Shahzad Q, Mehmood MU, Khan H, ul Husna A. et al. Royal jelly supplementation in semen extender enhances post-thaw quality and fertility of Nili-Ravi buffalo bull sperm. Animal reproduction science. 2016;167:83-8.

27. Zhang XG, Liu Q, Wang LQ, Yang GS. et al. Effects of glutathione on sperm quality during liquid storage in boars. Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho. 2016;87(10):1195-201.