نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۲، بهار ۱۳۹۸
ص‌ص: ۸۳~۹۲

مهار تولید ROS از طریق افزودن آنتی اکسیدان های هدفمند MitoQ و تأثیر آنها بر عملکرد اسپرم‌های منجمد–یخگشایی شده خروس

- **ناهید محمدی**
  دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی، فیزیولوژی دام دانشگاه تبریز
- **حسین دقیق‌کیا** (نویسنده مسئول)
  استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- **غلامعلی مقدم**
  استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- **آرش جوانمرد**
  استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- **مایک مورفی**
  استاد مرکز تحقیقات علوم بالینی، واحد زیست شناسی میتوکندری، دانشگاه کمبریج انگلستان

تاریخ دریافت : دی ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش : اردیبهشت ۱۳۹۷

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۰۸۹۴۳۱
Email: daghighkia@Tabrizu.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.116957.1603

چکیده

یکی از دلایل اصلی کاهش زنده‌مانی اسپرم منجمد، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد. از آنجائیکه انتخاب آنتی-اکسیدان‌ها برای مهار تولید ROS به دلیل عدم توانایی آنها در نفوذ به محل اصلی تولید ROS (میتوکندری) تاکنون کارایی خوبی در برنامه‌های انجماد اسپرم نداشته است؛ لذا، به منظور بررسی روش جدیدی برای مهار تولید ROS در فرایند انجماد اسپرم خروس از ۱٤ قطعه خروس (سویه تجاری راس) با ۲۸ هفته سن استفاده گردید. نمونه گیری سه بار در هفته به روش مالش پشتی-شکمی انجام شد نمونه‌های منی پس از ارزیابی اولیه با یکدیگر مخلوط شده و پس از رقیق‌سازی و افزودن ماده MitoQ[1] در پنج سطح (صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/٤ نانومولار) منجمد گردیدند. پس از یخ‌گشایی، شاخص‌های درصد زنده‌مانی، پارامترهای تحرک اسپرم، یکپارچگی‌غشای اسپرم، میزان لیپید پراکسیداسیون و مورفولوژی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SAS انجام شد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که افزودن MitoQ در سطوح ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ نانومولار به محیط انجماد اسپرم خروس، بطور معنی داریباعث افزایش میزان زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و درصداسپرم سالم شد. نتایج حاصل نشان داد که افزودن MitoQ در سطح ۰/۱ نانومولار سبب بهبود تحرک کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها نسبت به گروه شاهد و همچنین موجب کاهش معنی‌دارغلظت MDA نسبت به گروه شاهد شد.

واژه‌های کلیدی: میتوکندری، پراکسیداسیون چربی، آنتی‌اکسیدان هدفمند

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 122 pp: 83-92

Inhibition of ROS production by adding targeted antioxidants MitoQ and their effect on the performance of freeze-thawed rooster sperm

By: Nahid Mohammadi[1], Hossein Daghigh Kia[2]*, Gholamali Moghaddam[2], Arash Javanmard[3], Mike Murphy4
1: M.sc. Graduate student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
2: Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
3: Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
4: Helena Cocheme - MRC Clinical Sciences Centre, London, UK.

Received: January 2018 **Accepted: May 2018**

The main reason for the reduced viability of cryopreserved sperm is the production of active oxygen species (ROS). Since the selection of antioxidants to inhibit ROS production due to their inability to penetrate the original site of ROS production (mitochondria) has not been effective in sperm cryopreservation. Therefore, we investigated a new method for inhibiting Ros production in the cryopreservation of rooster sperm. In this study, 14 mature roosters (Ross commercial strain) with 28 weeks of age were used. Semen was collected three times a week using the dorso-abdominal massage method. Semen samples were evaluated for having the necessary standards. Then, they were pooled, diluted and supplemented with five levels of MitoQ (0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 nm) before cryopreservation. After freeze-thawing, the parameters of viability, sperm motility parameters, plasma membrane integrity, lipid peroxidation and sperm morphology were evaluated. Data analysis was done by SAS software. The results showed that addition of MitoQ at levels of 0.05, 0.1 and 0.2 nM to the rooster semen cryopreservation medium significantly increased survival, plasma membrane integrity and sperm morphology percentage. The results showed that, the addition of MitoQ at 0.1 nm improved total and progressive motility, viability, and plasma membrane integrity of sperms compared to the control group, and also significantly decreased MDA Level compared to the control group.

Key words: Mitochondria, Lipid peroxidation, targeted antioxidants

مقدمه

استفاده از اسپرم منجمد شده نقش بسیار مهمی در پیشرفت فناوری‌های اصلاح نژادی، تولید آزمایشگاهی رویان و تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم[1] داشته است. برای نیل به مزایای زیاد تلقیح مصنوعی، ذخیره‌سازی طولانی مدت منی امری ضروری می باشد. انجماد منی، تحول اساسی در نگهداری منی داشته و راهی برای حفظ پروتوپلاسم سلول جنسی است که می‌تواند با حفظ DNA گونه‌ها در دامپروری، آبزی‌پروری و حفظ تنوع زیستی کاربرد داشته باشد (BakhshayeshKhiabani و همکاران، ۲۰۱۷). بازده عملی انجماد اسپرم با موفقیت‌های مختلفی همراه بوده است (Fang و همکاران، ۲۰۱۴، Amaral و همکاران،۲۰۱۳). یکی از دلایل اصلی کاهش باروری اسپرم علاوه بر شوک سرمایی، تنش اکسیداتیو است که نقش مهمی در آسیب اسپرم در طول فرآیند انجماد دارد (Marti و همکاران، ۲۰۰۸، Laher ۲۰۱۴). غشای پلاسمایی اسپرم دارای اسیدهای چرب غیراشباع زیادی است که مستعد آسیب پراکسیداتیو بوده و این آسیب می‌تواند باعث کاهش یکپارچگی غشاء، آسیب به عملکرد

[1] Intra-Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI)

سلول، کاهش جنبایی و توانایی باروری اسپرم برای تلقیح مصنوعی شود (Safa و همکاران ۲۰۱۶؛ Wang و همکاران، ۲۰۱۵؛ Fang و همکارن، ۲۰۱۴). برای غلبه بر پراکسیداسیون طی محافظت انجمادی اعمال زیادی از جمله فرآوری تحت شرایط بی‌هوازی، افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها و استفاده از عوامل جفت جداکن‌های[2] میتوکندری استفاده می‌شود. برای به حداقل رساندن آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن[3]، استفاده از طیف وسیعی از آنتی‌اکسیدان‌ها در انجماد اسپرم ماهی، گاو، قوچ، بز، خوک، سگ و انجماد اسپرم انسان نتایج مفیدی داشته است. این افزودنی‌ها شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشند (Fang و همکاران، ۲۰۱۴). اگرچه آنتی‌اکسیدان‌ها در پژوهش‌های مختلف برای پیشگیری از تنش اکسیداتیو استفاده شده‌اند، اما اثرات مربوط به آنتی‌اکسیدان‌ها بسته به نوع آنتی‌اکسیدان، مقدار مورد استفاده و گونه مورد آزمون، متفاوت است (Grossfeld و همکاران، ۲۰۰۸). اخیراً محققین اعتقاد براین دارند که میتوکندری‌ها باید بطور مستقیم هدف آنتی‌اکسیدان‌ها قرار بگیرند (Jin و همکاران، ۲۰۱۴). میتوکندری از ۹۰ درصد اکسیژن برای فسفریلاسیون اکسیداتیو و تولید ATP استفاده می‌کند. بنابراین، پروتئین‌های درگیر در زنجیره انتقال الکترون محل‌های اصلی تولید ROS بشمار می‌آیند (Murphy and Smith، ۲۰۰۰؛ Graham و همکاران، ۲۰۰۹؛ Galley ۲۰۱۰؛ Fang و همکاران، ۲۰۱۴). غشای میتوکندری آسیب‌پذیرترین قسمت نسبت به ROS می‌باشد؛ زیرا در غشای میتوکندری کاردیولیپین حضور دارد که زودتر از هر فسفولیپید دیگری بوسیله ROS تجزیه می‌گردد. به همین دلیل ROS تولید شده در میتوکندری خطرناک‌تر از ROS تولید شده در سایر قسمت‌ها می‌باشد. بنابراین، جای تعجب نیست که این اندامک شروع کننده تنش اکسیداتیو است (Skulachev و همکاران، ۲۰۰۹). یکی از دلایل عدم اثر بخشی آنتی‌اکسیدان‌هایی که تا بحال مورد مطالعه قرار گرفته‌اند این است که آنتی‌اکسیدان‌ها در محل اصلی تولید ROS که در میتوکندری است، تجمع نمی‌یابند (Mukhopadhyay and Weiner، ۲۰۰۷). آنتی‌اکسیدان هدفمند MitoQ برای انتقال بخش آنتی‌اکسیدانی یوبی‌کینول[4] به میتوکندری طراحی شده است. MitoQ متشکل از یک کاتیون تری‌فنیل‌فسفونیوم است که به بخش آنتی‌اکسیدانی یوبی‌کینول متصل می‌باشد (Smithand Murphy، ۲۰۱۰). MitoQ به علت داشتن کاتیون تری‌فنیل‌فسفونیوم دارای بار مثبت بوده و غشای داخلی میتوکندری دارای بار منفی می‌باشد همین عامل سبب ورود MitoQ به ماتریکس میتوکندری گردیده سپس به سطح ماتریکس غشای داخلی میتوکندری جذب می‌شود که این امر سبب فعال شدن آنتی‌اکسیدان یوبی‌کینول می‌شود (Wang و همکارن، ۲۰۱۵). MitoQ با صرفه‌تر از آنتی اکسیدان‌های دیگر می‌باشد زیرا شکل اکسید آن می‌تواند با پذیرفتن الکترون از زنجیره تنفسی دوباره احیاء گردد (Skulachev و همکاران، ۲۰۰۹). عملکرد MitoQ در پیشگیری از آسیب‌های اکسیداتیو عبارتند از: مهارآپوپتوز، بلوکه کردن H_2O_2، مهار آزاد شدن سیتوکروم‌C، کاهش تولید ROS و کاهش پراکسیداسیون چربی می‌باشد. مطالعات نشان دادند که MitoQ در جلوگیری از آسیب اکسیداتیو میتوکندری چندصد برابر قوی‌تر از آنتی‌اکسیدان‌های غیرهدفمند عمل می‌کند(Galley، ۲۰۱۰؛ Yurin و همکاران، ۲۰۰۷). خواص آزمایشگاهی MitoQ بدلیل محافظت در برابر پراکسیداسیون چربی، کاهش محتوای کربونیل پروتئین، کاهش سطوح ROS و محافظت از آپوپتوز می‌باشد (Smith and Murphy، ۲۰۱۰). MitoQ تکه تکه شدن میتوکندری را کاهش می‌دهد و از پیشرفت آبشار آپوپتوز جلوگیری می‌کند (Skulachevو همکاران، ۲۰۰۹). هدف از این مطالعه شناسایی روشی است که با هدف قرار دادن میتوکندری، تولید ROS را کاهش و زنده‌مانی پس از یخ‌گشایی را در اسپرم منجمد شده خروس افزایش دهد.

[2] Uncoupling

[3] Reactive oxygen species (ROS)

[4] Ubiquinol

مواد و روش‌ها

حیوانات و طراحی آزمایش

پژوهش حاضر، در ایستگاه تحقیقاتی و پژوهشی خلعت پوشان دانشگاه تبریز انجام پذیرفت. بدین منظور، در این آزمایش از ۱۴ خروس نژاد راس (۳۰۸) با ۲۸ هفته سن استفاده شد. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی به ابعاد ۸۵ × ۷۰ ×۷۰، تحت شرایط ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی، دمای ۲۲°C-۱۸ و دسترسی آزاد به آب نگهداری شدند. خروس‌ها در طول دوره، روزانه ۱۴۰-۱۵۰ گرم جیره بر پایه ذرت و سویا که دارای ۳۱۷۰ کیلوکالری انرژی و ۱۲ درصد پروتئین در هر کیلوگرم ماده خشک، تغذیه شدند. سپس خروس‌ها به مدت ۲ هفته برای اسپرم‌گیری عادت‌دهی شدند. خروس ها به دو گروه هفت‌تایی تقسیم شده و نمونه منی هر روز از یک گروه از خروس‌ها با استفاده از روش مالش پشتی-شکمی، جمع‌آوری گردید. بلافاصله بعد از جمع‌آوری منی، نمونه‌های اسپرم در فلاسک آب ۳۷°C به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه، نمونه‌ها از نظر حجم، غلظت، رنگ و تحرک اسپرم ، بررسی شده و تنها نمونه‌هایی با حجم ۰/۵-۰/۳ میلی‌لیتر، غلظت بیش از ۳×۱۰^{۹} اسپرم در هر میلی‌لیتر، تحرک بیش از ۸۰ درصد و میزان اسپرم سالم بیش از ۹۰ ٪ مورد استفاده قرار گرفتند برای اندازه‌گیری حجم نمونه‌ها از میکروتیوپ‌های مدرج استفاده می‌شد اندازه‌گیری رنگ نمونه‌ها به صورت چشمی و تحرک و غلظت با استفاده از کاسا انجام شد (Safa و همکاران ۲۰۱۶؛ Bakhshayesh Khiabani و همکاران، ۲۰۱۷). به منظور از بین بردن اثرات فردی، نمونه‌های تایید شده با یکدیگر مخلوط شدند. رقیق‌سازی نمونه های منی با استفاده از رقیق‌کننده بلستویل (پتاسیم دی فسفات ۰/۷۵۸ گرم، سدیم گلوتامات ۰/۸۶۶ گرم، پتاسیم سیترات ۰/۰۶۴ گرم، پتاسیم منوفسفات ۰/۰۷ گرم، سدیم استات ۰/۳۱ گرم، منیزیم کلراید ۰/۰۳۴ گرم، تریس ۰/۲۷ گرم، فروکتوز ۰/۵ گرم، لیسیتین ۱ درصد و گلیسرول ۲۰ درصد بود) انجام شد. پس از آماده‌سازی رقیق‌کننده، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول رقیق کننده را داخل ۱۰ لوله استریل ریخته و به هر لوله بر اساس گروه آزمایشی، آنتی‌اکسیدان MitoQ افزوده گردید. تیمارهای آزمایش مشتمل بر پنج سطح (صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ نانومولار) از MitoQ بود. مواد شیمیایی مورد استفاده در مطالعه حاضر از شرکت مرک آلمان تهیه شد. ماده شیمیایی MitoQ از طرف آزمایشگاه دکتر میک مورفی استاد دانشگاه کمبریج انگلستان به ما اهدا شده بود. پس از مخلوط کردن آنتی‌اکسیدان با رقیق‌کننده در دمای اتاق، لوله‌ها به منظور هم دما شدن با نمونه اسپرم و جلوگیری از ایجاد شوک حرارتی به داخل بن ماری منتقل گردیده و پس از ۱۵ دقیقه نمونه‌های اسپرم با نسبت ۱ به ۳۰ به داخل لوله‌ها افزوده شد. سپس فالکون‌های حاوی رقیق‌کننده+ $\frac{۱}{۲}$ گلیسرول+ اسپرم+ آنتی‌اکسیدان MitoQ و همچنین فالکون حاوی رقیق‌کننده+ $\frac{۳}{۲}$ گلیسرول به مدت ۲ ساعت در دمای ۵°C نگهداری شدند و بعد از ۲ ساعت، یک میلی‌لیتر رقیق‌کننده که حاوی $\frac{۳}{۲}$ گلیسرول بود به هر کدام از فالکون‌ها افزوده شد و به مدت یک ساعت دیگر در یخچال نگهداری شدند. سپس نمونه منی بلافاصله در داخل پایوت‌های انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتر کشیده شده و در پنج سانتی‌متری بالای سطح ازت مایع به مدت ۷ دقیقه قرار داده شدند. سپس به سرعت در ازت مایع غوطه ور کرده و برای نگهداری به تانک ازت منتقل شدند. در این تحقیق، به ازای هر یک از گروه‌های تیماری ۵ بار تکرار انجام شد و در هر تکرار هشت پایوت منجمد و پس از یخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

آزمایشات اسپرم

بعد از یخ‌گشایی، فراسنجه های تحرک‌کل، تحرک پیش-رونده، سرعت در مسیر میانگین، سرعت در مسیرمنحنی، سرعت در مسیر مستقیم، جنبایی عرضی سر، خطی بودن جنبایی ارزیابی شدند. جهت ارزیابی پارامترهای تحرک، ۵ میکرولیتر از نمونه منی را روی لام از قبل گرم شده (۳۷°C) قرار داده و سپس از هر نمونه حداقل ۱۰ فیلد را بطورکاملاً تصادفی انتخاب کرده و فراسنجه‌های تحرک را برای ۲۰۰ اسپرم بوسیله سیستم CASA (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver city CA, USA) با بزرگنمایی ۱۰۰× تجزیه و تحلیل شدند (Akhlaghi و همکاران، ۲۰۱۴).

درصد زنده‌مانی اسپرم

برای ارزیابی درصد زنده‌مانی اسپرم از رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین استفاده گردید برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی را با ۲۰ میکرولیتر ائوزین-نیگروزین به آرامی مخلوط کرده و گسترش تهیه شد. بعد از ۲۴ ساعت، تعداد ۲۰۰ اسپرم بوسیله میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند. اسپرم‌هایی که بطورکلی یا جزئی رنگ قرمز مایل به بنفش به خود بگیرند، مرده و اسپرم‌هایی که رنگ به خود نگرفته باشند زنده محسوب می‌شوند (BakhshayeshKhiabani و همکاران، ۲۰۱۷).

آزمون یکپارچگی غشاء پلاسمایی (**HOST**)[5]

برای ارزیابی سلامت غشای اسپرم از آزمون هاست استفاده می‌شود (Balercia و همکاران، ۲۰۱۷). برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از مایع منی را به ۱۰۰ میکرولیتر محیط هایپواسموتیک هاست (۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات سدیم، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی اسمول) اضافه کرده سپس بمدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۳۷°C انکوبه گردید. سپس با تهیه حداقل ۳ قطره از نمونه انکوبه شده، ارزیابی و شمارش اسپرم با استفاده از میکروسکوپ صورت گرفت. در هر لام، با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم، درصد اسپرم‌های با دم گره خورده (زنده) به گره نخورده (مرده) محاسبه شد.

آزمون اسپرم سالم (آزمون هانکوک)

برای ارزیابی سلامت اسپرمها، ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه منی یخ گشایی شده را به ۱۵۰ میکرولیتر محلول هانکوک اضافه گردید. سپس یک قطره از این مخلوط را روی لام قرار داده و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست(۴۰×)، درصد اسپرم‌های سالم محاسبه شدند.

اندازه گیری غلظت‌های مالون دی آلدهید (**MDA**)[6]

برای اندازه‌گیری غلظت MDA، ابتدا دو پایوت از هر تیمار و از هر تکرار در دمای ۳۷°C یخ‌گشایی شدند. سپس ۱ سی‌سی از محلول EDTA[7]، ۱ سی‌سی از محلول BHT[8] و ۲ سی‌سی از محلول TAC[9] را به نمونه ها افزوده و بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید (ده هزار دور در دقیقه). یک میلی‌لیتر از بالای هر نمونه را برداشته و بعد از انتقال به یک فالکون، یک میلی‌لیتر TBA[10] به آن اضافه گردید. سپس بمدت ۲۰ دقیقه در ۹۵°C قرار داده، سپس اجازه داده شد تا در دمای اتاق سرد شوند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، عدد جذب محلول رویی هر یک از نمونه‌ها را توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ مورد سنجش قرار گرفت (Pinho و همکاران، ۲۰۰۶).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های بدست آمده برای پارامترهای تحرک کل، تحرک پیش رونده، خطی بودن تحرک، زنده مانی، پاسخ به محلول HOST، مورفولوژی اسپرم و سطح مالون‌دی‌آلدهید بوسیله رویه GLM نرم افزار SAS (نسخه ۹.۳) در قالب طرح کاملا تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی استفاده شد. قبل از تجزیه و تحلیل داده‌ها، آزمون نرمالیته برای داده‌ها انجام شد. مدل آماری این طرح عبارت است از:

$$Yij= \mu + Ti + eij$$

Y_{ij} = مشاهده ij ام

μ = میانگین جمعیت

T_i = اثر تیمارها

e_{ij} = اثر عوامل ناشناخته ij ام

[5]Host (hypoosmotic swelling test)

[6]Malondialdehyde

[7]Ethylennedinitrilotetraacetic acid

[8]Butylated hydroxytoluene (**BHT**)

[9]Trichloressigsaure

[10]Thiobarbituric acid

نتایج

نتایج حاصل از بررسی تاثیر سطوح مختلف MitoQ روی صفت تحرک کل، نشان داد که افزودن ۰/۰۵ و ۰/۱ نـانومولار MitoQ سبب بهبود تحرک کل نسبت به گروه شـاهد شـد. همچنـین یـک کاهش قابل توجهی در تحرک کل در سطح ۰/۴ نانومولار نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. با اینحال بطورکلی، تأثیر آنتی اکسیدان MitoQ بر روی تحرک کل در مقایسه با شـاهد از نظـر آمـاری معنی‌دار نبود (جدول ۱). افزودن ۰/۱ نـانومولار از آنتـی اکسـیدان MitoQ باعث افـزایش معنـی‌دار درصـد اسـپرم‌هـای بـا تحـرک پیش‌رونده نسبت به گروه شـاهد شـد (P<۰/۰۵). نتـایج نشـان داد که افزودن آنتی‌اکسیدان هدفمند MitoQ در سـطوح ۰/۰۵ و ۰/۱ نـانومولار سـبب بهبـود پارامترهـای حرکتـی اسـپرم مـی‌گـردد (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل اثرات سطوح مختلـف آنتی‌اکسیدان هدفمند بر صفات کیفی اسپرم‌ها (جدول ۲) نشان داد که افـزودن ۰/۰۵، ۱/ و ۰/۲ نـانومـولار MitoQ بـه رقیـق‌کننـده، باعث بهبود معنـی‌دار زنـده‌مـانی، یکپـارچگی غشـای پلاسـمایی و اسپرم سالم بعد از یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد شـد (P<۰/۰۵). افزودن MitoQ در سطح ۰/۱ نانومولار موجب کاهش معنـی‌دار غلظت MDA نسبت به گروه شاهد شد اما در سطح ۰/۴ نانومولار افزایش معنی‌داری در غلظت MDA نسبت به گروه شاهدگردید (P<۰/۰۵).

جدول ۱- تاثیر آنتی‌اکسیدان هدفمند MitoQ بر پارامترهای حرکتی منی خروس، بعد از یخ‌گشایی (میانگین ± خطای معیار)

متغیر	TM (٪)	PM (٪)	VAP (µm.sec)	VSL (µm.sec)	VCL (µm.sec)	StR (٪)	LIN (٪)	ALH (µm)	BCF (Hz)
شاهد	73[ab] ± ۲/۹۹	27[cb] ±۱/۹۳	21/08[a] ±۳/۷۸	16/78[a] ±۳/۲۲	52/22[a] ±۴/۳۹	79/28[a] ±۲/۰۶	31/92[a] ±۲/۳۰	2/66[a]± ۰/۲۵	13/09[a] ±۱/۵۸
nM ۰/۰۵	76[ab]± ۲/۹۹	32/4[ab] ±۱/۹۳	25/03[a] ±۳/۷۸	20/26[a] ±۳/۲۲	65/49[a] ±۴/۳۹	80/46[a] ±۲/۰۶	30/59[a] ±۲/۳۰	2/99[a]± ۰/۲۵	15/36[a] ±۱/۵۸
nM ۰/۱	80[a]± ۲/۹۹	37/80[a] ±۱/۹۳	34/84[a] ±۳/۷۸	28/09[a] ±۳/۲۲	71/89[a] ±۴/۳۹	80/88[a] ±۲/۰۶	34/61[a] ±۲/۳۰	3/45[a]± ۰/۲۵	14/34[a] ±۱/۵۸
nM ۰/۲	70[ab]± ۲/۹۹	28/40[cb] ±۱/۹۳	26/70[a] ±۳/۷۸	21/78[a] ±۳/۲۲	52/99[a] ±۴/۳۹	80/57[a] ±۲/۰۶	33/21[a] ±۲/۳۰	2/89[a]± ۰/۲۵	12/74[a] ±۱/۵۸
/٤nM ۰	64[b]± ۲/۹۹	24[c] ±۱/۹۳	21/50[a] ±۳/۷۸	16/60[a] ±۳/۲۲	56/08[a] ±۴/۳۹	76/67[a] ±۲/۰۶	29/59[a] ±۲/۳۰	2/70[a]± ۰/۲۵	13/41[a] ±۱/۵۸

میانگین‌های با حرفهای ناهمسان (a, b, c) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵). **ALH:** بیشترین دامنه حرکت‌های جانبی بر حسب میکرومتر ، **BCF:** فرکانس حرکت‌های جانبی بر حسب هرتز، **LIN:** معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد است، **PM:** جنبایی پیشرونده، **STR:** معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد، **TM:** جنبایی کل، **VAP:** میانگین سرعت در مسیر مستقیم، **VCL:** سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده، **VSL:** سرعت اسپرم در خط مستقیم.

جدول ۲- تاثیر افزودن آنتی‌اکسیدان هدفمند MitoQ بر کیفیت منی خروس، بعد از یخ‌گشایی (میانگین ± خطای معیار)

متغییر	زنده‌مانی(٪)	یکپارچگی غشای پلاسمایی(٪)	اسپرم سالم(٪)	مالون‌دی‌آلدهاید (nmol/dL)
گروه شاهد	70/60^{d}±۰/۵۲	۵۹/۱۵^{d}±۰/۷۳	58/20^{d}±۰/۹۱	2/16^{b}±۰/۰۲
۰/۰۵ nM	80/40^{b}±۰/۵۲	74/40^{b}±۰/۷۳	69/80^{b}±۰/۹۱	1/99^{cd}±۰/۰۲
۰/۱ nM	83/۱۰^{a}±۰/۵۲	82/40^{a}±۰/۷۳	۷۶/۱۰^{a}±۰/۹۱	1/88^{d}±۰/۰۲
۰/۲ nM	۷۷/۲۰^{c}±۰/۵۲	68/20^{c}±۰/۷۳	۶۴/۲۰^{c}±۰/۹۱	2/04^{bc}±۰/۰۲
۰/٤ nM	۶۸/۲۰^{d}±۰/۵۲	56/80^{d}±۰/۷۳	۶۰/۱۵^{d}±۰/۹۱	3/01^{a}±۰/۰۲

اعداد با حروف ناهمسان **(a, b, c)** در هر ستون دارای تفاوت معنی‌دار هستند (**p**<۰/۰۵).

بحث

اسپرم طی فرایند انجماد و یخ‌گشایی دچار آسیب‌های غیرقابل برگشت می‌شود که درصد زنده‌مانی و باروری آنرا کاهش می‌دهد. به علت مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع در غشای پلاسمایی اسپرم و میزان فوق العاده ناچیز آنتی‌اکسیدان‌های سیتوپلاسمی، نسبت به پراکسیداسیون چربی حساس است. سطوح بالای ROS می‌تواند سبب آسیب به پروتئین، چربی و DNA اسپرم شود که در نتیجه آن منجر به کاهش درصد زنده‌مانی اسپرم منجمد می شود. این واقعیت اساس استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها برای بهبود بخشیدن به پروتکل‌های انجمادی است (Oehninger و همکاران، ۲۰۰۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن آنتی‌اکسیدان هدفمند MitoQ در سطح ۰/۱ نانومولار اثرات معنی‌داری روی بهبود پارامترهای حرکتی اسپرم (تحرک‌کل، تحرک پیش‌رونده، سرعت در مسیر میانگین، سرعت در مسیرمنحنی، سرعت در مسیر مستقیم، جنبایی عرضی سر، تحرک خطی)، افزایش زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی و کاهش پراکسیداسیون چربی داشته است. اگرچه افزودن آنتی‌اکسیدان‌های هدفمند MitoQ سبب کاهش معنی‌دار پراکسیداسیون چربی و افزایش زنده‌مانی در اسپرم‌های یخ‌گشایی شده خروس گردید که این نشان می‌دهد که ROS و پراکسیداسیون چربی بطور قابل توجهی باعث القای آسیب‌های انجماد می گردد. روش‌هایی که بتوانند به طور مؤثری از تولید ROS جلوگیری کرده و یا پراکسیداسیون چربی را کاهش دهند، می‌توانند سبب کاهش آسیب‌های انجمادی و متعاقب آن سبب بهبود زنده‌مانی در اسپرم یخ‌گشایی شوند. MitoQ از طریق کاهش پراکسیداسیون چربی نمونه‌های منی یخ‌گشایی شده، بطورغیرمستقیم تولید ROS را کاهش می‌دهد. با اینحال مطالعه حاضر، نشان می‌دهد که کاهش پراکسیداسیون چربی سبب افزایش زنده‌مانی اسپرم‌های یخ‌گشایی شده می گردد. اثرات مطلوب آنتی‌اکسیدان‌های هدفمند مورد مطالعه به علت محافظت از عملکرد میتوکندری می‌باشد (Fang و همکاران، ۲۰۱۴؛ Skulache و همکاران، ۲۰۰۹؛ Galley، ۲۰۱۰؛ Yurin و همکاران، ۲۰۰۷). اسپرم‌ها دارای مقادیر زیادی میتوکندری هستندکه منبع اصلی تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. اختلال در عملکرد میتوکندری سبب تولید بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه آسیب به غشای میتوکندری می‌شوند. با اینحال غشاء داخلی میتوکندری به بیشتر مولکول‌ها نفوذ ناپذیر بوده و در نتیجه بسیاری از آنتی اکسیدان‌ها نمی‌توانند وارد غشای داخلی میتوکندری شوند (Laher، ۲۰۱۴). در نتیجه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی که توانایی نفوذ به میتوکندری و محافظت از آن در برابر آسیب‌های ROS را دارا باشند، می‌توانند سبب بهبود پارامترهای کیفی اسپرم گردند. افزودن MitoQ در سطوح ۰/۰۵ ، ۰/۱، ۰/۲ موجب کاهش معنی‌دارغلظت MDA نسبت به گروه شاهد شد. نتایج حاصل از افزودن چهار سطح (۲۰۰، ۲۰، ۲، ۰/۲ نانو مولار) از MitoQ در انجماد اسپرم گربه ماهی زرد نشان می‌دهد که افزودن ۲۰ نانومول در لیتر MitoQ سبب کاهش تولید ROS، کاهش پراکسیداسیون چربی گردیده و زنده مانی اسپرم را بعد از یخ‌گشایی افزایش داد (Fang و

همکاران، ۲۰۱۴). نتایج حاصل از افزودن پنج سطح (۲۰۰، ۲۰، ۲ نـانو مـولار و ۲۰، ۲ میکـرو مـولار) از آنتـی‌اکسـیدان هدفمنـد MitoQ به انجماد اسپرم انسان نشان داد که درصد اسپرم‌هـایی بـا تحرک پیش‌رونده و تحرک کـل در نمونـه هـای دریافـت کننـده ۲۰۰ نانو مولار نسبت به گروه شـاهد افـزایش معنـی‌داری داشـتند. سـطوح ROS و محتـوای مـالون‌دی آلدئیـد در غلظـت ۲۰۰ نـانو مولار نسبت به گروه کنتـرل بطـور معنـی‌داری پـایین بـود (Liu و همکـاران، ۲۰۱۶). در پـژوهش حاضـر، اسـتفاده از ۰/۴ نـانومولار MitoQ سبب افزایش معنی‌دار غلظـت MDA نسـبت بـه گـروه شاهد گردید. استفاده ۲/۵-۱/۵ میکرومولار MitoQ باعث تولیـد سریع پراکسید هیدروژن بوسیله اکسیداسیون سوبسـتراهای وابسـته بـه نیکـوتین آمیـدآدنـین‌دی‌نوکلئوتیـد[11] میتوکنـدری مـی‌گـردد (Antonenko و همکـاران، ۲۰۰۸). در سـطح غشـای داخلـی میتوکندری یوبی کینون به عنوان پروتئین جفت‌جدا کن مـی‌باشـد (بالرچیـا و همکـاران، ۲۰۱۷). تجمـع بیشـتر MitoQ در داخـل میتوکندری، سبب افزایش نفوذپذیری غشـای داخلـی میتوکنـدری مـی‌گـردد کـه بـه دنبـال آن کـاهش پتانسـیل الکتریکـی، تـورم مـاتریکس، اختـلال در غشـای خـارجی میتوکنـدری و رهـا شـدن سیتوکروم c و دیگـر پـروتئین‌هـای پروآپوپتوتیـک غشـای داخلـی میتوکندری به درون سیتوزول سلول مـی‌گـردد کـه اثـر بعـدی آن آغـاز آپوپتـوز اسـت (Skulache و همکـاران، ۲۰۰۹). افـزایش مقدار MitoQ سبب دپلاریزاسـیون بیشـتر غشـاء از طریـق تجمـع کاتیون‌های چربی دوسـت و کـاهش پتانسـیل غشـای میتوکنـدری می‌گردد که در نتیجه آن جذب آنتـی‌اکسـیدان‌هـای کونژوگـه بـا تـری فنیـل فسـفونیوم ضـعیف گردیـده و در نتیجـه از دسـت دادن پتانسیل غشای میتوکنـدری تولیـد ROS و پراکسیداسـیون چربـی افـزایش مـی‌یابـد(Murphy and Smith، ۲۰۰۰؛ Liu و همکاران، ۲۰۱۶؛ Fang و همکاران، ۲۰۱۴)، کـه مطـابق بـا نتـایج حاصل از پژوهش حاضر می‌باشد.

افـزودن ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ نـانومولار MitoQ بـه ترکیـب رقیـق کننده، باعث بهبود معنی‌دار یکپارچگی غشای پلاسمایی، سـلامت و زنده مانی اسپرم‌ها نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). مکانیسم آنتی‌اکسیدان هدفمند MitoQ و تمام آنتی‌اکسیدان‌های هدفمنـد دیگر از طریق افزایش تولیدATP، کاهش تولید ROS و افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Fang و همکاران، ۲۰۱۴)..

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد کـه افـزودن MitoQ بـه رقیق کننده، باعث بهبود معنی‌دار زنده‌مـانی اسپرم‌هـا بعـد از یـخ-گشایی نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). تحرک کل در سطح ۰/۰۵ و ۰/۱ نانومولار MitoQ سبب بهبود تحرک کل نسبت بـه گـروه شـاهد گردیـد. در سـطوح ۰/۱ نـانومولار MitoQ درصـد اسپرم‌های با تحرک پـیش‌رونـده نسـبت بـه گـروه شـاهد افـزایش معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). اثر افزودن چهـار سـطح (۲۰۰، ۲۰، ۲، ۰/۲ نـانو مـولار) از MitoQ در انجمـاد اسـپرم گربـه مـاهی، افـزایش تولیـد ATP و جنبـایی و زنـده‌مـانی را در سـطح ۲۰ نانومولار نشان داده است (Fang و همکاران، ۲۰۱۴). بـا افـزودن پـنج سـطح (۲۰۰، ۲۰، ۲ نـانومولار و ۲۰، ۲ میکـرو مـولار) از آنتی‌اکسیدان هدفمند MitoQ در انجمـاد اسـپرم انسـان، مشـاهده شد که درصد اسپرم‌هایی با تحرک پـیش‌رونـده و میـزان تحـرک کل در غلظت‌های ۲۰۰ نانو مولار نسبت بـه گـروه شـاهد افـزایش معنی‌داری داشتند (Liu و همکـاران، ۲۰۱۶). در مطالعـه حاضـر، پارامترهای مختلف مانند زنده‌مانی اسپرم، پراکسیداسـیون چربـی، مورفولـوژی، پارامترهـای حرکتـی اسـپرم و یکپـارچگی غشـای پلاسمایی اسپرم مورد بررسی قرار گرفـت و نتـایج حاصـل بهبـود قابل توجهی در کیفیت اسپرم برای نمونه‌های منجمـد شـده بـا ۰/۱ نانومولار آنتی‌اکسیدان هدفمند MitoQ را نشان داد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد افزودن MitoQ در سـطح ۰/۱ بـه محـیط انجمـاد اسـپرم خـروس بطـور معنـی داری پراکسیداسـیون چربـی را کـاهش و زنـده‌مـانی، سـلامت غشـای پلاسمایی و اسپرم سـالم را پـس از یـخ‌گشـایی افـزایش مـی‌دهـد. یافتـه‌هـای مـا نشـان مـی‌دهـد کـه مهـار ROS از طریـق آنتی‌اکسیدان‌هایی که میتوکندری را هدف قرار می‌دهند می‌توانـد در انجماد اسپرم خروس مفید واقع گردد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مساعدت و همراهی آقای مهندس ابوذر نجفی و خانم مهنـدس مهدیـه مهـدی پـور و همکـاران مرکـز تحقیقـاتی خلعـت پوشان تبریز که ما را در انجام این تحقیـق یـاری نمودنـد قـدردانی می‌شود.

11 Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)

منابع

Akhlaghi, A., Jafari, Y., Zhandi, M. and Peebles, E.D. (2014). Reproductive performance, semen quality, and fatty acide profile of spermatozoa in senescent broiler breed rooster as enhanced by the long-term feeding of dried apple pomace. *Animal Reprodsci*. 147: 64-73.

Amaral, A., Lourenco, B., Marques, M. and Ramalho-Santos, J. (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*. 146: 163-174.

Antonenko, Y.N., Avetisyan, A.V., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Chertkov, V.A., Domnina, L.V. and et al. (2008). Mitochondria-targeted plastoquinonederivatives as tools to interrupt execution of an aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies. *Biochemistry*. 73: 1273–1287.

BakhshayeshKhiabani, A., Moghaddam, G. and Daghigh Kia, H. (2017). Effects of adding different levels of Glutamine to modified Beltsville extender on the survival of frozen rooster semen. *Animal Reproduction Science*. 184: 172–177

Balercia, G., Gandini, L. and Lenzi, A. (2017). *Antioxidants in andrology*. Thends in Andrology and sexual medicin. Italy, pp: 20-50.

Basova, L.V., Kurnikov, I.V., Wang, L., Ritov, V.B., Belikova, N.A., Pacheco, A.A. and et al. (2007). Cardiolipinswitch in mitochondria: shutting off the reduction of cytochrome c and turningon the peroxidase activity. *Biochemistry*. 46: 3423–3434.

Ernster, L. and Dallner, G. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of Ubiquinone function. *Biochimica ET Biophysica Acta*. 1271: 195-204

Fang, L., Bai, C., Chen,Y., Dai, J., Xiang, Y., Ji, X., Huang, C. and Dong, D. (2014). Inhibition of ROS production through mitochondria-targeted antioxidant and mitochondrialuncoupling increases post-thaw sperm viability in yellow catfish. *Cryobiology*. 69: 386-393.

Galley, H.F. (2010). Bench-to-bedside review: targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. *Critical Care*. 14: 230-241.

Graham, D., Huynh, N.N., Hamilton, C.A., Beattie, E., Smith, R.A., Cocheme, H.M. and et al. (2009). Mitochondria-targeted antioxidant mitoQ10 improves endothelial function and attenuates cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 54: 322–328

Grossfeld, J.R., Struckmann, B.S.C., Frenzel, A., Maxwell, W. and Rath, D. (2008). New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*. 70: 1225– 1233.

Gruber, J., Fong, S., Chen, C.B., Yoong, S., Pastorin, G., Schaffer, S., Cheah, I. and Halliwell, B. (2013). Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing. *Biotechnology Advances*. 31: 563– 592.

Jin, H., Kanthasamy, A., Ghosh, A., Anantharam, V., Kalyanaraman, B., Kanthasamy, A.G. (2014). Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: Preclinical and clinical outcomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1842: 1282–1294

Laher, I. (2014). *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants* .Vancouver, Medicine of the University of British Columbia. Canada. Pp: 14-78.

Lavara, R., Vicente, J.S., Baselga, M. (2013). Genetic variation in head mor- phometry of rabbit sperm. *Theriogenology*. 80: 313–318.

Liu, L., Wang, M.J., Yu, T.H., Cheng, Z., Li, M. and Guo, Q.W. (2016). Mitochondria targeted antioxidant mitoquinone protects post-thaw human sperm against oxidative stress injury. *Andrology*. 22(3):205-11

Lowes, D.A., Thottakam, B.M., Webster, N.R., Murphy, M.P. and Galley, H.F. (2008). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ protects against organ damage in a lipopolysaccharide– peptidoglycan model of sepsis. *Free Radical Biology and Medicine* . 45: 1559–1565.

Marti, E., Marti, J.I., Muino-Blanco, T. and Cebrian-Perez, J.A. (2008). Effect of the cryopreservation process on theactivity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *Andrology*. 29:459–67.

Mukhopadhyay, A. and Weiner, H. (2007). Delivery of drugs and macromolecules to mitochondria. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59: 729–738

Murphy, M.P. and Smith, R.A.J. (2000). Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 41: 235–250.

Oehninger, S., Kemal-Duru, N., Srisombut, C. and Morshedi, M. (2000). Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 169: 3–10.

Pinho, R.A, Andrades, M.E., Oliveira, M.R., Pirola, A.C., Zago, M.S., Silveira, P.C. and et al. (2006). Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biology International*. 30(10): 848-853

Safa, S., Mogaddam, G.H., JafariJozani, R., Daghigh Kia, H. and Janmohammadi, H. (2016). Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. Animal reproduction. *Animal Reproduction Science*. 174, 100–106

Skulachev, V.P., Anisimov, V.N., Antonenko, Y.N., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Erichev, V.P. and et al. (2009). An attempt to prevent senescence: A mitochondrial approach. *Biochimica et BiophysicaActa*. 1787: 437–461.

Smith, RA. and Murphy, M.P. (2010). Animal and human studies with the mitochondria-targetedantioxidant MitoQ. *New York Academy of Sciences*. 1201: 96–103.

Supinski, G.S., Murphy, M.P. and Callahan, L.A. (2009). MitoQ administration preventsendotoxin-induced cardiac dysfunction. *American Journal of Physiology-Regulatory. Integrative and Comparative Physiology*. 297: 1095–1102.

Wang, G., Kang, N., Gong, H., Luo, Y., Bai, C., Chen, Y.J.X., Huang, C. and Dong, Q. (2015). Upregulation of uncoupling protein Ucp2 through acute cold exposure increases post-thaw sperm quality in zebrafish. *Cryobiology*. 71: 464-471.

Yurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Osipov, A.N., Belikova, N.A., Basova, L.V., Kapralov, A.A. et al. (2007). Interactions of cardiolipin and lyso-cardiolipins with cytochrome c and tBid: conflict or assistance in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 14: 872–875