تولیدات دامی
دوره ۱۹ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۶
صفحه‌های ۷۳۸-۷۲۷

بهبودکیفیت منی قوچ بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی با استفاده از سطوح مختلف کوآنزیم Q10

زهرا بلوکی[۱] و حسین دقیق‌کیا[۲*]

۱. کارشناسی‌ارشد، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲. استاد، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ وصول مقاله:۱۳۹۵/۰۷/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۵/۱۰

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدانی کوآنزیم Q10 بر کیفیت منی قوچ بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی بود. از پنج قوچ قزل دو مرتبه در هفته و در پنج تکرار اسپرم‌گیری انجام شد. این آزمایش شامل پنج تیمار شامل: کوآنزیم Q10 در چهار سطح (۰/۵، ۱، ۲ و ۲/۵ میکرومولار) و گروه شاهد (بدون آنتی اکسیدان) بود. در این مطالعه پارامترهای جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء، اسپرم‌های غیرطبیعی، میزان مالون‌دی‌آلدهید، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز بعد از یخ‌گشایی اندازه‌گیری شدند. نتایج آنالیز بیانگر افزایش جنبایی کل در نمونه‌های با ۰/۵ و یک میکرومولار از آنتی‌اکسیدان کوآنزیم Q10 نسبت به گروه شاهد بود (p<۰/۰۵). نمونه‌های با ۰/۵ میکرومولار کوآنزیم Q10 درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و سطح پراکسیداسیون چربی کمتری نسبت به گروه شاهد داشتند (p<۰/۰۵). زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء پلاسمایی و تحرک کل، در تمامی گروه‌ها از گروه شاهد بهتر بود (p<۰/۰۵). پارامترهای VCL، VSL و VAP در گروه‌های دریافت کننده ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار کوآنزیم Q10 در مقایسه با گروه‌های دیگر بهبود یافت (p<۰/۰۵). گروه دریافت‌کننده ۲/۵ میکرومولار از کوآنزیم Q10 نسبت به سایر سطوح، تأثیر بهتری بر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، داشت. یافته‌های این بررسی نشان داد افزودن ۰/۵ و ۱ میکرومولار کوآنزیم Q10 سبب بهبود برخی فراسنجه‌های اسپرم بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی می‌شود.

کلیدواژه‌ها: آنالیز اسپرم، حفاظت انجمادی، قوچ قزل، کوآنزیم Q10، لسیتین.

*نویسنده مسئول Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

مقدمه

استفاده از اسپرم منجمدشده نقش بسیار مهمی در پیشرفت تکنیک‌های اصلاح نژادی، تولید آزمایشگاهی رویان و تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI; Intracytoplasmic sperm injection) داشته و برای نیل به مزایای زیاد تلقیح مصنوعی، ذخیره‌سازی منی برای زمان طولانی‌تر امری ضروری است [۱۷ و ۱۸]. با این حال، انجماد منی تاکنون به‌وضعیت مطلوبی نرسیده و فرآیند انجماد- یخ‌گشایی با تولید بیش از حد گونه‌های رادیکالی اکسیژن (ROS; Reactive Oxygen Species) همراه بوده و تمامی ترکیبات سلولی اسپرم‌ها از قبیل لیپیدها، پروتئین‌ها، قندها و اسیدهای نوکلئیک مورد هدف قرار می‌گیرند. این امر برای باروری اسپرم مضر بوده و عملکرد آن‌ها را کاهش می‌دهد [۱۹]. اسپرم پستاندران حاوی مقادیر بالایی از اسید چرب غیراشباع متصل به فسفولیپید است که در این بین، غشاء پلاسمایی منی قوچ غنی از اسیدچرب غیراشباع بوده و بنابراین، در مواجهه با ROS، نسبت به پراکسیداسیون لیپیدی بسیار حساس است [۱۵]. در طول فرآیند انجماد، اسپرم دچار شوک سرمایی، آسیب غشایی و استرس اکسیداتیوی می‌شود که در نهایت موجب تغییر ساختاری در غشای اسپرم خواهند شد. از بین رفتن سیالیت غشا و فعالیت سلول به سبب پراکسیداسیون لیپیدی غشا پلاسمایی اسپرم، دلیلی بر از بین رفتن فعالیت غشایی اسپرم است به‌همین علت، ترکیب مواد محافظ انجماد و افزودنی‌های دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی به رقیق‌کنندهٔ منی می‌تواند سبب کاهش اثر شوک سرمایی در اسپرم شود [۱ و ۲ و ۷]. مطالعات نشان داده‌اند که پلاسمای منی دارای یک منبع مهم آنتی‌اکسیدانی است و اسپرم‌ها را در طول فرآیند انجماد، علیه استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند؛ البته ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی به‌دلیل رقیق‌سازی برای انجماد، کاهش خواهد یافت که به همین دلیل از آنتی‌اکسیدان‌های خارجی علاوه بر آنتی‌اکسیدان‌های موجود در پلاسمای منی در محیط رقیق‌کنندهٔ حاوی منی استفاده می‌شود تا کیفیت و عملکرد اسپرم بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی بهبود یابد [۵].

کوآنزیم Q10 به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان شناخته شده است و این ماهیت از خاصیت حامل انرژی آن مشتق می‌شود و به‌عنوان یک حامل انرژی در میان چرخهٔ اکسیداسیون و احیا در حرکت است و همان‌طوری که الکترون را می‌دهد و یا می‌پذیرد، می‌تواند آن را اکسیده و یا احیا کند. کوآنزیم Q10، در فرم احیا شده ترجیح می‌دهد الکترون را نگه دارد، تا اینکه آن را از دست بدهد [۲۲]. کوآنزیم Q10 پراکسیداسیون لیپیدها را از طریق جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های چربی مهار می‌کند، به‌علاوه با شکل‌گیری هم زمان یوبی‌سمی‌کینون، H_2O_2 رادیکال‌های اولیه و اکسیژن تک‌اتمی را نیز کاهش می‌دهد. این نحوهٔ از بین‌بردن رادیکال‌های آزاد نه تنها از گسترش پراکسیداسیون چربی جلوگیری می‌کند، بلکه مانع اکسیداسیون پروتئین‌ها می‌شود. علاوه بر این، فرم احیا شده کوآنزیم Q10 با مداخله در مرحله انتشار پراکسیداسیون لیپید، موجب بازسازی ویتامین E از رادیکال‌های آلفا- توکوفروکسیل می‌شود. در طول استرس اکسیداتیو، تعامل H_2O_2 با یون‌های فلزی متصل به DNA به تولید رادیکال‌های هیدروکسیل می‌انجامد که کوآنزیم Q10 از اکسیداسیون بازها به‌ویژه در DNA میتوکندری جلوگیری می‌کند [۴]. در مقایسه با سایر آنتی‌اکسیدان‌ها، این ترکیب با جلوگیری از هر دو مسیر تولید و انتشار اکسیداسیون چربی و پروتئین، عملکرد خود را نشان می‌دهد. همچنین موجب بازسازی سایر آاکسیدان‌ها مانند ویتامین E می‌شود. هدف از انجام این پژوهش، بررسی آثار سطوح مختلف کوآنزیم Q10 در بهبود کیفیت اسپرم قوچ در رقیق‌کنندهٔ حاوی لسیتین بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، از پنج رأس قوچ قزل بالغ که شرایط تغذیه‌ای یکسان داشتند، دو بار در هفته توسط واژن مصنوعی اسپرم‌گیری صورت گرفت. در هر نوبت اسپرم‌گیری، برای از بین بردن آثار انفرادی قوچ‌ها، مقادیر یکسانی از نمونه‌های به‌دست آمده با یکدیگر مخلوط شدند. قبل از افزودن آنتی‌اکسیدان به محیط رقیق‌کننده، خصوصیات کمی و کیفی نمونه‌های منی از قبیل: حجم منی (۰/۷۵-۲ میلی‌لیتر)، غلظت (بیشتر از ۳×۱۰^{۹})، حرکت پیش‌رونده (بالاتر از ۷۰ درصد) و اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی (کمتر از ۱۰ درصد) ارزیابی شده و نمونه‌ها بر این اساس انتخاب شدند. آزمایش نخستین برای تعیین سطوح مناسب آنتی‌اکسیدانی انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: تیمار شاهد (بدون آنتی اکسیدان) و چهار سطح ۰/۵، ۱، ۲ و ۲/۵ میکرومولار کوآنزیم Q10 که در چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شدند. سردسازی نمونه‌ها در مدت دو ساعت و تا دمای ۴°C انجام گرفت و سپس نمونه‌های منی در پایوت‌ها پر شدند. پایوت‌ها به‌طور افقی در ارتفاع چهار سانتی‌متری بالای بخار ازت به مدت ۱۰ دقیقه منجمد شده و پس از آن به داخل تانک ازت مایع منتقل شده و تا زمان انجام آزمایشات در آنجا نگهداری شدند [۱۱]. نمونه‌های منی پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی از نظر درصد اسپرم‌های زنده و مرده، پارامترهای جنبایی، یکپارچگی غشاء، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و میزان فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی (TAC) مورد مطالعه قرار گرفتند.

برای ارزیابی درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. بدین منظور، پس از یخ‌گشایی، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از نمونهٔ منی با ۲۰ میکرولیتر رنگ روی لام به آرامی مخلوط و با لام دیگر گسترش تهیه شد. نمونهٔ گسترش یافته، به مدت دو ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. ۲۰۰ اسپرم به‌وسیلهٔ میکروسکوپ نوری و با کمک روغن ایمرسیون با بزرگنمایی ۱۰۰ ارزیابی شدند. اسپرم‌هایی که به‌طور کلی یا جزئی رنگ صورتی مایل به بنفش به‌خود گرفته بودند، مرده و اسپرم‌های فاقد رنگ، زنده محسوب شدند [۲۰].

برای ارزیابی فعالیت غشای پلاسمایی، نمونه‌ها پس از یخ‌گشایی با دور ۱۲۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷°C انکوبه شدند. مقدار پنج میکرولیتر از نمونه مخلوط شده، روی لام از پیش هم‌دما شده، قرار داده شد و با لامل پوشانده شد؛ سپس لام را روی صفحه گرم میکروسکوپ فازکنتراست قرار داده و تعداد ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ۴۰ ارزیابی شدند.

برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه منی یخ‌گشایی شده به ۱۵۰ میکرولیتر از محلول هانکوک افزوده شد [۹]. سپس یک قطره از این مخلوط را روی لام قرار داده و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ۴۰، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و اسپرم‌های با آکروزوم غیرطبیعی محاسبه شدند.

ارزیابی تحرک اسپرم پس از یخ‌گشایی نمونه‌های منی، به‌وسیلهٔ پارامترهایی مانند: تحرک کلی (TM)، تحرک پیش‌رونده (PM)، سرعت در مسیر میانگین (VAP)، سرعت در مسیر منحنی (VCL)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL)، جنبایی عرضی سر (ALH)، خطی بودن جنبایی (LIN) ارزیابی شد. در این راستا، ابتدا نمونه‌های منی یخ‌گشایی شد و به مدت سه دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۳۷°C انکوبه شدند. ۵ میکرولیتر از نمونه را روی لام از قبل گرم شده (۳۷°C) گذاشته شد و روی صفحهٔ گرم

میکروسکوپ قرار گرفت، از هر نمونه حداقل ۱۰ زمینه به‌صورت کاملاً تصادفی انتخاب و به تعداد ۲۰۰ اسپرم به‌وسیلهٔ سیستم CASA مدل Video Test Sperm 3.1 ارزیابی شدند (جدول ۱).

شاخص پراکسیداسیون لیپید در نمونه‌های منی، میزان غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) است که با استفاده از واکنش تیوباربیتوریتیک اسید (TBA) اندازه‌گیری می‌شود. معمولاً در دمای ۹۵°C و شرایط اسیدی، یک مولکول MDA با دو مولکول تیوباربیتوریتیک اسید واکنش داده و کمپلکس صورتی رنگی را بوجود می‌آورد. غلظت MDA، با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) در طول موج ۵۳۲ نانومتر سنجیده شد.

ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی اسپرم براساس روش (TEAC; Trolox equivalent antioxidant capacity) و با استفاده از کیت Randox اندازه‌گیری شد [۱۵]. روش TEAC براساس مهارکنندگی با آنتی‌اکسیدان‌های جاذب رادیکال کاتیون ABTS (3-) 2,2'-azino-bis (ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) است. مواد به‌کار رفته در کیت در جدول ۲ آورده شده است. نمونهٔ اسپرم به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس پلاسمای آن جدا شد. کووت نمونه شامل ۲۰ میکرولیتر از نمونه با یک میلی‌لیتر از کروموژن به صورت مخلوط شده بود. در کووت بلانک، ۲۰ میکرولیتر از DDH_2O با یک میلی لیتر از کروموژن مخلوط شدند. همچنین در کووت استاندارد ۲۰ میکرولیتر از استاندارد با یک میلی‌لیتر از کروموژن مخلوط شدند. در این روش ABTS با پراکسیداز و H_2O_2 برای تولید کاتیون ABTS انکوبه شد و رنگ پایدار آبی- سبز که حداکثر جذب نوری آن ۶۰۰ نانومتر است، تولید می‌کند که به‌وسیلهٔ اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد [۱۵].

جدول ۱. مشخصات تنظیمات سیستم CASA مدل Video Test Sperm 3.1

پارامتر	تنظیمات
نرخ فریم (هرتز)	۶۰
فریم حاصل شده	۳۰
حداقل کنتراست	۶۰
اندازهٔ سلول (پیکسل)	۵
فشردگی سلول	۵۵
سرعت مسیر (میکرومتر بر ثانیه)	۷۵
مستقیم بودن مسیر طی شده (درصد)	۸۰
سرعت در مسیر میانگین (میکرومتر بر ثانیه)	۲۱/۵
سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر بر ثانیه)	۶
سلول‌های کند	استاتیک
دما	۳۷

جدول ۲. ترکیبات تشکیل دهندهٔ کیت Randox برای ارزیابی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی اسپرم

ترکیبات		مقدار
بافر	بافر فسفات سالین (7.4 pH)	mmol/l۸۰
کروموژن	متمیوگلوبین	μmol/l۶/۱
	ABTS	μmol/l۶۱۰
استاندارد	هیدروژن پراکسید	μmol/l۲۵۰
استاندارد	۶-هیدروکسی-۲و۵و۷و ۸- تترا متیل کرومان -کربوکسیلیک اسید	اندازه اختصاصی

میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) با توجه به روش [۱۵] اندازه‌گیری شد. بدین منظور، ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه مایع منی به ۰/۸ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش اضافه شد و به مدت پنج دقیقه قبل از شروع واکنش در ۲۵°C انکوبه شد. علاوه بر این، از ۰/۱ میلی‌لیتر محلول H_2O_2 استفاده شد. میزان جذب نوری در ۴۱۲ نانومتر و به مدت ۵ دقیقه با استفاده از اسپکتروفتومتر (T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) ثبت شد. فعالیت GSH-Px به‌عنوان پروتئین واحد بین‌المللی بر گرم (IU/g) برای نمونهٔ اسپرم بیان شد.

میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز نمونه‌های منی با استفاده از کیت Ransod شرکت رندوکس (RANDOX Laboratories Ltd., UK) سنجیده شد [۱۵]. نمونه‌های منی یخ‌گشایی شده به نسبت ۱ به ۵ در PBS (۵۰ میلی‌مول و pH=۰/۷) رقیق شدند. برای سنجش، بافر سدیم کربنات (۵۰ میلی‌مول، pH=۱۰/۰). ۰/۱ میلی‌مول گزانتین، ۰/۰۲۵ میلی‌مول نیترو تترازولیوم آبی، ۰/۱ میلی‌مول EDTA، گزانتین اکسیداز و در نهایت نمونه‌ها در یک کووت کوچک مخلوط شدند. در صورت وجود آنزیم SOD در نمونه، رادیکال‌های سوپراکسید هیدروژن و O_2 تبدیل شده و از ایجاد رنگ قرمز فورمازان ممانعت می‌شود و میزان فعالیت آنزیم SOD به‌وسیلهٔ درجهٔ ممانعت از این واکنش تعیین می‌شود. یک واحد SOD سبب مهار ۵۰ درصد سرعت احیاء و یا مهار ۵۰ درصد از اکسیداسیون NADPH تحت غلظت‌های اندازه‌گیری می‌شود.

این مطالعه در پنج تیمار و پنج تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از این مطالعه به صورت جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی به کمک نرم‌افزار SAS رویهٔ مدل خطی عمومی برای مدل ۱تجزیه و میانگین‌ها به روش توکی مقایسه شدند.

$$Y_{ij} = \mu + Treat_i + e_{ij} \quad (1)$$

در این مدل، Y_{ij}، دادهٔ مشاهده شده برای فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده؛ μ،میانگین جامعه؛ $Treat_i$، اثر تیمار iام و e_{ij} اثر باقیمانده یا خطا است.

نتایج

کوآنزیم Q10 در تمامی سطوح سبب افزایش و بهبود پارامترهای جنبایی کل شد ($p<۰/۰۵$). علاوه بر این، کوآنزیم Q10 در سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار سبب بهبود حرکت خطی اسپرم، سرعت در مسیر منحنی، سرعت در مسیر مستقیم و میانگین سرعت در مسیر شد ($p<۰/۰۵$). این درحالی است که در نمونه‌های با ۲/۵ میکرومولار، پارامتر راستی مسیر طی شده اسپرم کاهش داشته و در سایر صفات بررسی شده تفاوت معناداری با گروه شاهد، مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه میانگین‌های پارامترهای جنبایی اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد-یخ گشایی در سطوح مختلف کوآنزیم Q10

پارامتر	TM(٪)	PM(٪)	VAP(µm/sec)	VSL(µm/sec)	VCL(µm/sec)	STR(٪)	LIN(٪)
۰	۴۸/۲۰^{b}	۱۸/۶۰	۲۰/۴۷^{b}	۱۵/۵۳^{b}	۵۰/۱۳^{b}	۷۶/۸۴^{a}	۳۰/۹۱^{b}
۰/۵	۶۶/۳۱^{a}	۲۴/۶۰	۶۸/۱۱^{a}	۴۶/۷۱^{a}	۹۱/۷۴^{a}	۶۸/۷۶^{ab}	۵۰/۹۵^{a}
۱	۶۸/۸۰^{a}	۳۶/۰۰	۶۳/۴۱^{a}	۵۰/۰۳^{a}	۹۷/۰۳^{a}	۷۹/۱۲^{a}	۵۱/۷۴^{a}
۲	۶۴/۸۰^{a}	۲۴/۰۰	۷۰/۹۷^{a}	۴۸/۵۳^{a}	۸۹/۲۵^{a}	۶۹/۴۰^{ab}	۵۴/۳۴^{a}
۲/۵	۵۸/۸۰^{a}	۲۴/۰۰	۳۳/۱۰^{b}	۱۸/۷۲^{b}	۵۴/۳۶^{b}	۵۵/۵۸^{b}	۳۴/۲۴^{b}
SEM	۲/۴۲	۲/۹۴	۳/۶۳	۲/۶۷	۴/۹۶	۳/۵۳	۱/۸۶

TM: تحرک کل؛ PM: تحرک پیش‌رونده؛ VAP: سرعت در مسیر میانگین؛ VSL: سرعت در مسیر مستقیم؛ VCL: سرعت در مسیرمنحنی؛ STR: مسیرصاف؛ LIN: خطی بودن جنبایی.

a-c: میانگین‌های با حروف غیرمشابه در یک ستون، تفاوت معنادار با هم دارند ($p<۰/۰۵$).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

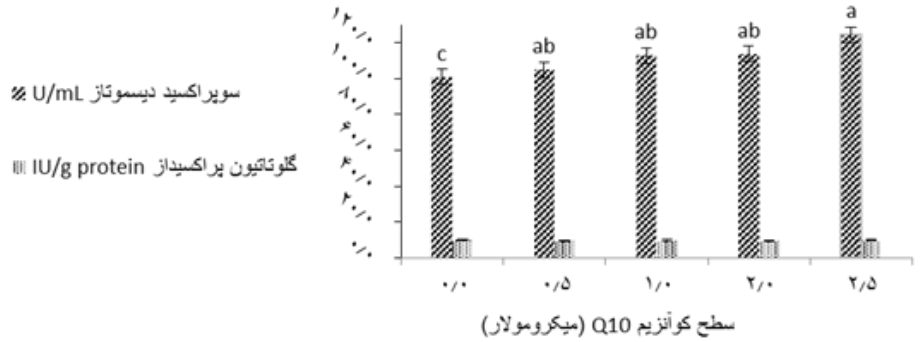
جدول ۴. مقایسهٔ صفات زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و میزان مالوندی‌آلدهید اسپرم منجمد شده قوچ قزل در بین سطوح مختلف کوآنزیم Q10.

پارامتر	زنده‌مانی (٪)	فعالیت غشاء پلاسمایی (٪)	اسپرم غیرطبیعی (٪)
۰	۵۵/۶۰^{c}	۳۷/۶۱^{b}	۲۵/۵۲^{a}
۰/۵	۸۱/۳۲^{a}	۵۶/۸۶^{a}	۱۹/۵۳^{b}
۱	۸۱/۰۰^{a}	۵۸/۰۴^{a}	۲۱/۹۰^{ab}
۲	۷۴/۸۷^{ab}	۵۴/۶۱^{a}	۲۲/۰۲^{ab}
۲/۵	۶۶/۳۶^{b}	۵۲/۱۰^{a}	۲۳/۹۵^{a}
SEM	۲/۵۲	۲/۴۷	۰/۸۹

a-c: میانگین‌های با حروف غیرمشابه در هر ستون، تفاوت معنادار با هم دارند ($p<۰/۰۵$).

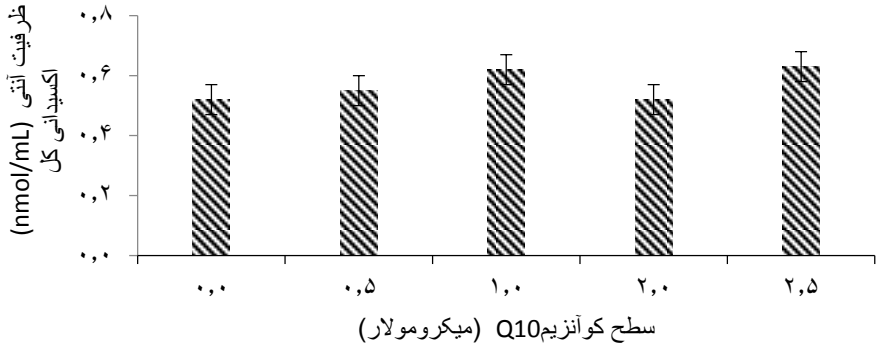
زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم بعد از یخ‌گشایی در تمامی تیمارها نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). درصد اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی در سطح ۲/۵ میکرومولار نسبت به گروه شاهد کاهش داشت؛ اما این کاهش معنادار نبود. افزودن ۰/۵ میکرومولار کوآنزیم Q10 سبب کاهش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی نسبت به گروه شاهد شد ($p<۰/۰۵$) (جدول۴).

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در گروه تیماری ۲/۵ میکرومولار کوآنزیم Q10 نسبت به سایر گروه‌ها و گروه شاهد بیشتر بود، این در حالی است که در سایر گروه‌ها نیز میزان فعالیت این آنزیم نسبت به گروه شاهد افزایش داشت ($p<۰/۰۵$). تفاوت معناداری در میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی بین تیمارها نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد (نمودار ۱ و ۲). سطح مالون دی‌آلدهید نیز نسبت به گروه شاهد تفاوت معناداری نداشت (نمودار ۳).

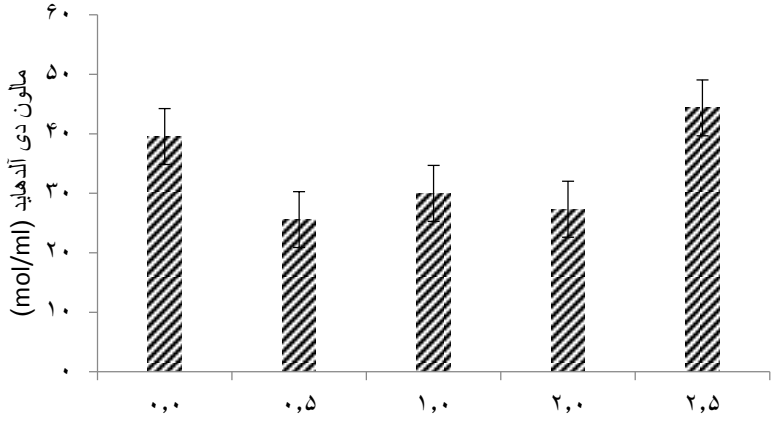


نمودار ۱. مقایسه میانگین‌های پارامترهای جنبایی مقدار سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد-یخ گشایی در سطوح مختلف کوآنزیم Q10

a-c: میانگین‌های با حروف غیرمشابه تفاوت معنادار با هم دارند (**p**<۰/۰۵).



نمودار ۲. مقایسه میانگین‌های ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد-یخ گشایی در سطوح مختلف کوآنزیم Q10



نمودار ۳. مقایسه میانگین‌های مالون‌دی‌آلدئید تولیدی اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد-یخ گشایی در سطوح مختلف کوآنزیم Q10

بحث

در این مطالعه افزودن کوآنزیم Q10 به رقیق‌کنندهٔ منی قوچ قزل، بعد از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی در مقایسه با گروه شاهد، موجب بهبود پارامترهای مربوط به تحرک اسپرم‌ها شد؛ می‌توان گفت این آنتی‌اکسیدان با مهار تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد بخصوص ROS موجب بهبود تحرک اسپرم‌ها شد. ارتباطی قوی بین تولید ROS و کاهش تحرک اسپرم وجود دارد، به‌طوری که مشخص شده است رادیکال هیدروژن پراکسید می‌تواند در سراسر غشاء اسپرم پخش شده و فعالیت برخی آنزیم‌های حیاتی مانند آنزیم گلوگز-۶ فسفات دهیدروژناز را مهار کند. این آنزیم، غلظت گلوگز را از طریق منحرف کردن مسیر هگزوز مونو فسفات و فعالیت NADPH کنترل می‌کند که این‌ها نقش اساسی در تولید ATP و تحرک اسپرم دارند [۱]. استفاده از کوآنزیم Q10 در سطوح یک و پنج میکرومولار سبب بهبود پارامترهای تحرک و سلامت غشاء اسپرم می‌شود [۲۴]. این مطالعه نشان داد که کوآنزیم Q10 می‌تواند در سطوح (۰/۵ و ۱ و ۲ میکرومولار) سبب بالا بردن صفات مربوط به جنبایی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی شود که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. جدا شدن پروتئین‌های موجود در لایهٔ داخلی غشاء میتوکندری می‌تواند سبب انتقال پروتون از بیرون به داخل شود، در نتیجهٔ گرادیان پروتون ایجاد شده به‌وسیلهٔ زنجیرهٔ تنفسی جدا از فرآیند فسفریلاسیون اکسیداتیو خواهد گرفت و عمل تولید گرما در عوض واکنش فسفریلاسیون اکسیداتیو انجام می‌شود. این پروتئین‌ها با کمک کوآنزیم Q10 اکسیداز که یک کوفاکتور الزامی در این فرآیند است به اسیدچرب متصل شده و با تنظیم تولید ATP در غشاء داخلی میتوکندری و انتقال آن به میکروتوبول‌های دم اسپرم سبب تحرک اسپرم می‌شود [۱۳].

القاء کوآنزیم Q10 در منی در بهبود کیفیت اسپرم و تحرک ویژهٔ اسپرم در مردان نابارور مؤثر است [۱۲] که این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی دارد. بهبود تحرک اسپرم ممکن است در اثر نقش بیوانرژیتیک کوآنزیم Q10 در زنجیرهٔ تنفسی و تولید ATP باشد [۴] . اطلاعات حاصل از بررسی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های روی، D-آسپارتات و کوآنزیم Q10 در درمان اسپرم گاو نر، نشان می‌دهد که این درمان مانع از دست‌رفتن تحرک اسپرم و افزایش قطعه قطعه شدن DNA اسپرم در طول زمان می‌شود. علاوه بر این، نرخ بلاستوسیست به تخمک‌های لقاح یافته، در اسپرم‌های درمان شده به‌طور قابل توجهی بالاتر بوده و این بلاستوسیست‌ها دارای درصد پایینی از سلول‌های آپوپتوتیک بودند [۱۰]. به‌علاوه مطالعه‌ای بر روی کیفیت مایع منی خروس با استفاده از Q10 و فسفاتیدیل کولین سویا نشان داد، پارامترهای مرتبط با کیفیت اسپرم در زمان استفادهٔ همزمان از این دو ماده بهبود یافتند [۲۱].

در پژوهش حاضر، عملکرد مثبت این آنتی‌اکسیدان محدود به بهبود معنادار پارامترهای تحرک نبوده و درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی در مقایسه با گروه شاهد بهبود یافت. می‌توان بیان کرد، این آنتی‌اکسیدان با داشتن خاصیت فنولیکی، اسپرم‌ها را از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. مطالعهٔ حاضر نشان داد که افزودن ۰/۵ و ۱ میکرومولار کوآنزیم Q10 سبب بهبود یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها شده و آن را از آسیب‌های ناشی از فرآیند انجماد حفظ می‌کند. کوآنزیم Q10 یک آنتی‌اکسیدان محلول در چربی است که از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی جلوگیری کرده و با تثبیت غشاء سلول سبب حفظ استحکام و عملکرد سلول و تحریک سیستم ایمنی سلول می‌شود [۱۳]. کوآنزیم Q10 با انتقال پروتون در غشاء و

خاصیت آنتی‌اکسیدانی در زنجیرهٔ انتقال الکترون میتوکندری نقش کلیدی در متابولیسم انرژی داشته و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی محافظ یکپارچگی غشاء سلول است [۸].

مشخص شده است که ترکیبات فنولیک (بخصوص فلاونوئیدها) قادرند با پوشش دادن لیپیدها روند پراکسیداسیون لیپیدی را تغییر داده و متوقف کنند. همچنین با کاهش سیالیت غشاهای سلولی و جلوگیری از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و محدود کردن پراکسیداسیون فسفولیپیدها و اسیدهای چرب غیراشباع، می‌توانند از غشاهای سلولی محافظت کنند [۳]. لازم به ذکر است که استفادهٔ مقادیر بیشتر از ۲ میکرومولار کوآنزیم Q10، سبب آثار مثبت آن تقریباً برای همه پارامترهای مورد سنجش شد، به‌طوری که در سطح ۲/۵ میکرومولار کوآنزیم Q10 هیچ بهبودی در هر یک از پارامترهای ارزیابی شده حاصل نشد. افزودن سطوح بالای آنتی‌اکسیدان، با مهار بیش از حد فعالیت آنزیم‌های دخیل در اکسیداسیون و احیاء و به هم زدن تعادل بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تولید رادیکال‌های آزاد در محیط اسپرم‌ها را به هم زده و در نهایت موجب کاهش عملکردهای اسپرم می‌شوند [۱۴].

افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تمامی سطوح مورد مطالعه مشاهده شد که می‌تواند به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی کوآنزیم Q10 باشد که با از بین بردن رادیکال‌های آزاد فعالیت این آنزیم را افزایش داده است. استفاده از کوآنزیم Q10 در سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار غلظت MDA را کاهش داد، اما سطح ۲/۵ میکرومولار آن میزان MDA را افزایش داد که در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معناداری مشاهده نشد. افزایش تولید ترکیباتی مانند مالون‌دی‌آلدهاید و ترکیب ۴-هیدروکسی نونئول که ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی، تخریب لیپید غشاء پلاسمایی در اثر رادیکال‌های آزاد است، برای اسپرم سمی خواهد بود [۶]. غشای لیپیدی و لیپوپروتئینی تحت ممانعت‌کنندگی پراکسیداسیونی Q10 قرار می‌گیرند [۱۶]. به‌علاوه، اخیراً گزارش شده که آنتی‌اکسیدان‌های روی و کوآنزیم Q10 اثر محافظت‌کنندگی بر تحرک، تکه تکه شدن DNA و پراکسیداسیون چربی اسپرم انسان دارد [۲۳]. عدم مشاهده اختلاف معنادار بین داده‌های میزان مالون‌دی‌آلدهاید تیمارهای این مطالعه با وجود کاهش آن‌ها، احتمالاً ناشی از غلظت بالای رادیکال‌های آزاد ناشی از استرس اکسیداتیو و یا نحوهٔ انجام آزمایش است. با وجود اختلاف معنادار تمامی تیمارها با گروه شاهد در بیشتر صفات مورد مطالعه، سطح ۱ میکرومولار کوآنزیم Q10 نسبت به سایر سطوح تأثیر بهتری در بهبود پارامترهای جنبایی کل، زنده‌مانی، کاهش اسپرم غیرطبیعی، خطی بودن مسیر طی شده، سرعت در مسیر مستقیم و میانگین سرعت در مسیر، سلامت غشاء اسپرم و زنده‌مانی داشت. لازم به ذکر است که استفاده از سطح ۰/۵ میکرومولار نسبت به سطوح دیگر سبب کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان مالون‌دی‌آلدهاید نسبت به گروه شاهد شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از سطح یک میکرومولار کوآنزیم Q10 کیفیت اسپرم منجمد شده بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی را بهبود می‌بخشد.

منابع

[1]. Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA (2012) Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in healthl. Journal of andrology 33(6): 1096-1106.

[2]. Aitken RJ, Baker MA (2006) Oxidative stress, sperm survival and fertility controll. Molecular and cellular endocrinology 250(1-2): 66-69.

[3]. Arora A, Byrem TM, Nair MG, Strasburg GM (2000) Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoidsl. Archives of Biochemistry and Biophysics 373(1): 102-109.

[4]. Bentinger M, Tekle M, Dallner G (2010) Coenzyme Q–biosynthesis and functionsl. Biochemical and biophysical research communications 396(1): 74-79.

[5]. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C (2000) Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawingl. Molecular reproduction and development 55(3): 282-288.

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

[7]. Daghigh Kia H, Farhadi R, Ashrafi I, Mehdipour M (2016) Anti-oxidative effects of ethanol extract of Origanum vulgare on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved holstein bull spermatozoal. Iranian Journal of Applied Animal Science 6(4): 901-907.

[8]. Ernster L (1993) Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and implicationsl. Active Oxygens, Lipid Peroxides, and Antioxidants. CRC Press, Boca Raton. 107.

[9]. Fattah A, Sharafi M, Masoudi R, Shahverdi A, Esmaeili V, Najafi A (2017) l-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperml. Cryobiology 74: 148-153.

[10]. Gualtieri R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Rizos D, Longobardi S, Talevi R (2014) Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo developmentl. Theriogenology 82(4): 592-598.

[11]. Jafaroghli M, Khalili B, Farshad A, Zamiri MJ (2011) The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semenl. Small ruminant research 96(1): 58-63.

[12]. 12. Lei F, Xing D-M, Xiang L, Zhao Y-N, Wang W, Zhang L-J, Du L-J (2003) Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extractl. J. Chromatogr. B 796(1): 189-194.

[13]. Lewin A, Lavon H (1997) The effect of coenzyme Q 10 on sperm motility and functionl. Mol. Aspects Med 18: 213-219.

[14]. Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodriguez M, Alvarez M, Anel L, de Paz P, Garde JJ, Martinez-Pastor F (2012) Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted to 37 degrees C up to four hoursl. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene 47(6): 907-914.

[15]. Mehdipour M, Daghigh Kia H, Najafi A, Dodaran HV, Garcia-Alvarez O (2016) Effect of green tea (Camellia sinensis) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extenderl. Cryobiology 73(3): 297-303.

[16]. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonatesl. Clin. Sci 84(4): 407-412.

replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservationl. Animal reproduction science 177: 35-4.

[17]. Najafi A, Najafi MH, Zanganeh Z, Sharafi M, Martinez-Pastor F, Adeldust H (2014) Cryopreservation of ram semen in extenders containing soybean lecithin as cryoprotectant and hyaluronic acid as antioxidantl. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene 49(6): 934-940.

[18]. Najafi A, Daghigh Kia H, Mohammadi H, Najafi MH, Zanganeh Z, Sharafi M, Martinez-Pastor F, Adeldust H (2014) Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extenderl. Cryobiology 69(1): 68-73.

[19]. Najafi A, Zhandi M, Towhidi A, Sharafi M, Akbari Sharif A, Khodaei Motlagh M, Martinez-Pastor F (2013) Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extenderl. Cryobiology 66(3): 275-282.

[20]. Najafi A, Daghigh Kia H, Dodaran HV, Mehdipour M, Alvarez-Rodriguez M (2017) Ethylene glycol, but not DMSO, could

[21]. Nath AK, Basu S, Datta U (2015) Coenzyme Q10 and soyphosphatidylcholine in EK extender on preservation of Rhode Island Red poultry semenl. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research 2(2): 134-140.

[22]. Tran UPC, Clarke CF (2007) Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotesl. Mitochondrion 7: S62-S71.

[23]. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH (1983) Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheepl. Res. Vet. Sci 34(3): 253-256.

[24]. Yousefian I, Zare-Shahneh A, Zhandi M (2014) The effect of coenzyme Q10 and α-tocopherol in skim milk–based extender for preservation of Caspian stallion semen in cool conditionl. J. Equine Vet. Sci 34(8): 949-954.

Journal of
Animal Production
(College of Abouraihan – University of Tehran)
Vol. 19 ■ No. 3 ■ Autumn 2017

Improvement of the ram semen quality after freezing-thawing process using different levels of coenzyme Q10

Zahra Blouki[1], *Hossein Daghigh Kia*[2*]

1. M.Sc., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: October 17, 2016 **Accepted: August 1, 2017**

Abstract

The aim of this study was to investigate the antioxidant effect of coenzyme Q10 on ram semen quality after the freezing-thawing process. Five *Ghezel* rams were used for sperm collection twice a week in five replicates. This experiment consisted of 5 treatments, coenzyme Q10 at four levels (0.5, 1, 2 and 2.5 µmol) and control group (without antioxidant). In this study, motility, viability, membrane integrity, abnormality parameters of sperm, malondialdehyde, total antioxidant capacity, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity were measured following freeze-thawing. The results showed that the total motility in samples with 0.5 and 1 µM of coenzyme Q10 antioxidant was significantly higher than the control group ($p<0.05$). Samples with 0.5 µM Coenzyme Q10 had the lowest percentage of abnormal sperm and lipid peroxidation level compared to the control group ($p<0.05$). Viability, plasma membrane integrity and total motility were better in all treated groups compared to the control group ($p<0.05$). The VCL, VSL and VAP parameters were improved in groups receiving 0.5, 1 and 2 µM coenzyme Q10 compared with the other groups ($p<0.05$). The group receiving 2.5 µM coenzyme Q10 had the best impact on the superoxide dismutase activity than other groups. The results of this study showed that adding 0.5 and 1 µM Coenzyme Q10 improved some of the sperm parameters after the freezing-cracking process.

Keywords: cryopreservation, coenzyme Q10, *Ghezel* ram, lecithin, sperm analysis.

Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir