تولیدات دامی
دوره ۲۱ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۸
صفحه‌های ۵۷۷-۵۶۹

اثر گلیسیریزیک اسید بر پراکسیداسیون لیپیدی و فراسنجه‌های حیاتی اسپرم گاو نژاد هلشتاین پس از فرایند انجماد- ذوب

تکتم سادات وفا[1*]، حشمت سپهری مقدم[1]، مژده عمادی[1]، علیرضا حسنی بافرانی[2]
۱. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
۲. استادیار، گروه علوم دامی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۳/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۶/۱۳

چکیده

به‌منظور بررسی اثر گلیسیریزیک اسید بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی و فراسنجه‌های حیاتی اسپرم گاو نژاد هلشتاین پس از فرایند انجماد- ذوب، از چهار راس گاو بالغ نژاد هلشتاین، دو بار در هفته به‌کمک مهبل مصنوعی نمونه‌های اسپرم جمع‌آوری شد. برای ازبین‌بردن اثرات فردی دام‌ها، انزال‌ها به نسبت‌های مساوی با هم مخلوط شدند. نمونه‌های منی به‌صورت مساوی به چهار گروه (هشت تکرار) تقسیم شدند. مقادیر صفر (شاهد)، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید به‌همراه رقیق‌کننده بر پایه سیترات- زرده تخم به نمونه‌های منی اضافه شد. نمونه‌های منی پس از طی مراحل سردسازی و تعادل، به‌مدت ۳۰ روز در داخل تانک ازت نگهداری شدند. پس از فرایند ذوب، میزان مالون‌دی‌آلدهید در نمونه‌های اسپرم توسط روش الایزا سنجش شد. هم‌چنین، یکپارچگی غشا، میزان تحرک و درصد اسپرم‌های زنده بررسی شد. یکپارچگی غشا، میزان تحرک و درصد اسپرم‌های زنده در نمونه‌های اسپرم تحت تیمار با غلظت‌های ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید در مقایسه با گروه شاهد به‌صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری افزایش و میزان مالون‌دی‌آلدهید به‌صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). بنابراین، استفاده از گلیسیریزیک اسید در رقیق‌کننده مایع منی گاو موجب بهبود فراسنجه‌های حیاتی اسپرم و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم پس از فرایند انجماد- ذوب می‌شود.

کلیدواژه‌ها: اسپرم، انجماد، پراکسیداسیون لیپیدی، گاو هلشتاین، گلیسیریزیک اسید.

Effect of glycyrrhizic acid on lipid peroxidation and vital parameters of Holstein bull sperm after freeze-thawing process

Toktam Sadat Vafa[1*], Heshmat Sepehri-Moghadam[1], Mozhdeh Emadi[1], Alireza Hassani Baferani[2]
1. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
Received: June 15, 2019 Accepted: September 4, 2019

Abstract

To examine the effect of glycyrrhizic acid on lipid peroxidation and vital parameters of Holstein bull sperm after freeze-thawing process, semen samples were collected from four mature Holstein bulls twice a week using artificial vagina. Ejaculates were pooled in order to eliminate the individual effects of bull. Semen samples were divided into four equal groups (8 reps) including Zero (control), 20, 30 and 40 mg/ml of glycyrrhizic acid along with diluents based on egg yolk-citrate. Following cooling and equilibration stage, semen samples were stored in nitrogen tank for 30 days. After thawing procedure, level of malondialdehyde in sperm samples were measured by ELISA. Also, membrane integrity, motility and viability of sperm were examined. Statistical analysis was carried out using one-way ANOVA and post-hoc Tukey tests ($p<0.05$). According to the results, membrane integrity, motility and viability of sperm samples treated with concentration of 20, 30 and 40 mg/ml glycyrrhizic acid dose dependent manner significantly increased and level of malondialdehyde dose dependent manner significantly decreased ccompared to control groups ($p<0.05$). Therefore, use of glycyrrhizic acid in bull semen diluent can improve sperm vital parameters and decreases lipid peroxidation of sperm after freeze-thawing process.

Keywords: Freeze-Thaw, glycyrrhizic acid, holstein cows, lipid peroxidation, sperm.

* نویسنده مسئول Email: vafa.t@pnurazavi.ac.ir

مقدمه

ذخیره‌سازی طولانی مدت مایع منی به‌صورت منجمد امری ضروری در استفاده از تکنیک تلقیح مصنوعی است. براساس مکانیسم انجماد، سیتوپلاسم موجود در سلول در اثر کاهش دما، منجمد و فرآیندهای بیوشیمیایی و مولکولی سلول کاهش یافته و یا متوقف می‌شود. طی فرآیند انجماد- ذوب، تنش‌های فیزیکی و شیمیایی در غشای اسپرم به‌وجود می‌آید و موجب آسیب آکروزوم، تخریب غشا و اختلال در ساختمان میتوکندری‌ها می‌شوند. هم‌چنین کیفیت، زنده‌مانی، تحرک و قدرت باروری اسپرم‌ها کاهش می‌یابد [۲۳]. با توجه به این‌که میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجود در اسپرم پایین است و این سلول‌ها مستعد واکنش‌های اکسیداتیو می‌باشند، پژوهش‌ها نشان داده است طی حفاظت انجمادی مایع منی، سلول‌های اسپرم در معرض شوک سرمایی قرار می‌گیرد، در نتیجه میزان اکسیداسیون غشا به‌واسطه واکنش‌های اکسیداتیو افزایش می‌یابد که این امر در نهایت طول عمر اسپرم را کاهش می‌دهد [۱۷]، به‌علاوه تشکیل گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن طی فرایند انجماد اسپرم، سبب آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود که در نهایت منجر به کاهش تحرک و باروری اسپرم پس از یخ‌گشایی است [۳].

طی پژوهش‌های انجام‌شده فرایند انجماد اسپرم با تشکیل گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن سبب آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود. این امر از عوامل مهم در کاهش تحرک و باروری اسپرم پس از یخ‌گشایی است [۵]. اسپرم پستانداران حاوی مقادیر زیادی از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، فسفولیپید و استرول است که بسیار مستعد اثر انواع اکسیژن‌های فعال می‌باشد. این امر سبب به‌وجودآمدن آسیب‌های ساختمانی اسپرم می‌شود. به‌طورکلی اغلب اثرات مهم پراکسیداسیون لیپیدی در تمام سلول‌ها، آسیب در ساختار غشا، اختلال در اندامک‌های داخل سلولی، و تغییر فرآیندهای انتقال غشا و اختلال در گیرنده‌های غشایی است [۹].

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که سنتز رادیکال‌های آزاد را مهار کرده و یا با فعالیت آن‌ها مقابله می‌کنند. سلول‌های اسپرم و مایع منی دارای مکانیسم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشند ولی در فرآیند رقیق‌سازی مایع منی جهت انجماد و ذخیره‌سازی، به‌دلیل کاهش آنتی‌اکسیدان‌های داخلی و جهت جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو اسپرم، نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدان با منشأ خارجی است [۶]. آنتی‌اکسیدان‌های متنوعی مانند بتاهیدروکسی تولوئن، بوتیلایتد هیدروکسی‌آنیزول و پروپیل‌گالات برای محافظت اسپرم در طی فرایند انجماد- ذوب استفاده می‌شوند [۱۳]. با توجه به عوارض استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی، اخیراً پژوهش‌گران و تولیدکننده‌های اسپرم منجمد، به جایگزینی آنها با آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی گرایش پیدا کرده‌اند [۵]. شیرین‌بیان با نام انگلیسی *Licorice* و نام علمی *Glycyrrhiza glabra* L. دارای ترکیبات متعددی نظیر قندها، فلاوونوئیدها، استرول‌ها، اسیدهای آمینه، صمغ، نشاسته، اسانس‌های روغنی و ساپونین‌ها می‌باشد. عمده‌ترین ساپونین آن گلیسیریزیک اسید با فرمول $C_{42}H_{62}O_{16}$ است که از دو واحد اسید گلوکورونیک و یک مولکول اسید گلیسرتنیک تشکیل شده است [۷].

شیرین‌بیان یک آنتی‌اکسیدان قوی است و مشتقات آن از پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری نموده و میتوکندری را در مقابل استرس‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند. هم‌چنین ترکیبات موجود در عصاره شیرین‌بیان با ازبین‌بردن رادیکال‌های آزاد خاصیت محافظتی و آنتی‌اکسیدانی دارد [۷]. گزارش شده است عصاره شیرین بیان اثر حفاظتی در برابر آسیب کبدی ناشی از تیواستامید دارد که به‌واسطه اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات پلی‌فنلی است و نیز کلیه‌ها را در

برابر استرس‌اکسیداتیو و نفروتوکسیسیتی القاشده توسط تجمع رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند و موجب افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول‌های کلیه می‌شود [۱].

عصاره شیرین‌بیان، سرعت تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی و تمایز اسپرماتوسیت در بافت بیضه نوزاد موش آزمایشگاهی را افزایش می‌دهد. ترکیبات موجود در عصاره شیرین‌بیان می‌تواند به‌عنوان دارویی بالقوه برای درمان ناباروری و حفاظت سلول‌های اسپرم در برابر آسیب‌های اکسیداتیو عمل نمایند [۲۴]. پژوهش‌گران عنوان کردند ترکیبات موجود در عصاره شیرین‌بیان دارای اثر محافظتی در بافت بیضه در برابر آسیب القایی توسط اکراتوکسین دارد [۱۱]. هم‌چنین گلیسیریزیک اسید موجود در گیاه شیرین‌بیان از طریق مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش آسیب اکسیداتیو DNA از القای آپوپتوز در سلول های آسیب‌دیده جلوگیری می‌کند [۲۲]. با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی گلیسیریزیک اسید، هدف از این مطالعه بررسی اثر گلیسیریزیک اسید بر پراکسیداسیون لیپیدی و پارامترهای حیاتی اسپرم گاو نژاد هلشتاین پس از فرایند انجماد- ذوب بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از منی چهار راس گاو هلشتاین با شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان و سلامت عمومی و ویژگی‌های تولیدمثلی مطلوب در سن دو سالگی استفاده شد. گاوها از یک گاوداری خصوصی واقع در جاده میامی مشهد انتخاب شدند. با استفاده از واژن مصنوعی و به تعداد دو بار در هفته اسپرم‌گیری انجام شد. برای حذف تأثیرات فردی دام‌ها، نمونه‌های منی هر دام به مقدار مساوی در هر تکرار آزمایشی با هم مخلوط شدند. لازم به ذکر است قبل از انجام اسپرم‌گیری، تمام اجزای واژن مصنوعی به‌مدت حداقل یک ساعت در دمای ۴۲-۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از جمع‌آوری مایع منی، به‌منظور بررسی‌های ابتدایی، نمونه‌ها بی‌درنگ به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌های منی ابتدا از نظر رنگ، عدم آلودگی به ادرار و خون مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه‌هایی که دارای رنگ کرمی، حجم بین ۱۲-۵ میلی‌لیتر، غلظت بیش‌تر از ۱۰۹×۱ سلول اسپرم در هر میلی‌لیتر، درصد حرکت پیش‌رونده بیش‌تر از ۷۰ درصد و مورفولوژی کم‌تر از ۱۰ درصد غیرطبیعی در هر انزال بودند، به‌عنوان منی طبیعی در نظر گرفته شد. غلظت اسپرم‌ها توسط دستگاه فتومتر و درصد تحرک پیش‌رونده به‌کمک سیستم کاسا تعیین شد[۸].

در این پژوهش از رقیق‌کننده بر پایه سیترات- زرده تخم مرغ استفاده شد. هر ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق‌کننده پایه حاوی ۶۷ میلی‌لیتر محلول سیترات سه درصد، ۲۵ میلی‌لیتر زرده تخم مرغ، هفت میلی‌لیتر گلیسرول، پنج میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، ۰/۳ میلی‌لیتر لینکوپک، ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر تایلوزین بود. pH رقیق‌کننده در حدود ۶/۹ تنظیم شد. در رقیق‌سازی اسپرم‌ها از روش دو مرحله‌ای استفاده شد. در مرحله اول محلول رقیق‌کننده با سه درصد گلیسرول (رقیق‌کننده A) و در مرحله دوم، محلول رقیق‌کننده با ۱۱ درصد گلیسرول (رقیق‌کننده B) به مایع منی افزوده شد. لازم به ذکر است ترکیبات و حجم رقیق‌کننده‌ها به‌جز درصد گلیسرول، کاملاً یکسان بوده است [۳].

نمونه‌های منی به چهار گروه مساوی با هشت تکرار تقسیم شدند: گروه شاهد (غلظت صفر گلیسیریزیک اسید) و سه گروه تحت تیمار با غلظت‌های ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید (شرکت سیگما، فرانسه). پس از ارزیابی اولیه، نمونه‌های منی با غلظت ۵۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده به لوله‌های فالکون حاوی سطوح مختلف گلیسیریزیک اسید

و رقیق‌کننده A (رقیق‌کننده حاوی سه درصد گلیسرول) اضافه شدند. سپس فالکون‌ها به داخل ظرف آب پنج درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از سردشدن و تعادل در دمای پنج درجه سانتی‌گراد رقیق‌کننده B (رقیق‌کننده حاوی ۱۱ درصد گلیسرول) با دمای پنج درجه سانتی‌گراد به فالکون‌ها اضافه شد تا غلظت نهایی گلیسرول به هفت درصد برسد. نمونه‌های منی در پایوت‌های نیم میلی‌لیتری ریخته شد و توسط پودر پلی‌وینیل الکل بسته‌بندی شدند [۵]. نمونه‌ها توسط دستگاه انجماد (IMV-Digitcool, France) به‌ترتیب به دمای ۴-، ۲۰- و ۸۰- درجه سانتی‌گراد رسیدند. سپس پایوت‌ها به تانک ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و به‌مدت ۳۰ روز در این دما نگهداری شدند [۱۹]. پس از ۳۰ روز پایوت‌های حاوی منی منجمدشده از تانک ازت خارج شدند و در داخل حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه یخ‌گشایی شدند. سپس محتویات پایوت درون میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتر تخلیه شد [۵].

برای ارزیابی میزان مالون‌دی‌آلدهید، میکروتیوپ‌ها با سرعت ۳۵۰۰ دور دقیقه (RPM)، نیروی نسبی سانتریفیوژ (RCF) ۱۲۳۵ و به‌مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس توسط بافر سیترات شست‌وشو و سه مرتبه سانتریفوژ تکرار شد. در نهایت محلول سطحی حذف و اسپرم‌های باقی‌مانده به‌همراه بافر تریس (Sigma-Aldrich, Germany) به‌مدت دو دقیقه توسط دستگاه هموژنایزر مدل Ultra turrax T25 (IKA, Germany) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه و در یک میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شدند. جهت جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تمامی مراحل در دمای چهار درجه سانتی‌گراد (سانتریفوژ یخچال‌دار) انجام شد و از محلول نیم میلی‌مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید به‌عنوان مهارکننده آنزیم‌های اسپرم استفاده شد [۱۲]. میزان مالون‌دی‌آلدهید با روش ELISA، کیت‌های ساخت شرکت فاین تست (Finetest, China) و با استفاده ازدستگاه الایزاریدر (Stat Fax-2100, USA) سنجش شد. کیت مالون‌دی‌آلدهید دارای حساسیت >۱۸/۷۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰۰۰-۳۱/۲۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

در این پژوهش جهت بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از آزمون HOST (Hypo Osmotic Swelling test) استفاده شد. پس از یخ‌گشایی، نمونه‌های اسپرم به داخل میکروتیوب تخلیه و به‌مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. سپس قسمت بالای میکروتیوب که حاوی رقیق‌کننده است، جداسازی و پس از آن ۱۰ میکرولیتر اسپرم به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک که حاوی فروکتوز و سیترات سدیم بوده است، اضافه شد. در این روش، اسپرم‌های با دم تاب‌خورده به‌عنوان اسپرم‌های زنده و اسپرم‌هایی که دم آنها صاف است به‌عنوان اسپرم مرده تلقی می‌شوند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه از نمونه‌های اسپرم توسط میکروسکوپ معکوس مدل CKX31 (Olympus, Japan) مجهز به دوربین عکاسی و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر تصویربرداری شد. حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید شمارش شد و درصد اسپرم‌های با دم طبیعی (تاب‌خورده) نسبت به غیرطبیعی (صاف) محاسبه شد [۱۸].

ارزیابی جنبانی اسپرم‌ها پس از یخ‌گشایی، توسط سیستم آنالیز کامپیوتری مایع منی (Computer-assisted Semen Analysis) ثبت شد. در این آزمایش فراسنجه‌های ارزیابی جنبایی مانند درصد جنبایی کل)، درصد اسپرم‌های پیش‌رونده، درصد خطی‌بودن جنبایی اسپرم، جنبایی عرضی سر، میانگین سرعت اسپرم در مسیر منحنی، میانگین سرعت اسپرم در مسیر و میانگین سرعت اسپرم در مسیر مستقیم محاسبه شد [۱۵].

برای اندازه‌گیری درصد اسپرم‌های زنده از رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین استفاده شد. اساس این رنگ‌آمیزی به این صورت است که رنگ ائوزین به اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند، درحالی‌که اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی ۲۰ ماکرولیتر از نمونه‌های اسپرم روی لام قرار گرفت سپس ۲۰ ماکرولیتر از رنگ مذکور روی آن ریخته شد. پس از ترکیب رنگ با اسپرم و تهیه گسترش، نمونه‌های اسپرم توسط میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین عکاسی مدل CKX31 (Olympus, Japan) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌هایی که صورتی کم رنگ بودند یا تنها بخشی از آن‌ها رنگ گرفته بود، اسپرم زنده در نظر گرفته شد. جهت شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف گسترش تهیه‌شده تصویربرداری شد و حداقل ۲۰۰ اسپرم مورد شمارش قرار گرفت [۱۵]. اطلاعات به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS (ویرایش۲۰) تحلیل شد. نرمال‌بودن داده‌ها با آزمون کلوموگروف اسمیرنوف بررسی شد. مقایسه میانگین گروه‌های مورد آزمایش با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده به‌همراه محاسبات آماری مربوطه به‌صورت میانگین± خطای معیار میانگین گزارش شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج افزودن سطوح ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید به رقیق‌کننده بر فراسنجه‌های جنبانی اسپرم در جدول ۱ گزارش شده است. در مقایسه با گروه شاهد، افزودن گلیسیریزیک اسید به رقیق‌کننده، درصد جنبایی کل، درصد اسپرم‌های پیش‌رونده، جنبایی عرضی سر، میانگین سرعت اسپرم در مسیر منحنی، میانگین سرعت اسپرم در مسیر و میانگین سرعت اسپرم در مسیر مستقیم را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($p<۰/۰۵$). تفاوتی بین گروه‌های آزمایشی از نظر جنبایی خطی اسپرم مشاهده نشد.

جدول ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف گلیسیریزیک اسید بر جنبانی و فراسنجه‌های سرعتی اسپرم گاو نژاد هلشتاین[1]

گروه/ فراسنجه	TM (درصد)	PM (درصد)	LIN (درصد)	ALH (میکرومتر)	VCL (میکرومتر بر ثانیه)	VAP (میکرومتر بر ثانیه)	VSL (میکرومتر بر ثانیه)
شاهد (صفر میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید)	۳۴/۵۲ ^{d}	۲۵/۹۵^{d}	۰/۴۱	۱/۵۱^{d}	۳۸/۱۹^{d}	۱۹/۱۸^{d}	۱۱/۵۷^{d}
۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید	۶۳/۵۴^{a}	۴۴/۱۸^{a}	۰/۳۸	۲/۲۰^{a}	۵۹/۳۸^{a}	۴۳/۵۲^{a}	۲۴/۰۴^{a}
۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید	۷۱/۸۰^{ab}	۵۲/۳۳^{ab}	۰/۳۶	۳/۸۱^{ab}	۶۹/۸۱^{ab}	۵۲/۸۳^{ab}	۳۰/۲۲^{ab}
۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید	۸۵/۲۵^{abc}	۶۱/۵۲^{abc}	۰/۴۰	۵/۱۱^{abc}	۹۲/۵۰^{abc}	۶۴/۴۴^{abc}	۴۷/۴۸^{abc}
SEM	۵/۴۴	۳/۲۸	۰/۰۸	۰/۴۵	۳/۳۸	۳/۷۱	۲/۶۱
p-value	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	۰/۰۵۷	۰/۰۰۷	۰/۰۰۸	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

۱. داده‌ها میانگینی از هشت تکرار می‌باشند.

a-c: تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف نامشابه معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

TM: درصد جنبایی کل، PM: درصد اسپرم‌های پیش‌رونده، ALH: جنبایی عرضی سر، VCL: میانگین سرعت اسپرم در مسیر منحنی، VAP: میانگین سرعت اسپرم در مسیر و VSL: میانگین سرعت اسپرم در مسیر مستقیم.

درصد یکپارچگی غشای سلولی و درصد زنده‌مانی اسپرم با افزایش سطح گلیسیریزیک اسید در رقیق‌کننده، ۲۰ به‌صورت وابسته به دوز، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵؛ جدول ۲).

براساس نتایج، افزودن سطوح ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید به رقیق‌کننده اسپرم، در مقایسه با گروه شاهد به‌صورت وابسته به دوز مصرفی، سبب کاهش معنی‌دار مالون دی‌آلدهید شد (p<۰/۰۵، جدول ۲). همسو با نتایج سایر پژوهش‌گران [۶]، پژوهش حاضر نشان داد، فرایند انجماد- ذوب سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی سلول‌های اسپرم و کاهش کمی پارامترهای حیاتی اسپرم می‌شود. پژوهش‌گران به بررسی شاخص‌های حرکتی، میزان گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم منجمد پرداختند و مشخص شده است فرایند انجماد- ذوب با تشکیل گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن و با تضعیف سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان اسپرم، سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود، که از عوامل مهم در کاهش تحرک و باروری اسپرم پس از یخ‌گشایی است [۹].

اثرات مخرب تنش‌های فیزیکی و شیمیایی غشای اسپرم در نتیجه فرایند انجماد- ذوب از یک‌طرف و نیز پایین‌بودن سطح آنتی‌اکسیدان‌های موجود در اسپرم از سویی دیگر منجر بر متمرکزشدن پژوهش‌ها بر سطح پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم در مجاورت آنتی‌اکسیدان‌های مختلف شده است. مشخص شده است فرایند انجماد- ذوب با افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم سبب تغییر یکپارچگی غشای اسپرم می‌شود [۱] و شاخص‌های میکروسکوپی اسپرم یخ‌گشایی‌شده مانند میزان تحرک و درصد زنده‌ماندن و یکپارچگی اسپرم در نتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپیدی [۵] و نیز پس از فرایند انجماد- ذوب کاهش می‌یابد [۱۵]. این امر در نتیجه تنش‌های اکسیداتیو ایجاد می‌شود که با تغییر در سیالیت غشا، سبب اختلال در تحرک اسپرم می‌شود. از سوی دیگر تغییر در سیالیت غشا به پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشای اسپرم نسبت داده شده است [۱۵].

جدو ل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف گلیسیریزیک اسید بر درصد یکپارچگی غشای سلولی، درصد زنده‌مانی و میزان مالون‌دی‌آلدهید اسپرم گاو نژاد هلشتاین

تیمار	یکپارچگی غشا (درصد)	میزان زنده‌مانی (درصد)	مالون دی‌آلدهید (نانوگرم بر میلی‌لیتر)
شاهد (۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید)	۴۲/۱۵^{d}	۴۹/۲۸^{d}	۸۴/۲۰^{d}
۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید	۶۰/۲۵^{a}	۷۰/۳۲^{a}	۶۰/۵۲^{a}
۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید	۷۸/۲۸^{ab}	۷۹/۵۱^{ab}	۳۹/۷۵^{ab}
۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید	۹۲/۶۱^{abc}	۸۸/۷۵^{abc}	۲۹/۸۴^{abc}
SEM	۵/۴۳	۴/۸۶	۳/۵۳
p-value	۰/۰۰۸	۰/۰۱۲	۰/۰۰۳

۱. داده‌ها میانگینی از هشت تکرار می‌باشند.

a-c: تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف نامشابه معنی دار است (p<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

براساس نتایج پژوهش‌های پیشین و نیز اثرات مثبت استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بر کاهش اثرات مخرب ناشی از واکنش‌های اکسیداتیو طی مدت انجماد اسپرم، مقایسه نتایج پژوهش حاضر با سایر مطالعات انجام‌شده در این زمینه نشان‌دهنده همسو بودن اطلاعات به‌دست آمده است. بررسی پژوهش‌های پیشین به استفاده گسترده‌ای از انواع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و سنتتیک و اثرات آنها در کاهش اثرات استرس‌های کسیداتیو در زمان ذخیره اسپرم و در نتیجه بهبود کیفیت منی‌های یخ‌گشایی‌شده اشاره کرده است اما در رابطه با استفاده از گلیسیریزیک اسید بر پارامترهای حیاتی اسپرم گاوهای هلشتاین مطالعات متمرکزی صورت نگرفته است.

در بررسی اثر استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در رقیق‌کننده‌های اسپرم، مشخص شد که با کاهش سطح آنزیم‌های اکسیداتیو سوپراکسید دسموتاز از ۲۰۰ واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر به ۱۰۰ واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتردر مجاورت آنتی‌اکسیدان‌ها، زنده‌مانی اسپرم‌ها به‌صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد و این خود می‌توانند به‌دلیل تأثیرات افزایش آنتی‌اکسیدان بر افزایش سیالیت غشای پلاسمایی سلول‌های اسپرم در شرایط نامطلوب و در نتیجه افزایش مقاومت اسپرم به تخریب اکروزوم دانست [۴]. بررسی کیفیت اسپرم منجمد نژادهای مختلف قوچ نشان داد درصد تحرک، حرکت پیش‌رونده و درصد اسپرهای زنده و طبیعی در نتیجه کاهش یافت که این امر به افزایش آسیب‌های اکسیداتیو DNA و تغییر فشار اسمزی در نتیجه تشکیل کریستال‌های یخ، طی فرایند انجماد نسبت داده شد [۴]. همسو با نتایج پژوهش حاضر، پژوهش‌گران نشان داده‌اند انجماد اسپرم انسان با ایجاد شوک سرمایی سبب کاهش تحرک اسپرم و کاهش یکپارچگی غشای اسپرم می‌شود. به‌علاوه مشخص شد فرایند انجماد- ذوب با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی سبب کاهش کیفیت و پارامترهای حیاتی اسپرم از نظر میزان جنبایی، درصد زنده‌مانی، یکپارچگی غشای اسپرم و سلامت آکروزوم می‌شود [۶]. در بررسی فاکتورهای میکروسکوپیک اسپرم گاومیش پس از فرایند یخ‌گشایی، گزارش شد در فرآیند انجماد و رفع انجماد در اثر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشا، مولکول‌های فعال و رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد می‌شود که تحرک پس از یخ‌گشایی، قابلیت زنده‌مانی، فعالیت آنزیمی درون‌سلولی، باروری و عملکرد اسپرم را مختل می‌کند [۱۹]. هم‌چنین بررسی فراسنجه‌های میکروسکوپی اسپرم گاو پس از فرایند انجماد- ذوب نشان داد آسیب‌های اکسیداتیو به‌دلیل تولید رادیکال‌های آزاد در طی فرایند انجماد- ذوب، یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش باروری اسپرم می‌باشد. مشخص شده است فرایند انجماد- ذوب سبب کاهش پارامترهای سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی و سرعت میانگین می‌شود و درصد تحرک پیش‌رونده، تحرک کل، درصد زنده‌مانی و میزان یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌های انجماد- یخ‌گشایی‌شده کاهش می‌یابد [۵]. بهبود پارامترهای حیاتی اسپرم اسب‌های ترکمن پس از فرایند انجماد- ذوب در نتیجه افزودن آنتی‌اکسیدان‌های درون‌سلولی مانند کاتالاز به رقیق‌کننده نیز گزارش شده است [۲۲].

هم‌چنین گزارش شده است ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند شاخص‌های حرکتی مانند میانگین شتاب در مسیر مستقیم، شتاب اسپرم در خط مستقیم و دامنه حرکت‌های جانبی اسپرم، هم‌چنین یکپارچگی غشای پلاسمایی و درصد زنده‌مانی اسپرم را به‌طور مثبتی تحت تأثیر قرار داده و بهبود بخشد [۱۶ و ۲۲]. پژوهش‌ها نشان داده است حفاظت انجمادی توسط آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند با کاهش تشکیل رادیکال آزاد، شرایط سلولی را طوری تغییر دهد که در نهایت سبب حفاظت اسپرم طی فرایند انجماد- ذوب شود.

ازآنجایی‌که پارامترهای اسپرم بر میزان لقاح مؤثر است، لذا به‌نظر می‌رسد که آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش اثرات منفی شوک‌های اکسیداتیو و نیز بهبود پارامترهای اسپرم و حفظ پارامترهای اسپرم پس از مراحل انجماد به‌طور قطع می‌توانند بر میزان لقاح مؤثر باشد. در مطالعه حاضرمشخص شد استفاده از گلیسیریزیک اسید در رقیق‌کننده مایع منی گاو نژاد هلشتاین سبب بهبود پارامترهای حیاتی اسپرم و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم پس از فرایند انجماد- ذوب می‌شود.

همسو با نتایج پژوهش حاضر مشخص شده است افزودن عصاره شیرین‌بیان به رقیق‌کننده سبب بهبود حرکت پیش‌رونده اسپرم قوچ، پس از قرارگیری در دمای پنج درجه سانتی‌گراد می‌شود [۱۰]. هم‌چنین با توجه به این‌که یک دلیل مهم در کاهش تحرک اسپرم پس از ذخیره‌سازی انجمادی افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی است، پژوهش‌گران نشان داده‌اند ترکیبات موجود در عصاره شیرین‌بیان با خواص آنتی‌اکسیدانی و کاهش اکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم سبب بهبود پارامترهای حیاتی اسپرم می‌شوند [۲۰]. پژوهش‌گران نشان داده‌اند ترکیبات موجود در عصاره شیرین‌بیان دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند و این ترکیبات می‌تواند اسپرم را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت کنند. هم‌چنین مشخص شده است عصاره شیرین‌بیان سبب بهبود لقاح آزمایشگاهی می‌شود [۲۱]. پژوهش‌ها نشان داده است ترکیبات قندی موجود در عصاره شیرین‌بیان مانند فروکتوز و ساکاروز به‌عنوان عامل فعال‌کننده اسپرم پستانداران و سبب ایجاد ثبات در غشای سلولی اسپرم در طی فرایند انجماد می‌شوند [۲۱].

نتایج این تحقیق نشان داد افزودن گلیسیریزیک اسید به‌عنوان مکمل به مایع رقیق‌کننده اسپرم می‌تواند تأثیر مثبتی بر کاهش پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از فرایند انجماد- ذوب داشته باشد. هم‌چنین اسید گلیسیریزیک موجب بهبود پارامترهای حیاتی اسپرم بعد از فرایند انجماد- ذوب می‌شود. از این‌رو می‌توان گلیسیریزیک اسید را به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در بهبود آسیب‌های ناشی از فرایند انجماد- ذوب اسپرم معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های دانشگاه پیام نور، تشکر و قدردانی می‌گردد. لازم به ذکر است این مقاله از طرح پژوهشی مصوب در جلسه شورای پژوهشی به‌شماره ۱/۱۲/۱۱۰۱۰/د دانشگاه پیام نور استان خراسان رضوی استخراج شده است.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع مورد استفاده

1. Aksoy N, Dogan Y, Iriadam M, Bitiren M, Uzer E, Ozgonul A and et al (2012) Protective and Therapeutic Effects of Licorice in Rats with Acute Tubular Necrosis. Journal of Renal Nutrition, 22(3): 336-343.
2. Asadpour R, Jafari R and Tayefi-Nasrabadi H (2012) The effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and lipid peroxidation of chilled bull spermatozoa. Iranian Journal of Veterinary Research, 13(3): 246-249.
3. Al-Daraji HJ (2013) Effect of diluent supplementation with liquorice extract on quality and storage ability of roosters' semen during liquid storage. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2(3): 878-889.
4. Ashrafi I, Kohram H and Tayefi-Nasrabadi H (2013) Antioxidant effects of bovine serum albumin on kinetics, microscopic and oxidative characters of cryopreserved bull spermatozoa. Spanish Journal of Agricultural Research, 11(3): 695-701.
5. Chatterjee S and Gagnon C (2001) Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. Molecular Reproduction and Development, 59(4): 451-458.

6. Daghighkia H, Shahbaz Zadeh R and Ashrafi I (2015) Antioxidant effect of Macrantha Satureja extraction on microscopic and biochemical parameters of bull sperm after freeze-thawing process. Animal Sciences Journal (Pajouhesh & Sazandegi), 28(108): 101-112.
7. Farhadi F, Towhidi A and Shakeri M (2015) The effect of adding different levels of zinc sulfate to semen diluent on quality of frozen-thawed sperm in bull. Iranian Journal of Animal Science, 45(4): 335-342.
8. Fu Y, Chen J, Li Y, Zheng Y and Li P (2013) Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. Food Chemistry, 141(2): 1063-1071.
9. Glasauer A and Chandel NS (2014) Targeting antioxidants for cancer therapy. Biochemical Pharmacology. 92(1): 90-101.
10. Lucio CF, Regazzi FM, Silva LCG, Angrimani DSR, Nichi M and Vannucchi CI (2016) Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. Theriogenology, 85(9): 1568-1575.
11. Mahdi AK (2010) Effects of Licorice Extract on Sperm Motility of Chilled Stored Ram Semen. Ibn Al-Haitham Journal for Pure and Applied Science, 23(1): 34-40.
12. Malekinejad H, Mirzakhani N, Razi M, Cheraghi H, Alizadeh A and Dardmeh F (2011) Protective effects of melatonin and Glycyrrhiza glabra extract on ochratoxin A-induced damages on testes in mature rats. Human & Experimental Toxicology, 30(2): 110-123.
13. Malek-Mohammadi R, Roghani M and Salami M (2015) The effect of aqueous extracts of Melissa officinalis on the oxidative stress indices in the midbrain tissue. Feyz, 19(1): 8-14.
14. Malo C, Gil L, Cano R, Martínez F and Galé I (2011) Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology, 75(9): 1735-1741.
15. Mocé E and Vicente JS (2009) Rabbit sperm cryopreservation: A review. Animal Reproduction Science, 110(1-2): 1-24.
16. Mohammadian T, Khodaei Motlagh M and Zare Shahneh A (2016) The effect of using different levels of royal jelly in semen extender on some quality and quantity parameters of Mahabadi goat semen. Iranian Journal of Animal Science, 46(4): 457-463.
17. Mostek A, Dietrich MA, Słowińska M and Ciereszko A (2017) Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. Theriogenology, 92: 95-102.
18. Osipova VP, Berberova NT, Gazzaeva RA and Kudryavtsev KV (2016) Application of new phenolic antioxidants for cryopreservation of sturgeon sperm. Cryobiology, 72(2): 112-118.
19. Sadeghipanah H, Naijian HR and Masoudi R (2015) Evaluation of antioxidant effects of butylated hydroxytoluene in the soybean lecithin based extender on frozen-thawed semen quality in Markhoz goat. Iranian Veterinary Journal, 11(2): 77-126.
20. Shahbazzadeh R, Daghigh-Kia H, Moghaddam G, Dehghan G, Hosseinkhani A and Ashrafi I (2015) Effect of different levels of Satureja sahendica alcoholic extract on the quality of freeze-thawed Holstein bull spermatozoa. Animal Science Researches (Agricultural Sciences), 25(1): 13-24.
21. Shin S, Jang JY, Choi B, Baek IJ, Yon JM, Hwang BY and et al (2008) Licorice extract does not impair the male reproductive function of rats. Experimental Animals, 57(1): 11-7.
22. Tung NH, Shoyama Y, Wada M and Tanaka H (2015) Two activators of in vitro fertilization in mice from licorice. Biochemical and Biophysical Research Communications, 467(2):447-450.
23. Tsao SM and Yin MC (2017) Retraction of "Antioxidative and Antiinflammatory Activities of Asiatic Acid, Glycyrrhizic Acid, and Oleanolic Acid in Human Bronchial Epithelial Cells". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(15): 3251.
24. Vilela CG, Marquez JM, Graham JK and Barfield JP (2017) Cryopreservation of bison epididymal sperm: A strategy for improving post-thaw quality when collecting sperm in field conditions. Theriogenology, 89: 155-161.
25. Wang C, Jin Y and Jin Y (2016) Promoting effect of licorice extract on spermatogonial proliferation and spermatocytes differentiation of neonatal mice in vitro. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 52(2): 149-155.