Archive of SID

تأثیر مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در حفظ و بهبود عملکرد فراسنجه‌های اسپرم (مطالعه مروری)

مهدی نظری*

تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی

چکیده

انجماد اسپرم برای مدیریت تولیدمثلی و به کارگیری روش‌های حفظ باروری از اهمیت بیشتری برخوردار است. علی‌رغم موفقیت در انجماد اسپرم، این روش معمولاً باعث تغییرات جدی و مخرب در عملکرد اسپرم می‌شود. مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها، بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی مایع منی و اسپرم، و کاستن اثرات مخرب ROS تولیدی ناشی از شوک سرمایی، به محیط منی، طی انجماد اضافه می‌شوند. تاکنون مطالعات بسیاری در مورد اثرات مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در انجماد برای بهبود کیفیت مایع منی پس از یخ‌گشایی صورت گرفته است. هدف از این مطالعه افزایش درک نقش مکمل‌های آنتی‌اکسیدان‌ها در افزایش مقاومت اسپرم در برابر آسیب‌های اکسیداتیو است.

واژگان کلیدی: انجماد، اسپرم، استرس اکسیداتیو

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: mahdi.na1994@gmail.com

مقدمه

انجماد اسپرم به عنوان یک روش مهم و ارزشمند در زمینه کمک به تولیدمثل به شمار می آید (۱-۴). اگرچه منی منجمد/یخ‌گشایی شده دارای مزایای زیادی برای تولیدمثل است، اما گزارش های زیاد بیانگر مخرب جدی در عملکرد اسپرم در نتیجه فرآیندهای سردسازی، انجماد و یخ‌گشایی است (۵). آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی که به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک یا مکمل‌های غذایی نیز شناخته می‌شوند شامل گلوتاتیون (GSH)، اورات، اسید اسکوربیک، ویتامین E (توکوفرول)، کاروتنوئیدها (β-کاروتن)، اوبی‌کینون‌ها، تورین و هیپوتورین، سلنیوم و روی است (۶). تولید reactive oxygen species (ROS) مانند پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)، آنیون‌های سوپراکسید ($O2^-$) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^-)، در مقادیر فیزیولوژیکی نقش مهمی در عملکرد اسپرم در طول ظرفیت پذیری اسپرم، واکنش آکروزومی و اتصال به زوناپلوسیدا دارد (۷).

www.SID.ir

Archive of SID

قرار گرفتن در معرض غلظت‌های بالای ROS باعث اختلال در غشاء میتوکندری، غشاء پلاسمایی و همچنین قطعه‌قطعه شدن کروموزومی می‌شود که این امر باعث کاهش تحرک و زنده ماندن اسپرم می شود (۸). یکی از مهمترین دلایل آسیب سلول های اسپرم ناشی از ROS حاصل از تنش اکسیداتیو اسیدهای چرب اشباع‌نشده غشاء اسپرم است که منجر به پراکسیداسیون لیپیدها (LPO) می‌شود(۹). LPO نفوذپذیری و سیالیت غشاها را تغییر داده و منجر به از دست دادن برگشت‌ناپذیر تحرک، نشت آنزیم‌های داخل سلولی آسیب DNA اسپرم یا مشکلات نفوذ تخمک و هم جوشی اسپرم و تخمک می‌شود (۱۰).

در شرایط عادی، برای خنثی‌سازی اثرات مخرب ROS، اسپرم‌ها و پلاسمای منی دارای تعدادی سیستم آنتی‌اکسیدانی هستند که اثرات مخرب ROS را خنثی کرده و از آسیب سلولی داخلی جلوگیری می‌کنند(۱۱). عدم تعادل بین حضور ROS و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم دلیل اصلی ایجاد آسیب در اسپرم است (۱۲).

ساختار خاص غشاء پلاسمائی اسپرم‌ها، تعداد زیاد میتوکندری‌ها، سیتوپلاسم کم و آنتی‌اکسیدان کم در سیتوپلاسم اسپرم، آنها را در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد آسیب‌پذیر می‌کند (۱۳). آنتی‌اکسیدان‌ها عوامل اصلی دفاعی در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد هستند (۱۴). افزودن کلسترول به غشاء پلاسمای اسپرم از طریق افزایش یکپارچگی غشاء و آبگریز بودن و کاهش استرس اسمزی، باعث افزایش مقاومت اسپرم در برابر صدمه می‌شود (۱۵). علاوه بر این، آلبومین سرم گاوی (BSA) باعث افزایش تحرک و زنده ماندنی اسپرم‌ها پس از نگهداری طولانی‌مدت در دمای پایین و انجماد می‌شود (۱۶). همچنین، وقتی BSA و زرده تخم‌مرغ به ماده رقیق‌کننده اضافه شود، یک محافظت خوب از غشاء از نظر مقاومت در برابر شوک فشاراسمزی پایین (هیپواسموتیک) حاصل خواهد شد (۱۷). مشخص شده که افزودن سیکلودکسترین کلسترول (CLC) به صورت جداگانه یا همراه با BSA، به اسپرم بز قبل از انجماد باعث افزایش سرعت حرکت، زنده مانی و یکپارچگی آکروزوم اسپرم بعد از انجماد و ذوب می‌شود. بسیاری از پژوهشگران بر روی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در واسطه‌های انجماد متمرکزشده‌اند تا اثرات منفی ROS را بر روی اسپرم کاهش دهند (۱۸). هدف اصلی این مطالعه، بررسی یافته‌های مطالعات حاصل از نقش مثبت آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در ممانعت از آسیب به اسپرم در طی فرآیند انجماد/ فرآیند می‌باشد.

مکمل آنتی‌اکسیدان در رقیق‌کننده‌های انجماد

ویتامین E (Trolox/ آلفا توکوفرول)

ویتامین E یک آنتی‌اکسیدان چربی دوست (لیپوفیلیک) بسیار قوی است که در غشاء سلول قرار دارد و می‌تواند پیوندهای کووالانسی را که ROS بین زنجیره‌های جانبی اسیدهای چرب در لیپیدهای غشایی ایجاد کرده بشکند (۱۹). افزودن ویتامین E همراه با ویتامین C به محیط رقیق کننده منی قوچ باعث افزایش بقا و پارامترهای کیفی اسپرم‌های سرد شده می‌شود. نتایج بررسی حاکی از آن است که افزودن ویتامین E بر مایع منی قوچ‌های قزل، باعث بهبود حرکت و زنده ماندن اسپرم‌ها قبل و بعد از انجماد شد (۲۰).

آلفا توکوفرول قوی‌ترین ترکیب آنتی‌اکسیدانی محلول در لیپید است که رادیکال‌های چربی را خنثی می‌کند. بنابر این یکی از عوامل اصلی محافظت در برابر غشاء در برابر ROS و پراکسیداسیون لیپیدها بدون تأثیر بر تولید ROS است (۷). آلفا توکوفرول می‌تواند سلول‌ها را از آسیب اکسیداتیو هم در داخل بدن و هم در شرایط *in vitro* محافظت کند. افزودن آلفا توکوفرول در پستانداران مختلف (خرگوش، اسب، گاو، گراز و قوچ) با هدف بهبود کیفیت مایع منی، نتایج متناقضی داشت (۳). در انسان، تجویز خوراکی این آنتی‌اکسیدان (۲۰۰ میلی‌گرم در روز به مدت ۳ ماه) میزان لقاح آزمایشگاهی را بهبود بخشید و بنابراین می‌تواند به عنوان مادهٔ درمانی برای درمان ناباروری مردان مرتبط با ROS استفاده شود. ویتامین E در هنگام انجماد کامل اسپرم گاو و همچنین در منی گراز مایع که در دمای ۱۹ °C نگهداری می‌شود، باعث حفظ یکپارچگی غشاء پلاسمائی شد (۲۱). افزودن ویتامین E به محیط رقیق کننده باعث افزایش حرکت اسپرم پس از ذوب شده و یکپارچگی DNA اسپرم را در انزال‌های نورموزواسپرمی و آستنوزواسپرمی حفظ کرده و در نهایت منجر به افزایش میزان باروری شد. در مطالعه‌ای درباره تأثیر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، Askari و همکاران (۱۹۹۴) نشان

www.SID.ir

Archive of SID

دادند که ویتامین E میزان تورم هیپواسموتیک (HOS) و حرک اسپرم منجمد شده را پس از ذوب کمی بهبود می-بخشد (۲۲). علاوه بر این مکمل توکوفرول در غلظت ممکن است با کاهش پراکسیداسیون لیپید و کاهش بیان ژن‌های آپوپتوز با کاهش قطعه قطعه شدن DNA، اسپرم را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت کند(۱۹). اثر توکوفرول ممکن است با غلظت آن تغییر کند، این ماده ممکن است بجای یک آنتی‌اکسیدان در غلظت‌های بالا بعنوان یک محرک اکسیداسیون عمل کند (۲۳).

ترولوکس Trolox (۶- هیدروکسی- ۸، ۷، ۵، ۲- تترامتیل کرومان-۲- اسید کربوکسیلیک)

ترولوکس یک آنالوگ ویتامین E محلول در آب با ظرفیت بالا برای جذب رادیکال‌های آزاد است (Mickle and Weisel 1992). ترولوکس در محدوده ۱/۱- ۰ میلی‌مول با جلوگیری از افزایش ROS داخل سلولی و پراکسیداسیون لیپیدها و همچنین جلوگیری از آسیب DNA، اثر محافظتی بر اسپرم ذوب‌شده گوزن قرمز دارد. پژوهشگران گزارش دادند که Trolax یک مکمل رقیق‌کننده مناسب برای انجماد اسپرم‌های اپیدیدیم گوزن، حداقل در محدوده میلی‌مول پایین است (۲۴) که یافته‌های آنها مطابق با یافته‌های Ferna´ndez-Santos و همکاران (۲۰۰۷) بود (۲۵).

محققین یک اثر محافظتی وابسته به دوز Trolox بر تحرک، فعالیت میتوکندریایی و کیفیت غشاء اسپرم منجمد شده خوک ۳۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از ذوب شدن یافتند. همین نویسندگان نشان دادند که ترولوکس زنده مانی اسپرم منجمدشده گراز پس از ذوب شدن تأثیر مثبت داشت. علاوه بر این نشان داده شد که افزودن ۴۰ میلی مول ترولوکس به محیط انجماد قبل از انجماد آن موجب افزایش تحرک اسپرم پس از ذوب بویژه تحرک پیش‌رونده شد. مطالعه دیگری نشان داد که افزودن ۴۰/ ۲۰ میکرومول ترولوکس به رقیق‌کننده انجماد در نمونه منی الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی منجر به بهبود نرخ زنده مانی و پتانسیل غشاء میتوکندری شد. در مورد بهبود یکپارچگی DNA بهترین دوز ترولوکس به ترتیب ۲۰ و ۸۰ میلی مولار در نمونه الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی بود. افزودن ۴۰ میکرومول ترولوکس به محیط انجماد منجر به کاهش ۱۲ درصدی سلول‌های آپاپتوز دیررس شد (۲۶).

گلوتاتیون

گلوتاتیون (GSH) (-L-C-گلوتامیل – L سیستئینیل گلیسین) اصلی‌ترین ترکیب غیرپروتئینی تیول در سلول‌های پستانداران است که مستقیما در خنثی‌سازی ROS شرکت داشته و همچنین آنتی‌اکسیدان‌های برون‌زایی چون ویتامین C و E را در بدن حفظ می‌کند (۱۱). گروه‌های سولفیدریل GSH از سلول در برابر اکسیدان، الکتروفیل‌ها و رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند (۷). گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) از GSH برای احیاء هیدروژن پراکسید به H_2O و لیپوپراکسیدها به الکل‌های آلکیل استفاده می‌کند. GSH می‌تواند از طریق فرم اکسیدشده آن (GSSG) توسط گلوتاتیون ردوکتاز (GSR) که فعالیت آن ناشی از استرس اکسیداتیو است، بازسازی شود (۱۱). محتوی GSH و ظرفیت دفاعی آنتی‌اکسیدانی احتمالاً به دلیل استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی در طول فرایند انجماد- ذوب تغییر می‌کند (۱۱). بنابر این افزودن GSH به رقیق کننده انجماد نتایج متغیری دارد. افزودن ۵ میلی‌مو GSH به محیط انجماد اسپرم انسان باعث یکپارچگی DNA می‌شود اما در کاهش پراکسیداسیون لیپید و افزایش حرک اسپرم ناکارآمد است. اخیراً محققین نشان دادند که افزودن مکمل GSH به محیط انجماد باعث کاهش سطح ROS اسپرم انسانی و افزایش سطح گروه‌های سولفیدریل در پروتئین‌های غشایی می‌شود. اما علی رغم افزایش درصد اسپرم‌های متحرک، افزودن GSH به محیط ذوب هیچ تأثیری بر زنده‌مانی نداشت(۱۱). زمان طولانی در معرض GSH و اثرات مخرب اصلی بر غشاء اسپرم قبل از رقیق‌سازی در ماده رقیق‌کننده ذوب، ممکن است این تفاوت در زنده‌مانی را روشن کند.

ویتامین C

ویتامین C (اسید اسکوربیک) یک آنتی‌اکسیدان محلول در آب است که ظرفیت بالایی در از بین بردن رادیکال‌های اکسیژن دارد. ویتامین C اثرات H_2O_2 بر DNA را خنثی کرده، ویتامین E غیرفعال را بازیافت می‌کند و پراکسیداسیون لیپید را کاهش می‌دهد (۲۷). آسکوربیک اسید، ترشح شده از غدد وزیکول سمینال آنتی‌اکسیدان اصلی موجود در پلاسمای منی مردان بارور است که تا ۶۵٪ از کل ظرفیت آنتی‌اکسیدان را بخود اختصاص می-دهد. در انسان، غلظت کم اسید اسکوربیک در پلاسمای

www.SID.ir

Archive of SID

منی با تعداد کم اسپرم، افزایش تعداد غیرطبیعی، کاهش حرکت و آگلوتیناسیون آن همراه است (۲۷). افزودن اسکوربیک اسید به رقیق‌کننده باعث تحرک، یکپارچگی آکروزوم و بهبود غشاء اسپرم گاو شده و منجر به کاهش GSH-Px در مقابل افزایش GSH می‌شود (۲۸). احتمالاً به دلیل آسیب بیشتر DNA در مردان نابارور نسبت به مردان بارور، افزودن اسید اسکوربیک قبل از انجماد باعث کاهش آسیب به DNA در مردان نابارور می‌شود (۲۹).

اسید اسکوربیک در محیط بسیار اکسیداتیو به‌سرعت به دهیدرواسکوربیت غیرفعال اکسید می‌شود. به دلیل بی‌ثباتی آن، حفظ فعالیت‌های مهارکنندگی آن در زمان قرار گرفتن اسپرم در محیط‌های با اکسیداسیون بالا برای مدت‌زمان طولانی، دشوار است. اسکوربیک اسید ۲- O آلفا گلوکوزید (AA-2G)، که با مقاومت بالا در برابر تخریب حرارتی و اکسیداتیو در محلول خنثی و شرایط غیراحیاء کننده مشخص می‌شود، توسط یاماماتو و همکاران در سال ۱۹۹۰سنتز شد. افزودن AA-2G به محیط انجمادی باعث بهبود کیفیت اسپرم منجمدشده گراز پس از ذوب از طریق محافظت از اسپرم در برابر آسیب DNA و پراکسیداسیون لیپید ناشی از استرس اکسیداتیو در طی انجماد شد (۳۰). علاوه بر این، اخیراً اثر محافظتی AA-2G بر حرکت اسپرم انسان از طریق فرآیند انجماد-ذوب گزارش‌شده است (۳۱). ویتامین C می‌تواند بعنوان یک پرواکسیدان عمل کند و در حضور فلزات انتقالی می‌تواند مخرب باشد. نشان داده شده است که ویتامین C به ترتیب در ۲/۵ میلی‌مول و ۶-۰/۲ میلی‌مول در اسپرم گاو و انسان اثر زیان‌باری بر تحرک اسپرم منجمد و ذوب‌شده گاو و نورموزواسپرمی انسان داشت. اما افزودن ۵ میلی‌مول از آن اثر محافظتی معنی‌داری علیه پراکسیداسیون لیپید در اسپرم‌های منجمد گاوی با کیفیت خوب، ایجاد کرد (۳۲).

L- سیستئین

L- سیستئین (L-Cys) یک اسیدآمینه غیرضروری با وزن مولکولی کم و حاوی تیول است. نشان داده شده است که براحتی در غشا سلول نفوذ می‌کند تا در بیوسنتز GSH داخل سلولی شرکت کند. این ماده از طریق مهار غیرمستقیم رادیکال‌های آزاد از لیپیدها و پروتئین‌های غشایی محافظت می‌کند. همچنین بعنوان یک تثبیت‌کننده غشاء و بازدارنده ظرفیت اسپرم عمل می‌کند (۳۳). نشان داده شده است که افزودن L-Cys به رقیق کننده باعث افزایش تحرک و مورفولوژی اسپرم گاو (۳۴)، قوچ (۳۵) و بز (۳۶) شده و در گراز، باعث بهبود قابلیت زنده مانی، حفظ ساختار کروماتین و یکپارچگی غشاء اسپرم پس از ذوب شدن می‌شود (۳۷).

افزودن L- سیستئین به‌تنهایی یا در ترکیب با DHA (اسید دوکوزا هگزانوئیک) به زرده تخم‌مرغ باعث بهبود قابل توجه حرکت و یکپارچگی غشاء آکروزوم اسپرم گراز می‌شود. Çoyan و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که سیستئین فعالیت میتوکندری اسپرم منجمد شده قوچ مرینوس پس از ذوب را بهبود می‌دهد (۳۳). علاوه بر این، L-Cysis پس از انتقال به سلول‌ها، به تورین متابولیزه می‌شود. تورین پس از ترکیب با اسید چرب در غشای پلاسما به آسیل تاورین تبدیل می‌شود که باعث بهبود خواص سورفاکتانت و تنظیم اسمزی غشای اسپرم می‌شود (۳۸).

ارگوتیونین

ارگوتیونئین یک تیول مهم با وزن مولکولی پایین است که باعث کاهش اکسیژن، هیدروکسیل و پراکسیل رادیکال‌ها می‌شود. در برخی از بافت‌ها با غلظت میلی مولار وجود دارد و با متابولیسم آهن، مس و روی ارتباط دارد. Çoyan و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که افزودن غلظت ارگوتیونین به مایع رقیق‌کننده منی قوچ باعث حفظ یکپارچگی DNA اسپرم در برابر آسیب ناشی از سرما و نیز باعث بهبود حرکت اسپرم منجمدشده پس از ذوب می‌شود (۳۳).

ملاتونین

ملاتونین (N-استیل-۵-متوکسیتریپتمین)، یکی از مشتقات تریپتوفان است که عمدتاً در طول شب در واکنش به تغییرات سطح نور توسط غده صنوبری ساخته می‌شود. ملاتونین نقشی اساسی در تنظیم چرخه بیداری-خواب شبانه‌روزی، تقویت سیستم ایمنی بدن و همچنین تنظیم تولیدمثل فصلی دارد. علاوه بر این می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و GSH-Px را تحریک کند. منی انسان حاوی ملاتونین است و گفته شده است که اسپرم دارای گیرنده غشای ملاتونین است . ملاتونین انواع

www.SID.ir

Archive of SID

مختلف اکسیژن و نیتروژن واکنش‌پذیر را بصورت *in vivo* و *in vitro* از بین می‌برد، که حاکی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی قوی آن است. طبق یافته های برخی مطالعات، ملاتونین ویژگی‌های اسپرم را نه‌تنها در بز، موش، گراز، قوچ و موش بلکه در اسپرم انسان نیز بهبود می‌بخشد. بر اساس یافته های محققین، تاثیر ملاتونین بر تمام پارامترهای تحرک اسپرم وابسته به دوز آن می‌باشد. Martin Hidalgo و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که به‌استثنای نسبت اسپرم زنده با آکروزوم سالم، ۱ میلی مول ملاتونین موفق به بهبود عملکرد منی گراز ذخیره‌شده در ۱۷ درجه سانتی‌گراد در ۷ روز نشد(۳۹).

Succu و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که افزودن مکمل ملاتونین به رقیق‌کننده منی قوچ، اسپرم را از صدمات انجماد محافظت می‌کند. کارآمدترین غلظت آن برای حفظ زنده‌مانی پس از ذوب، تحرک، افزایش غلظت ATP داخل سلولی، یکپارچگی DNA و توانایی باروری ۱ میلی مول است (۴۰).

سلنیوم

سلنیوم یک ماده مغذی ضروری شناخته شده در سلول‌های انسان و حیوان است. نقش مثبت آن در سیستم بیولوژیکی مشتمل بر سم‌زدایی از رادیکال‌های آزاد با فعال‌سازی گلوتاتیون پراکسیداز، آنزیم اصلی در برابر استرس اکسیداتیو است و عملکرد آن بعنوان یک کوفاکتور گلوتاتیون سنتتاز است. نشان داده شده است که در کشت سلول، سلنیوم به شکل سلنیت است که برای محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو محیط را سم‌زدایی می‌کند (۴۱). مشخص‌شده است که مکمل‌های غذایی سلنیوم باعث تقویت عملکرد تولیدمثلی در موش‌ها، میش و گاو و همچنین باعث بهبود کیفیت مایع منی پس از ذوب در قوچ Barbari می‌شود (۴۲). تامین ناکافی سلنیوم باعث مشکلات تولیدمثلی شده و کیفیت اسپرم در رت، موش، خوک، گوسفند و گاو را کاهش می‌دهد. شایان ذکر است که مصرف زیاد سلنیوم کیفیت منی را کاهش می‌دهد. علاوه بر این افزودن سلنیوم قبل از انجماد به منی گاو باعث بهبود حرکت اسپرم می‌شود (۴۱). محققین نشان دادند که افزودن ۱ و ۲ میلی‌لیتر سلنیوم به رقیق کننده منی گاومیش باعث بهبود قابل‌توجه تحرک اسپرم، زنده مانی، حفظ یکپارچگی غشاء و بهبود ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی منی و همچنین کاهش آسیب DNA اسپرم‌ها پس از فرآیند انجماد- ذوب می‌شود. سلنیوم در سطوح بالای ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثرات مخربی بر پارامترهای اسپرم دارد (۴۱).

جدول۱- تاثیر مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی مختلف بر کیفیت فراسنجه‌های اسپرم در گونه های مختلف

مکمل آنتی‌اکسیدانی	گونه	نوع مصرف	دمای نگهداری اسپرم	نتایج	منبع
ویتامینE	قوچ قزل	افزودن به رقیق کننده	دمای سردسازی	بهبود تحرک و زنده‌مانی	(AminiPour eat all, 2013)
ویتامین E	انسان	خوراکی	دمای محیط	بهبود لقاح	(Askari eat all, 1994)
ویتامین E	گاو	افزودن به رقیق کننده	منجمد و یخ‌گشایی	حفظ یکپارچگی غشا پلاسمایی	(Cerolini eat all, 2000)
ویتامین E	گراز	افزودن به رقیق کننده	۱۹درجه سانتی‌گراد	حفظ یکپارچگی غشا پلاسمایی	(Cerolini eat all, 2000)
ترولوکس	گراز	افزودن به رقیق کننده	بعد از یخ‌گشایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد	بهبود تحرک، زنده‌مانی، فعالیت میتوکندری	(Bajpai eat all, 2003)
گلوتاتیون	انسان	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	حفظ یکپارچگی DNA	(Gadea eat all, 2011)
ویتامین C	گاو	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	حفظ تحرک، یکپارچگی آکروزوم و بهبود غشاء	(Hu eat all, 2010)
ویتامین C	انسان	افزودن به مایع منی	طی انجماد و یخ‌گشایی	کاهش آسیب DNA	(Branco eat all, 2010)
ویتامین C	گراز	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	کاهش آسیب DNA	(Yoshimoto eat all, 2008)
ویتامین C	گاو	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	کاهش پراکسیداسیون لیپید	(Jenkins eat all, 2001)
L- سیستئین	گراز	افزودن به رقیق کننده به همراه اسید دوکوزا هگزانوئیک	طی انجماد و یخ‌گشایی	یکپارچگی غشا آکروزومی	(Szcześniak eat all, 2003)
L- سیستئین	گاو، قوچ و بز	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	افزایش تحرک و کاهش ناهنجاری	(Bilodeau eat all, 2001., Bucak

www.SID.ir

Archive of SID

				مورفولوژی	eat all, 2008., Uysal eat all, 2007)
L- سیستئین	گراز	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	زنده مانی، حفظ ساختار کروماتین و یکپارچگی غشاء اسپرم	(Szcześniak eat all, 2003)
ارگوتیونین	قوچ	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	حفظ یکپارچگی DNA	(Çoyan eat all, 2012)
ملاتونین	گراز	افزودن به رقیق کننده	نگهداری در ۱۷ درجه سانتی‌گراد	افزایش زنده‌مانی و افزایش اسپرم با آکروزوم سالم	(Martı´nHidalgo eat all, 2011)
ملاتونین	قوچ	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	کاهش آسیب‌های انجمادی	(Succu eat all, 2011)
سلنیوم	قوچ	مکمل غذایی	طی انجماد و یخ‌گشایی	بهبود کیفیت مایع منی	(Kumar eat all, 2011)
سلنیوم	گاو	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	افزایش تحرک	(Zhang eat all, 2006)
سلنیوم	گاومیش	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	بهبود تحرک، زنده مانی، حفظ یکپارچگی غشاء، همچنین کاهش آسیب DNA اسپرم‌ها و بهبود ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی منی	(Zhang eat all, 2006)

مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهی

جنیستئین

جنیستئین یک ایزوفلاون موجود در سویا و سایر حبوبات است که فعالیت شبه-استروژنی داشته و فعالیت تیروزین کیناز را مهار می‌کند. تأثیر مستقیمی بر ظرفیت پذیری و واکنش آکروزومی اسپرم دارد. جنیستئین اثر آنتی‌اکسیدانی محافظتی بر یکپارچگی DNA اسپرم دارد. افزودن جنیستئین به ماده محافظ انجماد اثر محافظتی آنتی‌اکسیدانی در اسپرم منجمد شده انسان پس از ذوب‌شدن دارد. این باعث کاهش تولید ROS و بهبود تحرک و زنده مانی اسپرم می‌شود. همچنین آسیب ناشی از فرآیند انجماد به مولکول DNA را کاهش می‌دهد (۴۳). غلظت زیاد جنیستئین باعث کاهش نسبت اسپرم‌های متحرک موش‌ها می‌شود که این اثر در اسپرم انسان نیز تأییدشده است(۲۶).

رزوراترول و یا کوئرستین

ترانس رزوراترول و کوئرستین به ترتیب پلی فنول‌های غیرفلاونوئیدی و فلاونوئیدی هستند که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قدرتمندی بوده و می‌توانند با مهار رادیکال‌های آزاد و کیلات کاتیون‌های دو ظرفیتی عمل کنند. این آنتی‌اکسیدان‌ها علاوه بر توانایی خود در مهار تشکیل ROS توسط سیستم های آنزیمی و غیرآنزیمی، با توجه به زمان قرار گرفتن در معرض و غلظت پلی فنول، برای حفظ عملکرد طبیعی سلول، باعث ترشح کلسیم در سلول می‌شوند (۴۴). بنابر این اسپرم‌ها را از ظرفیت پذیری زودرس و واکنش آکروزومی در هنگام ذخیره‌سازی حفظ می‌کنند. در اسپرم قوچ، افزودن رزوراترول یا کوئرستین (۲۰-۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای هر ترکیب) به ماده رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ- گلیسرول باعث کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری می‌شود که برای اسپرم مفید است (۱۴). اخیرا، محققین دریافت که افزودن ۵۰ میکرومول کوئرستین باعث بهبود حرکت و زنده‌مانی اسپرم و کاهش آسیب به DNA اسپرم پس از ذوب می‌شود. کوئرستین با محافظت از اسپرم در برابر آسیب ناشی از H_2O_2 بر پارامترهای اسپرم و پراکسیداسیون لیپیدها باعث کاهش سطح MDA و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در موش صحرایی شد (۴۵)

عصاره‌های آبی

Rhodiola sacra یا گیاه ریشه طلایی (RSAE)

عصاره آبی *Rhodiola sacra* از ریشه‌های L *Rhodiolarosea*، (Crassulaceae)، تیره‌ای از گیاهان چینی است که در بسیاری از تحقیقات بعنوان آنتی‌اکسیدان استفاده‌شده است. RSAE دارای خاصیت مهارکنندگی قوی در برابر رادیکال آنیون سوپر اکسید است و از پراکسیداسیون لیپید جلوگیری می‌کند (خواص آنتی‌اکسیدانی RSAE بطورکلی برای بسیاری از سلول‌های سوماتیک وجود دارد). محققین نشان دادند که افزودن RSEA با و یا بدون گلیسرول به رقیق‌کننده انجماد منی گراز علاوه بر بهبود کیفیت اسپرم، تأثیر مهمی بر غلظت MAD و GSH آن دارد. به همین

www.SID.ir

Archive of SID

ترتیب، غلظت مطلوب RSEA در رقیق‌کننده ۴ تا ۸ میلی-گرم بر میلی‌لیتر با گلیسرول و بدون گلیسرول متغیر بود. افزودن ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RSEA تاثیر بیشتری بر کیفیت اسپرم رقیق‌شده بدون گلیسرول افزوده شده به رقیق‌کننده حاوی گلیسرول داشت (۴۶).

رزماری

رزماری (*Rosmarinus officinalis*) یک گیاه چند ساله از خانواده Lamiaceae با منشأ مدیترانه‌ای است. این گیاه دارای اسید کارنوزیک آندروسمنیک (carnosic androsmanic) است که نقش مهمی در عملکرد آنتی‌اکسیدانی این گیاه دارد. اخیرا اثرات افزودن رزماری به رقیق‌کننده ماده منجمد کننده منی در چندین گونه از جمله گراز سگ و گوسفند گزارش‌شده است. اثرات آنتی‌اکسیدانی رزماری باعث افزایش مقاومت سلول‌های کبدی موش در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود. محققین نشان داد که افزودن رزماری به رقیق‌کننده انجمادی باعث بهبود حرکت و جلوگیری از پراکسیداسیون اسپرم‌های اپیدیدیم گراز می‌شود و این نشان می‌دهد که بین غلظت رزماری و غلظت MDA ارتباط معنی‌داری وجود دارد. علاوه بر این افزودن رزماری باعث بهبود پارامترهای کیفی مایع منی گراز شد. دقیق‌کیا و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند افزودن ۱۰ گرم بر میلی‌لیتر عصاره رزماری به ماده رقیق کننده منی گاو قبل از انجماد باعث بهبود زنده مانی، حرکت و سرعت متوسط مسیر و همچنین کاهش پراکسیداسیون لیپید پس از ذوب شد(۴).

جدول۲- تاثیر مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهی مختلف بر کیفیت فراسنجه‌های اسپرم در گونه های مختلف

مکمل آنتی‌اکسیدانی گیاهی	گونه	نوع مصرف	دمای نگهداری اسپرم	نتایج	منبع
جنیستئین	انسان	افزودن به همراه ماده محافظ سرمایی در رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	بهبود تحرک، زنده‌مانی اسپرم، کاهش تولید ROS و کاهش آسیب DNA	(Thomson eat all, 2009)
رزوراترول	قوچ	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری	(Silva eat all, 2011)
کوئرسین	موش	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید و مالون‌دی‌آلدهید و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی	(Daneshvar eat all, 2013)
عصاره‌های آبی	گراز	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	بهبود کیفیت اسپرم و کاهش MDA و GSH	(Zhao eat all, 2009)
رزماری	گراز	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	بهبود تحرک و جلوگیری پراکیداسیون لیپید	(dahhigh kia eat all, 2014)
رزماری	گاو	افزودن به رقیق کننده	طی انجماد و یخ‌گشایی	حفظ تحرک، زنده‌مانی و کاهش پراکسیداسیون لیپید	(dahhigh kia eat all, 2014)

نتیجه‌گیری

افزودن مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی به رقیق‌کننده انجماد، اثر محافظتی بر کیفیت اسپرم گاو، قوچ، بز، گراز، سگ و انسان ایجاد کرده و اثر مخرب ROS را به حداقل رسانده و کیفیت اسپرم منجمدشده پس از ذوب را بهبود بخشیده است. البته، مطالعات نشان داده است که اثرات متفاوت مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در بهبود پارامترهای مختلف کیفی اسپرم منجمدشده پس از انجماد، به گونه جانور، ویژگی‌های محیط رقیق‌کننده و غلظت مورداستفاده بستگی دارد. این مطالعه نشان می دهد، استفاده از آنتی اکسیدانها در منجمدکردن اسپرم جانوران نه تنها جنبه بالینی دارد بلکه در حفاظت از سویه های مهم در دامپروری و حفاظت از گونه های در حال انقراض می تواند مورد توجه قرار گیرد. به هرحال، برای ارزیابی عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها و تأثیر ترکیبات آنها برای کسب شرایط مطلوب مورد نیاز برای منجمدکردن اسپرم به مطالعات بیشتری نیاز است.

منابع

1- Brotherton, J., *Cryopreservation of human semen.* Archives of andrology, 1990. **25**(2): p. 181-195.

2- O'connell, M., N. McClure, and S. Lewis, *The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function.* Human reproduction, 2002, 17(3), p. 704-709.

3- Hatamoto, L.K., et al., *Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal*

www.SID.ir

Archive of SID

plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. Theriogenology, 2006. **66**(6-7): p. 1610-1614.

4- Daghigh-Kia, H., et al., *Effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) extracts and glutathione antioxidants on bull semen quality after cryopreservation.* Spanish journal of agricultural research, 2014, 9(1): p. 105-108

5- Colás, C., et al., *Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold□shock.* Microscopy Research and Technique, 2009. **72**(8): p. 566-572.

6- Alvarez, J.G. and B.T. Storey, *Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation.* Gamete research, 1989. **23**(1): p. 77-90.

7- Agarwal, A., et al., *Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility.* Fertility and sterility, 2006. **86**(4): p. 878-885.

8- Taylor, K., et al., *Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa.* Reproductive Biomedicine Online, 2009. **18**(2): p. 184-189.

9- Sharma, R.K. and A. Agarwal, *Role of reactive oxygen species in male infertility.* Urology, 1996. **48**(6): p. 835-850.

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

11- Gadea, J., et al., *Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders.* Cryobiology, 2011. **62**(1): p. 40-46.

12- Wang, A.W., et al., *Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation.* Urology, 1997. **49**(6): p. 921-925.

13- Bollwein, H., I. Fuchs, and C. Koess, *Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa.* Reproduction in Domestic Animals, 2008. **43**(2): p. 189-195.

14- Silva, S., et al., *In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione.* Reproduction in domestic animals, 2011. **46**(5): p. 874-881.

15- Chakrabarty, J., et al., *Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation.* Cryobiology, 2007. **54**(1): p. 27-35.

16- Blesbois, E. and J. Caffin, *'Serum like'albumin of fowl seminal plasma and effects of albumin on fowl spermatozoa stored at 4° C.* British poultry science, 1992. **33**(3): p. 663-670.

17- Amidi, F., A. Farshad, and A.K. Khor, *Effects of cholesterol-loaded cyclodextrin during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa.* Cryobiology, 2010. **61**(1): p. 94-99.

18- Kirilova, I., et al., *The role of antioxidants and biologically active substances on the motility and speed parameters of buffalo bull spermatozoa after cryopreservation.* Bulgarian Journal of Agricultural Sciences, 2015.

19- Jeong, Y.-J., et al., *Effect of α-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes* .Cryobiology, 2009. **58**(2): p. 181-189.

20- AminiPour, H., A.M. Tahmasbi, and A.A. Naserian, *The influence of vitamin E on semen characteristics of ghezel rams in during.* European Journal of Zoological Research, 2013. 2.

21- Cerolini, S., et al., *Viability ,susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage.* Animal Reproduction Science, 2000. **58**(1-2): p. 99-111.

22- Askari, H., et al., *Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process.* Archives of andrology, 1994. **33**(1): p. 11-15.

23- Minaei, M.B., et al., *Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility.* Iranian journal of reproductive medicine, 2012. **10**(2): p. 99.

24- Anel-López, L., et al., *Reduced glutathione and Trolox (vitamin E) as extender supplements in cryopreservation of red deer epididymal spermatozoa.* Animal reproduction science, 2012. **135**(1-4): p. 37-46.

25- Fernández Santos, M.R., et al., *Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (Cervus elaphus hispanicus) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants.* Journal of andrology, 2007. **28**(2): p. 294-305.

26- Bajpai, M. and G. Doncel, *Involvement of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility.* Reproduction, 2003. **126**(2): p. 183-195.

27- Sierens, J., et al., *In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide□induced DNA damage in sperm.* Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis, 2002. **22**(3): p. 227-234.

28- Hu, J.-H., et al., *The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality.* Animal reproduction science, 2010. **121**(1-2): p. 72-77.

29- Branco, C.S., et al., *Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen.* Cryobiology, 2010. **60**(2): p. 235-237.

30- Yoshimoto, T., et al., *Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native pig spermatozoa frozen in an extender supplemented with ascorbic acid 2-O-α-glucoside.* Cryobiology, 2008. **57**(1): p. 30-36.

31- Jenkins, T.G., K.I. Aston, and D.T. Carrell, *Supplementation of cryomedium with ascorbic acid–2-glucoside (AA2G) improves human sperm post-thaw motility.* Fertility and sterility, 2011. **95**(6): p. 2001-2004.

32- Beconi, M., et al., *Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation.* Theriogenology, 1993. **40**(4): p. 841-851.

33- Çoyan, K., et al., *Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters.* Cryobiology, 2011. **63**(1): p. 1-6.

www.SID.ir

Archive of SID

34- Bilodeau, J.-F., et al., *Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen.* Theriogenology, 2001. **56**(2): p. 275-286.

35- Bucak, M.N. and O. Uysal, *The role of antioxidants in freezing of Saanen goat semen.* Indian veterinary journal, 2008. **85**(2): p. 148-150.

36- Uysal, O. and M. Bucak, *Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen.* Acta Veterinaria Brno, 2007. **76**(3): p. 383-390.

37- Szcześniak-Fabiańczyk, B., et al., *Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure.* Reprod Biol, 2003. **3**: p. 81-7.

38- Esteves, S.C., et al., *Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test.* International braz j urol, 2007. **33**(3): p. 364-376.

39- Martín–Hidalgo, D., et al., *The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 C.* Theriogenology, 2011. **75**(8): p. 1550-1560.

40- Succu, S., et al., *Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose□dependent manner.* Journal of pineal research, 2011. **50**(3): p. 310-318.

41- Zhang, J., D. Robinson, and P. Salmon, *A novel function for selenium in biological system: selenite as a highly effective iron carrier for Chinese hamster ovary cell growth and monoclonal antibody production.* Biotechnology and bioengineering, 2006. **95**(6): p. 1188-1197.

42- Kumar, T., et al., *Influence of oral supplementation of Zinc and Selenium on post thaw semen quality of Barbari bucks.* Journal of Animal Research, 2011. **1(1),** p: 41-46.

43- Thomson, L.K., et al., *Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis.* Human Reproduction, 2009. **24**(9): p. 2061-2070.

44- Liu, Z., et al., *Resveratrol reduces intracellular free calcium concentration in rat ventricular myocytes.* ACTA PHYSIOLOGICA SINICA-CHINESE EDITION-, 2005. **57**(5): p. 599.

45- Daneshvar, P., et al., *Effect of eight weeks of quercetin supplementation on exercise performance, muscle damage and body muscle in male badminton players.* International journal of preventive medicine, 2013. **4**(Suppl 1): p. S53.

46- Zhao, H.-w., et al., *Rhodiola sacra aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen.* Theriogenology. 2009. 71:(5), p: 849-857.

www.SID.ir