

## اثر آنتی‌اکسیدانی ملاتونین بر فراسنجه‌های کیفی منی قوچ عربی بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی

صدیقه محمدی<sup>۱\*</sup> - مرتضی ممویی<sup>۲</sup> - صالح طباطبایی و کیلی<sup>۳</sup> - جمال فیاضی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱

### چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی اثر افزودن سطوح متفاوت ملاتونین (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مول بر میلی‌لیتر) به رقیق‌کننده بر فراسنجه‌های کیفی منی قوچ عربی پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی بود. این تحقیق در پاییز ۱۳۹۴ در ایستگاه دامپروری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان انجام گرفت. نمونه‌های منی توسط دستگاه الکترواجاکولیتور از ۶ رأس قوچ با متوسط وزن  $73 \pm 3$  کیلوگرم، هفته‌ای دو بار جمع‌آوری شد. نمونه‌های اسپرم بعد از انجماد و یخ‌گشایی از نظر تحرک با کمک سامانه آنالیز رایانه‌ای اسپرم (CASA) اندازه‌گیری شد. pH، درصد اسپرم‌های زنده و ناهنجار، سلامت غشا و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام نیز بعد از فرآیند یخ‌گشایی اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که رقیق‌کننده‌ی حاوی سطح ۰/۵ میلی‌مول ملاتونین در مقایسه با گروه شاهد موجب بهبود میزان تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ عربی شد. بیشترین مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسمای منی در سطح ۱ میلی‌مولار ملاتونین مشاهده شد. اثر ملاتونین بر روی pH منی در همه سطوح اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد ایجاد نکرد. به‌طور کلی افزودن سطح ۰/۵ میلی‌مول بر میلی‌لیتر ملاتونین به رقیق‌کننده تریس موجب بهبود اغلب فراسنجه‌های کیفی اسپرم و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسمای منی پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی در قوچ عربی شد.

**واژه‌های کلیدی:** اسپرم، توان آنتی‌اکسیدانی تام، تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشا

### مقدمه

اسپرم شده و در نتیجه اسپرم‌ها آسیب‌پذیر می‌شوند. انجماد اسپرم شامل مراحل رقیق‌سازی، سردسازی، انجماد و یخ‌گشایی اسپرم است که هر کدام از این مراحل می‌توانند ساختار غشای پلاسمایی اسپرم و به تبع آن عملکرد اسپرم را تحت تأثیر قرار دهند و منجر به کاهش باروری اسپرم شوند. وقتی اسپرم طی محافظت سرمایه در معرض آسیب قرار می‌گیرد، شرایط برای تولید گونه‌های آکسیژن فعال ( $ROS^{\cdot}$ ) افزایش می‌یابد و از طرف دیگر کمبود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در منی رقیق‌شده شرایط را آسیب‌پذیرتر می‌نماید (۱۷). در طول فرآیند انجماد-یخ‌گشایی منی، تنش‌های فیزیکی و شیمیایی در غشای اسپرم به‌وجود آمده و موجب کاهش کیفیت، زنده‌مانی، تحرک و قدرت باروری اسپرم می‌شود. این آسیب‌ها با تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد ROS و پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای سلول اسپرم همراه است (۱۰). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در هنگام رقیق‌سازی می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم مؤثر باشند (۳۵).

در واقع جلوگیری از تولید ROS اولین خط دفاعی آنتی‌اکسیدان‌ها بر علیه آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد. در مقابل این آسیب‌های

به منظور حفظ دام‌های بومی و جلوگیری از انقراض ذخایر ژنتیکی ارزشمند، لازم است که بخشی از تحقیقات در زمینه روش‌های مطلوب حفظ و انتقال این ژن‌ها به نسل‌های آینده اختصاص یابد، بنابراین بهبود روش‌های نگهداری اسپرم در جهت نیل به این اهداف از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۲۶). با پیشرفت تلقیح مصنوعی، منی برای حداکثر تعداد دوزها از یک انزال رقیق می‌شود، این رقیق‌سازی باعث کاهش غلظت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی

۱- کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۲- استاد فیزیولوژی تولید مثل، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۳- دانشیار فیزیولوژی تولید مثل و مامایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۴- دانشیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

\*- نویسنده مسئول: (Email: Sedighemohamadi70@gmail.com)

DOI: 10.22067/ijasr.v10i2.61116

۰/۹۳ گرم فروکتوز، ۰/۰۵ گرم جنتامایسین، ۱۵ درصد زرده تخم‌مرغ و ۵ درصد گلیسرول در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) بود، استفاده شد (۱۶). تیمارهای آزمایشی حاوی چهار سطح ملاتونین (M-5250، وزن مولکولی ۲۳۲/۳ شرکت سیگما آلدريج) ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مول بودند. رقیق‌کننده فاقد ملاتونین نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برای به‌دست‌آوردن غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مول) به‌ترتیب ۰/۱۱۵، ۰/۲۳۲، ۰/۴۶۴ و ۰/۹۲۸ میلی‌گرم پودر ملاتونین را در ۰/۰۴ میلی‌لیتر اتانول حل و سپس سدیم‌سیترات ۳ درصد به محلول‌ها اضافه شد.

### روش انجاماد

پس از رقیق‌سازی نمونه‌های آزمایشی در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری بسته‌بندی شد، داخل هر پایوت از نظر حجمی ۴۰۰ میلیون اسپرم کشیده شد. پایوت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به منظور گذراندن دوره تعادل قبل از انجاماد قرار داده شد. سپس پایوت‌ها در فاصله ۴ سانتی‌متری از سطح ازت مایع به مدت ۱۵ دقیقه در معرض بخار ازت قرار گرفته و در نهایت در ازت مایع با دمای منفی ۱۹۶ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور شدند. بعد از دو هفته پایوت‌ها یخ‌گشایی و مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۷).

### یخ‌گشایی

برای یخ‌گشایی اسپرم پس از خارج کردن پایوت‌های حاوی اسپرم از ازت، به مدت ۳۰ ثانیه در داخل آب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۷).

### تحرك اسپرم پس از یخ‌گشایی

پس از یخ‌گشایی اسپرم، یک قطره از آن زیر میکروسکوپ نوری متصل به مانیتور و برنامه CASA مشاهده شد. مدل نرم‌افزار مورد استفاده در این مطالعه HFTCASA:6.50 (Computer Aided Semen Analysis) بود.

### یکپارچگی غشای اسپرم

یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم با استفاده از آزمون تورم هیپوسموتیک تعیین شد. محلول هیپوسموتیک با حل کردن ۰/۷۳۵ گرم تری‌سدیم سیترات دی‌هیدرات و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر آماده شد. برای این آزمایش ابتدا ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه اسپرم یخ‌گشایی شده در ۵۰۰ میکرولیتر محلول مخلوط شده و برای ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده و سپس یک قطره از محلول را برداشته و گسترش تهیه شد. گسترش‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند. در هر اسلاید ۲۰۰ اسپرم

اکسیداتیوی، پلاسمای مایع منی دارای یک منبع از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی می‌باشد (۲). آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که باعث کاهش سرعت اکسیداسیون و حفظ سلول از آسیب‌های شدید اکسیده شدن می‌شوند (۳۴). اولین بار مک لود حضور آنتی‌اکسیدان‌ها را در اسپرم گزارش کرد (۲۰). گلو‌تاتیون، گلو‌تاتیون‌پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز، ویتامین C و ویتامین E آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در مایع منی پستانداران هستند که درمقابل ROS برای محافظت از پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم حضور دارند (۳). سطوح آنتی‌اکسیدانی در طول فرآیند رقیق‌سازی و تولید بیش از حد ROS کاهش می‌یابد (۴). سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی طبیعی و مصنوعی به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر پراکسیداسیون لیپیدی در مایع منی توصیه شده است (۲۹). بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی یا مصنوعی در مایع منی می‌تواند تأثیر استرس اکسیداتیو در طول فرآیند ذخیره‌سازی اسپرم را کاهش دهد و در نتیجه منجر به بهبود کیفیت مایع منی شود (۲۳). ملاتونین یا ۵-متوکسی-ان-استیل تریپتامین<sup>۱</sup> هورمونی است که در غده صنوبری، اندامی کاج مانند در اعماق مغز ساخته می‌شود. این هورمون نخستین بار در سال ۱۹۵۸ توسط کومر کشف شد. در تعدادی از مطالعات بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ملاتونین تأکید شده است (۱۸). ملاتونین همچنین قادر به تحریک فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم ROS و حفظ سیالیت غشای اسپرم می‌باشد (۲۵). بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های مختلف ملاتونین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در منی منجمد شده قوچ عربی بود.

### مواد و روش‌ها

#### تهیه نمونه و فراوری آن

نمونه‌های منی از ۶ رأس قوچ عربی بالغ با وزن متوسط  $73 \pm 3$  با تحریک الکتریکی به‌وسیله دستگاه شوک الکتریکی (Ogawa Seiki Co Ltd)، در فصل تولیدمثلی پاییز ۹۴ (اوایل مهر تا پایان آذر) در ایستگاه تحقیقاتی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، جمع‌آوری شدند. پس از بررسی فراسنجه‌های تحرک، مورفولوژی و غلظت نمونه‌های استحصالی، نمونه‌های با تحرک کمتر از ۷۵ درصد و غلظت کمتر از  $2/5 \times 10^9$  اسپرم در میلی‌لیتر حذف شدند و بقیه نمونه‌ها به منظور از بین بردن اثر فردی دام از آزمایش، با هم مخلوط و در رقیق‌کننده‌های آماده شده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد رقیق شدند. رقیق‌سازی با نسبت ۱ به ۴ (یک قسمت منی و یک قسمت رقیق‌کننده) انجام گرفت. برای تهیه رقیق‌کننده، از پروتوکلی که شامل ۳/۲۸۵ گرم تریس، ۱/۸۷۰ گرم سیتریک اسید،

2- 5-Methoxy-N-acetyltryptamine

ناهنجاری‌های شکلی اسپرم نسبت به گروه شاهد شدند ( $P < 0/05$ ). بیشترین بهبود در فراسنجه‌های تحرک کل، تحرک غیرپیش‌رونده، تحرک پیش‌رونده سریع و کند به‌وسیله تیمار ۰/۵ میلی‌مولار و کمترین مقدار فراسنجه‌های فوق به‌وسیله تیمار ۴ میلی‌مولار ایجاد شد ( $P < 0/05$ ). تمامی سطوح ملاتونین با اختلاف معنی‌داری توانستند حرکت پیش‌رونده آهسته را نسبت به گروه شاهد افزایش دهند ( $P < 0/05$ ).

تمام غلظت‌های ملاتونین با اختلاف معنی‌داری توانستند حرکت پیش‌رونده آهسته را نسبت به گروه شاهد بهبود دهند ( $P < 0/05$ ). بیشترین توان آنتی‌اکسیدانی تام نیز در تیمار سوم و با افزودن غلظت ۱ میلی‌مولار به‌دست آمد ( $P < 0/05$ ). بین هیچ‌کدام از گروه‌های آزمایشی و تیمار در مورد pH منی اختلاف معنی‌داری یافت نشد ( $P > 0/05$ ).

طبق جدول ۱ با افزودن ۰/۵ میلی‌مولار ملاتونین در منی رقیق‌شده فراسنجه‌های سرعت در مسیر مستقیم و خطی بودن مسیر حرکت اسپرم به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های آزمایشی بهبود یافتند ( $P < 0/05$ ). نتایج نشان می‌دهند که افزایش غلظت ملاتونین بالاتر از ۲ میلی‌مولار موجب کاهش خطی بودن مسیر حرکت اسپرم می‌شود ( $P < 0/05$ ). بیشترین افزایش در سرعت اسپرم در مسیر منحنی به‌وسیله تیمار سوم و سطح ۱ میلی‌مولار ملاتونین ایجاد شد ( $P < 0/05$ ).

در این مطالعه تأثیر افزودن غلظت‌های مختلف ملاتونین به رقیق‌کننده تریس - سیترات زرده تخم مرغ مورد ارزیابی قرار گرفت. ارتباط معنی‌داری بین افزودن ملاتونین و بهبود فراسنجه‌های حرکتی اسپرم مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در این مطالعه غلظت ۰/۵ میلی‌مولار ملاتونین به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تحرک کلی اسپرم در مقایسه با سایر غلظت‌ها و گروه شاهد شد ( $P < 0/05$ ). نتایج متفاوتی در زمینه تأثیر ملاتونین بر تحرک اسپرم بیان شده است. سلول‌های اسپرم دارای گیرنده‌هایی برای ملاتونین است (۳۲).

ملاتونین در برخی پژوهش‌ها باعث کاهش تحرک اسپرم شده است (۷، ۱۳، ۱۹، ۲۱، ۲۲ و ۳۲). در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین افزودن ملاتونین و بهبود فراسنجه‌های حرکتی اسپرم مشاهده شد که هم‌جهت با مطالعات پژوهش‌گران مختلف می‌باشد (۱۱، ۲۴ و ۲۷). تفاوت اثر ملاتونین بر تحرک اسپرم وابسته به روش استفاده (درون تنی و برون تنی)، مقدار، مدت مجاورت اسپرم با ملاتونین، تأثیرات ناشناخته ترکیبات پلاسمای منی بر عملکرد ملاتونین، تفاوت در کیفیت و کیفیت اولیه نمونه‌های منی و حتی تفاوت بین گونه‌ای و مدت نگه‌داری برون تنی منی نیز می‌تواند تأثیرگذار باشد (۱).

شمارش شد و درصد اسپرم با دم پیچ خورده که نشان از سلامت غشای اسپرم است تعیین شد (۱).

## رنگ‌آمیزی حیاتی

برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین - نیگروزین استفاده گردید. مواد تشکیل‌دهنده این محیط شامل رنگ ائوزین (۱۶/۷ گرم بر لیتر)، رنگ نیگروزین (۱۰۰ گرم بر لیتر) و سیترات سدیم (۲۹ گرم بر لیتر) می‌باشد. اساس این رنگ‌آمیزی بدین صورت می‌باشد که رنگ به داخل اسپرم‌های مرده نفوذ پیدا می‌کند درحالی که اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی، ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه اسپرم برداشته شد و روی لام قرار گرفت و ۲۰ میکرولیتر از رنگ آماده شده به آن اضافه گردید. بعد از مخلوط شدن نمونه با رنگ، گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن گسترش لام زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی  $1000 \times$  قرار داده شد و از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و بدین صورت درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده)، محاسبه شد (۱۲).

## سنجش توان آنتی‌اکسیدانی تام

در تحقیق حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسمای منی به روش (FRAP<sup>۱</sup>) اندازه‌گیری شد. اساس این روش بر مبنای توانایی آنتی‌اکسیدان‌های مایع منی در احیاء یون فریک به یون فرو است که نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام می‌باشد. آزمایش FRAP با استفاده از روش Benzie و Strain قدرت آنتی‌اکسیدانی مایع منی اندازه‌گیری و نتایج به‌صورت میکرومولار یون فریک در هر لیتر مایع منی بیان شد (۸).

## روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از مدل خطی GLM نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل و اختلاف میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای Duncan برای سطح معنی‌داری ۵ درصد مقایسه شدند. میانگین حاصل از پنج تکرار به صورت  $\pm$ SEM Mean گزارش شد.

## نتایج و بحث

اثر افزودن سطوح مختلف ملاتونین به منی رقیق‌شده بعد از انجماد- یخ‌گشایی در جدول ۱ بیان شده‌اند. تمامی غلظت‌های ملاتونین به‌طور معنی‌داری موجب افزایش سلامت غشا، درصد تحرک پیش‌رونده سریع، درصد تحرک پیش‌رونده کند و کاهش

جدول ۱- تأثیر افزودن غلظت‌های مختلف ملاتونین به منی قوچ عربی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم، توان آنتی‌اکسیدانی تام و pH منی بعد از انجماد-یخ‌گشایی (بر حسب میلی‌مولار بر میلی‌لیتر)

**Table 1-** Effect of different concentrations of melatonin in Arabic ram semen on sperm quality parameters, total antioxidant capacity and pH of semen after freezing-thawing (mM/mL)

فراسنجه‌های اسپرم Parameters	غلظت ملاتونین Melatonin concentration				
	0	0.5	1	2	4
تحرك كل Total motility (%)	53.35±0.9 <sup>c</sup>	69.67±0.55 <sup>a</sup>	62.28±0.01 <sup>b</sup>	62.61±0.3 <sup>b</sup>	52.13±0.34 <sup>c</sup>
تحرك پيش‌رونده سريع Progressive motility (%)	8.74±0.39 <sup>b</sup>	16.29±0.48 <sup>a</sup>	9.28±0.01 <sup>b</sup>	8.60±0.32 <sup>b</sup>	7.07±0.01 <sup>c</sup>
تحرك پيش‌رونده كند motility(%) Slow progressive	28.96±0.56 <sup>d</sup>	24.15±0.35 <sup>a</sup>	39.44±0.02 <sup>b</sup>	30.88±0.41 <sup>c</sup>	30.65±0.36 <sup>c</sup>
تحرك غيرپيش‌رونده motility(%) Non progressive	15.52±0.61 <sup>a</sup>	10.32±0.23 <sup>b</sup>	13.9±0.01 <sup>c</sup>	15.15±0.23 <sup>a</sup>	13.17±0.42 <sup>d</sup>
سرعت در مسير منحنی Curvilinear Velocity (µm/s)	22.26±0.35 <sup>c</sup>	23.45±0.1 <sup>b</sup>	24.45±0.03 <sup>a</sup>	22.03±0.24 <sup>c</sup>	21.27±0.35 <sup>c</sup>
سرعت در مسير مستقیم Straight Linear Velocity (µm/s)	8.38±0.17 <sup>ab</sup>	8.69±0.13 <sup>a</sup>	8.04±0.01 <sup>b</sup>	8.38±0.03 <sup>ab</sup>	8.56±0.15 <sup>a</sup>
خطی بودن مسير حرکت اسپرم Linearity(%)	17.90±0.23 <sup>c</sup>	26.79±0.15 <sup>a</sup>	21.8±0.06 <sup>b</sup>	18.10±0.21 <sup>c</sup>	16.37±0.32 <sup>d</sup>
زنده‌مانی viability(%)	62.4±1.12 <sup>c</sup>	79±1.37 <sup>a</sup>	72±0.89 <sup>b</sup>	61.80±0.8 <sup>c</sup>	59±1.56 <sup>d</sup>
سلامت غشا Membrane integrity (%)	62±0.02 <sup>d</sup>	80±0.08 <sup>a</sup>	76.2±0.2 <sup>b</sup>	73±0.6 <sup>c</sup>	59±2.2 <sup>d</sup>
ناهنجاری‌های شکلی Abnormalities (%)	20±0.54 <sup>a</sup>	12.80±58 <sup>c</sup>	14±0.89 <sup>b</sup>	15±1.14 <sup>b</sup>	19.8±0.58 <sup>a</sup>
اسیدیته PH	6.96±0.05	7.04±0.09	6.96±0.1	6.92±0.61	6.84±0.06
توان آنتی‌اکسیدانی تام Total antioxidant capacity (µM/L)	715.6±21 <sup>c</sup>	1033±42.24 <sup>b</sup>	1209±66.82 <sup>a</sup>	730±17.64 <sup>c</sup>	745±18.42 <sup>c</sup>

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).

Means within same row with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

خاصیت آنتی‌اکسیدانی و جاروب‌کنندگی ملاتونین بر روی رادیکال‌های آزاد، اندامک‌های داخل سلول را در برابر آسیب‌های استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. مکانیسم ۲) ملاتونین موجب افزایش فعالیت کمپلکس‌های ۱ و ۴ زنجیره انتقال الکترون شده و در نتیجه موجب بهبود تنفس میتوکندریایی و افزایش تولید ATP تحت شرایط طبیعی و استرس می‌شود. مکانیسم ۳) ملاتونین با کاهش مصرف اکسیژن، کاهش پتانسیل غشا و کاهش تولید آنیون سوپراکسید، میتوکندری را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند در حالی که میزان تولید ATP را حفظ می‌کند (۳۱).

برخلاف نتایج مطالعه ما، در مطالعه‌ای افزودن ملاتونین به اسپرم گاو در محیط مایع موجب کاهش تحرک پیش‌رونده اسپرم گردیده

افزایش تحرک اسپرم به اثرات آنتی‌اکسیدانی ملاتونین در جلوگیری از پراکسیداسیون غشای اسپرم و کاهش تحرک آن نیز به کاهش ورود کلسیم به اسپرم به دلیل مهار تشکیل سیکلیک AMP (cAMP) به‌وسیله ملاتونین نسبت داده شده است، زیرا cAMP پیامبر داخل سلولی در تحرک اسپرم است؛ همچنین ملاتونین با اختلال در میکروتوبول‌ها نیز باعث کاهش تحرک سلول اسپرم می‌شود (۳۲). دلیل افزایش تحرک اسپرم به‌وسیله ملاتونین بدین جهت است که ملاتونین تولید ATP در سطح میتوکندری را افزایش می‌دهد (۱۴).

نقش محافظتی ملاتونین روی میتوکندری و به‌تبع آن روی تحرک اسپرم به‌وسیله چندین مکانیسم انجام می‌شود. مکانیسم ۱)

ما با این محققین شاید به دلیل تفاوت در روش استفاده ملاتونین می‌باشد. تأثیر ملاتونین بر نرمال شدن اسپرم شاید به دلیل اثرات تحریکی ملاتونین روی فعال‌سازی آنزیم‌های دربرگیرنده سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی باشد (۱۵). ملاتونین به‌واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود از بروز آسیب‌های ناشی از ROS به میتوکندری اسپرم جلوگیری می‌کند (۲۷). یکی از عواملی که می‌تواند موجب تخریب غشای پلاسمایی اسپرم گردد رادیکال‌های آزاد هستند، با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی ملاتونین بر اسپرم، ایجاد تعادل بین تولید و پاکسازی رادیکال‌های آزاد و کاهش قابل توجه آسیب‌های پراکسیداسیون غشای اسپرم، ملاتونین منجر به حفظ سلامت غشای اسپرم شده و از بروز ناهنجاری در آن جلوگیری می‌کند.

در این مطالعه تیمار ۱ میلی‌مولار ملاتونین موجب ایجاد بالاترین توان آنتی‌اکسیدانی مایع منی شد و در مقادیر بالای ۱ میلی‌مولار میزان Feric Reducing Ability of Plasma (TAC) کاهش یافت. در مطالعه‌ای با افزودن تاوورین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان میزان آنتی‌اکسیدان‌های منی افزایش یافت و دوزهای بالای آنتی‌اکسیدانی باعث تخریب یکپارچگی آکسونوم و میتوکندری سلول‌های اسپرم شد. دلیل کاهش میزان توان آنتی‌اکسیدانی منی به‌وسیله افزودن غلظت‌های بالای آنتی‌اکسیدان ملاتونین می‌تواند تخریب یکپارچگی آکسونوم و میتوکندری سلول‌های اسپرم باشد (۶). مصرف هورمون ملاتونین در هنگام انجماد اسپرم می‌تواند با اثرات نامطلوب فرآیند انجماد و یخ‌گشایی بر فراسنجه‌های اسپرم مقابله کند و این اثرات محافظتی ملاتونین بر اسپرم به‌وسیله کاهش در لیپیدپراکسیداسیون به‌عنوان یک نتیجه از افزایش توان آنتی‌اکسیدانی تام مایع منی ایجاد می‌شود (۵).

تأثیرات سودمند ملاتونین را می‌توان به این واقعیت نسبت داد که این هورمون یک آنتی‌اکسیدان قوی بوده و باعث می‌شود رادیکال‌های آزادی را که در فرآیندهای متابولیسمی تولید می‌شوند را خنثی و یا از بین ببرد. در کل سطوح بالاتر از ۲ میلی‌مولار ملاتونین افزوده شده به منی رقیق‌شده در این پژوهش موجب کاهش در فراسنجه‌های اسپرم در مقایسه با سایر سطوح شده است، که بر این اساس استنباط می‌شود که افزودن بیش از اندازه این هورمون همانند سایر آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده باعث تغییر خصوصیات غشای پلاسمایی اسپرم شده و امکان لیپیدپراکسیداسیون را فراهم می‌نماید.

با توجه به نتایج به‌دست آمده اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد در pH منی مشاهده نشد که هم‌جهت با مطالعه پژوهش‌های پیشین است (۲۲). این نتیجه را می‌توان رقیق‌سازی مناسب منی و افزودن مقدار مناسب ملاتونین به اسپرم و نداشتن تأثیر منفی آن بر pH منی دانست.

(۳۲) و در مطالعه‌ای دیگر، موافق با نتیجه حاضر افزودن هورمون ملاتونین به اسپرم گاو و بررسی آن پس از یخ‌گشایی موجب افزایش در حرکت پیش‌رونده اسپرم شده است (۵) یک دلیل توجیه‌کننده این اختلاف‌ها می‌تواند روش استفاده و مقدار ملاتونین مصرفی باشد. ملاتونین و همچنین متابولیت‌های آن پاک‌کننده‌های مستقیم رادیکال آزاد و قادر به تنظیم رونویسی ژن برای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی ملاتونین به‌طور گسترده مطالعه شده است و استفاده از این ماده به‌عنوان یک محافظت‌کننده سلول و نیز یک عامل جلوگیری‌کننده از بیماری‌های بالقوه پیشنهاد شده است. ملاتونین به میزان زیادی در حمایت از سلول در مقابل استرس اکسیداتیو مؤثر است. ملاتونین مقدار رادیکال‌آزاد از جمله ROS را کاهش می‌دهد. ملاتونین همچنین مولکول‌های محافظت‌کننده سلول اسپرم در مقابل استرس اکسیداتیو را افزایش می‌دهد (۳۰).

نتایج نشان می‌دهد که افزودن هورمون ملاتونین در غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار به رقیق‌کننده اسپرم موجب افزایش زنده‌مانی اسپرم پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی آن نسبت به سطح شاهد شده است. در این مطالعه ما سطوح بالاتر از ۲ میلی‌مولار باعث کاهش زنده‌مانی اسپرم شده و هم‌جهت با نتایج به‌دست آمده در مطالعه قبلی ما، در پژوهشی که ملاتونین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان به اسپرم گاو افزوده شد نیز سطوح بالاتر از ۲ میلی‌مولار ملاتونین باعث کاهش زنده‌مانی اسپرم نسبت به سایر سطوح شده است (۵). در همین راستا محققین بیان کرده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌ها اگر به مقدار زیادتر از حد لازم استفاده شوند، به‌عنوان یک اکسیدان عمل کرده و آثار مخربی را بر جای می‌گذارند (۶). گزارش شده که افزودن ملاتونین در سطح ۱۰۰ میکرومولار به اسپرم محافظت‌شده از سرمای گاو میش در رقیق‌کننده‌های بایوکسل و تریس-سیترات زرده تخم‌مرغ، باعث افزایش ۵ درصدی زنده‌مانی نسبت به سطح شاهد شده است (۳۱). برخلاف مطالعه ما محققین گزارش کردند که ملاتونین موجود در منی هیچ تأثیر مثبتی بر کیفیت و زنده‌مانی اسپرم ندارد (۹) و اثر افزودن هورمون ملاتونین به‌صورت درون‌تنی و برون‌تنی بر زنده‌مانی اسپرم خروس پس از یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد بدون تأثیر گزارش شد (۲۲).

نتایج این مطالعه بیان می‌کنند که افزودن ملاتونین در همه سطوح به‌جز سطح ۴ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری باعث افزایش سلامت غشای اسپرم نسبت به سطح شاهد شدند. هم‌جهت با نتایج ما، افزودن ملاتونین به اسپرم گاو میش محافظت‌شده از سرما در لحظه رقیق‌سازی و ۶ ساعت بعد از آن توانست سلامت غشای اسپرم را نسبت به سطح شاهد به‌طور معنی‌داری بهبود دهد (۳۱). مخالف با نتایج این مطالعه، تزریق ملاتونین به صورت خارج فصل تولیدمثل به بزهای نر جوان بر روی تحرک اسپرم و اسپرم‌های غیرطبیعی و ناهنجار اثر معنی‌داری نداشت (۳۳). دلیل مخالف بودن نتایج مطالعه

جدول ۲- همبستگی بین غلظت ملاتونین و توان آنتی‌اکسیدانی تام با فراسنجه‌های منی

Table 2- Correlation between semen melatonin and Total antioxidant capacity with semen parameters

پارامترها Parameters	غلظت ملاتونین Melatonin concentration	توان آنتی‌اکسیدانی تام Total antioxidant capacity
تحرک کل Total motility (%)	r= 0.316 P = 0.684	r = 0.615 p = 0.270
تحرک پیش‌رونده سریع Progressive motility (%)	r = -0.528 p = 0.360	r = 0.380 p = 0.620
تحرک پیش‌رونده کند motility (%) Slow progressive	r = 0.138 p = 0.827	r = 0.433 p = 0.467
تحرک غیرپیش‌رونده motility (%) Non progressive	r = -0.004 p = 0.995	r = -0.484 p = 0.405
سرعت در مسیر منحنی Curvilinear Velocity (μm/s)	r = -0.136 p = 0.864	r = -0.993 p = 0.007
سرعت در مسیر مستقیم Straight Linear Velocity (μm/s)	r = -0.233 p = 0.767	r = -0.329 p = 0.671
خطی بودن مسیر حرکت اسپرم Linearity (%)	r = -0.246 p = 0.754	r = 0.687 p = 0.313
زنده‌مانی viability (%)	r = -0.569 p = 0.317	r = 0.814 p = 0.094
سلامت غشا Membrane integrity (%)	r = -0.470 p = 0.424	r = 0.724 p = 0.164
ناهنجاری‌های شکلی Abnormalities (%)	r = -0.440 p = 0.560	r = -0.693 p = 0.307
اسیدیته PH	r = -0.870 p = 0.055	r = 0.455 p = 0.545
توان آنتی‌اکسیدانی تام Total antioxidant capacity (μM/L)	r = -0.342 p = 0.573	-
غلظت ملاتونین Melatonin concentration(mM/mL)	-	r = -0.342 p = 0.573

p=probability value

r=correlation

مطالعه دیگر نیز میزان ملاتونین پلاسمای منی و میزان آنتی‌اکسیدان درون‌زای پلاسمای منی در مردان نابارور اندازه‌گیری شد و همبستگی معنی‌داری بین این دو با هم و هر یک با فراسنجه‌های کمی و کیفی اسپرم یافت نشد. اما در مطالعات دیگری که در این زمینه انجام شد ارتباط معنی‌داری بین سطوح ملاتونین و تحرک اسپرم یافت شد، بدین صورت که با کاهش سطوح ملاتونین تحرک اسپرم نیز کاهش پیدا می‌کند. مطالعات نشان داده که سطح سلول اسپرم حاوی گیرنده‌هایی برای ملاتونین می‌باشد و اثرات محافظت‌کنندگی ملاتونین بر اسپرم بستگی به واکنش بین ملاتونین و گیرنده‌های آن در سطح سلول اسپرم دارد، پس مقدار ملاتونین درون پلاسمای منی و همچنین تعداد گیرنده‌های آن در سطح سلول‌های اسپرم در محافظت اسپرم به‌وسیله این هورمون نقش دارند (۲۸).

طبق جدول ۲ چنین استنباط می‌شود که بین مقدار ملاتونین و توان آنتی‌اکسیدانی تام منی با فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی و همچنین بین خود ملاتونین و توان آنتی‌اکسیدانی تام پلاسمای منی هیچ همبستگی معنی‌داری وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). از آنجایی که کیفیت اسپرم در باروری اسپرم تاثیر مثبتی دارد و پژوهش‌ها نشان داده که میزان ملاتونین و مقدار آنتی‌اکسیدان‌های موجود در پلاسمای منی باعث بهبود کیفیت اسپرم شده، از این جهت در این مطالعه همبستگی بین ملاتونین و توان آنتی‌اکسیدانی تام منی با هر یک از فراسنجه‌های اسپرم سنجیده شد. نتایج مطالعه ما موافق با نتایج مطالعات پیشین همسو است که در این مطالعات پژوهشگران ملاتونین موجود در پلاسمای منی و همچنین در خون اندازه‌گیری کردند و ارتباط معنی‌داری بین آن و فراسنجه‌های اسپرم نیافتند. در

## نتیجه‌گیری

ملاتونین باعث کاهش فراسنجه‌های اسپرم نسبت به گروه شاهد شد. بین مقدار ملاتونین و توان آنتی‌اکسیدانی تام منی با فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی و همچنین بین خود ملاتونین و توان آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما منی همبستگی معنی‌داری وجود نداشت.

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که افزودن ملاتونین به منی قوچ عربی باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما منی قوچ عربی پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی شده، بیشترین بهبود در این فراسنجه‌ها، در سطح ۰/۵ میلی‌مولار ملاتونین حاصل شد و غلظت بالاتر از ۲ میلی‌مولار

## منابع

- 1- Adeel, M., A. Ijaz, M. Aleem, H. Rehman, M. S. Yousaf, and M. A. Jabbar. 2009. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. *Journal of Theriogenology*, 71(8): 1220-1225.
- 2- Agarwal, A., and R. A. Saleh. 2002. Rol of oxidants in male infertility: rationale, significance and treatment. *Uroclin North AM*, 29(4): 817-27.
- 3- Akhter, S., A. B. Rakha, S. A. Ansari, H. A. Andrabi, and N. Ullah. 2011. Storage of Nili-Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in skim milk extender supplemented with ascorbic acid and alpha Tocopherol. *Pakistan Journal of Zoology*, 43(2): 273-277.
- 4- Andrabi, S. M. 2009. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Journal of Reproduction in Domestic Animals*, 44(3): 552-569.
- 5- Ashrafi, I., H. Kohram, F. Farrokhi Ardabili. 2013. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Journal of Animal Reproduction Science*, 139 (1-4): 25-30.
- 6- Atessahin, A., E. Şahna, G. Turk, A. O. Çeribaşı, S. Yılmaz, A. Yuce, and O. Bulmuş. 2006. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *Journal of Pineal Research*, 41(1): 21-27.
- 7- Balo da Silva, C. M., B. Macias-Garcia, A. Miro-Moran, L. Gonzalez-Fernandez, A. Morillo-Rodriguez, C. Ortega-Ferrusola, J. M. Gallardo-Bolanos, G. Stilwell, J. A. Tapia, and F. J. Pena. 2011. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. *Journal of Pineal Research*, 51: 172-179.
- 8- Benzie, I. F., and J. J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Journal of Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-6.
- 9- Bornman, M. S., J. M. C. Oosthuizen, H. C. Barnard, G. W. Schulenburg, D. Boomker, and S. Reif. 1989. Melatonin and sperm motility/melatonin und spermatozoon motilität. *Journal of Andrology*, 21(5): 483-485.
- 10- Chatterjee, S., E. De Lamirande, and C. Gagnon. 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Journal of Molecular Reproduction and Development*, 60(4): 498-506.
- 11- Du Plessis, S. S., K. Hagenaar, F. Lampiao. 2010. The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Journal of Andrology*, 42(2):112-116.
- 12- Evans, G. and W. M. C. Maxwell. 1987. Handling and examination semen. In: Maxwell WMC, editor. *Artificial insemination of sheep and goat*. Sydney: Butterworths. pp 93-106.
- 13- Faigl, V., M. Keresztes, M. Kulcsar, S. Nagy, Z. Keresztes, G. Amiridis, L. Solti, G. Huszenicza, and S. Cseh. 2009. Testicular function and semen characteristics of Awassi rams treated with melatonin out of the breeding season. *Journal of Acta Veterinaria Hungarica*, 57(4): 531-540.
- 14- Garcia, J. J., R. J. Reiter, J. Pie, G. G. Ortiz, J. Cabrera, D. Sainz, and R. M. Acuna-Castroviejo. 1999. Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31(6): 609-616.
- 15- Gavella, M. and V. Lipovac. 2000. Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 44: 23-27.
- 16- Hasanpur, S., M. Rustaei, and M. Mohammadi. 2014. Effect of L-gulutamin and gelisroll on ram semen after freezing-thawing. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 6(1):98-104. (In Persian)
- 17- Ijaz, A., A. Hussain, M. Aleem, M. S. Yousaf, and H. Rehman. 2009. Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Theriogenology*, 71(8): 1326-1329.
- 18- Juknat, A. A., V. Mende Mdel, A. Quaglino, C. I. Fameli, M. Mena, and M. L. Kotler. 2005. Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. *Journal of Pineal Research*, 38(2): 84-92.
- 19- Luboshitzky, R., A. Shen-Orr, L. Nave, S. Lavi, and P. Lavie. 2002. Melatonin administration alters semen quality

- in healthy men. *Andrology*. 23(4):572-583.
- 20- Macleod, J. 1943. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *American Journal of Physiology- Legacy content*, 138(3): 512-8.
  - 21- Martin, D., F. J. Hidalgo, M. J. Baron, P. Bragado, A. Carmona, A. Robina, L. J. Garcia-Marin, and M. C. Gill. 2011. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17°C. *Journal of Theriogenology*, 75: 1550-1560.
  - 22- Meamar, M., A. Shahneh, S. Zeinaldini, H. Kahram, and M. J. Zamiri. 2012. Effects of melatonin and vitamin E on properties of frozen semen of male native Fars province of phars. *Iranian Journal of Animal Science*, 43(3): 379-391. (In Persian)
  - 23- Perumal, K., A. Vupru, and C. Rajkhowa. 2013. Effect of addition of taurine on the liquid storage (5°C) of mithun (*Bos frontalis*) semen. *Veterinary Medicine International*. Article ID 165348, 7 p.
  - 24- Ramadan, T. A., T. A. Taha, M. A. Samak, and A. Hassan. 2009. Effectiveness of exposure to long day followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. *Journal of Theriogenology*, 71(3): 458-468.
  - 25- Reiter, R. J., X. T. Tan, S. J. Kim, and Q. I. Wenbo. 1998. Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Journal of Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 41:229-236.
  - 26- Salamon, S., and W. M. C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Journal of Animal Reproduction Science*, 62(1-3): 77-111.
  - 27- Shang, X., Y. Huang, Z. Ye, X. Yu, and W. Gu. 2004. Protection of melatonin against damage of sperm mitochondrial function induced by reactive oxygen species. *Journal of Zhonghua Nan Ke Xue*, 10(8): 604-607.
  - 28- Sharbatoghli, M., M. Rezazadeh, M. H. Bahadori, R. Salman Yazdi, and L. Rashki Galeno. 2014. The Relationship between Seminal Melatonin with Sperm Parameters, DNA Fragmentation and Nuclear Maturity in Intra Cytoplasmic Sperm Injection Candidates. *Cell Journal*, 17(3): 547-553.
  - 29- Shoaee, A., and M. J. Zamiri. 2008. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg-yolk-citrate extender. *Journal of Animal Reproduction Science*, 104(2-4): 414-418.
  - 30- Tamura, H., A. Takasaki, I. Miwa, K. Taniguchi, R. Maekawa, H. Asada, T. Taketani, A. Matsuoka, Y. Yamagata, K. Shimamura, H. Morioka, H. Ishikawa, R. J. Reiter, and N. Sugino. 2008. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, 44(3): 280-287.
  - 31- Tajvidi Asr, S., H. Kahram, R. Beheshti, and I. Ashrafi. 2013. Antioxidant effect of Melatonin on the buffalo sperm parameters after freeze thawing process. *Iranian Journal of Animal Science*, 23(4): 47-56. (In Persian)
  - 32- Tanyildizi, S., T. Bozkurt, O. Ciftece, and F. Sakin. 2006. In vitro effects of melatonin on hyaluronidase activity and sperm motility in bull semen. *Turkish Journal of Veterinaria and Animal Science*, 30(1): 89-93.
  - 33- Trejo, G. A., L. C. Ponce, and G. M. A. Vidal. 2000. Effects of melatonin and GnRH treatments on semen quality in young male goats. In 7th International conference on goats, Tours. Poitiers, France (pp. 15-21).
  - 34- Upreti, G. C., K. Jensen, J. E. Oliver, D. M. Duganzich, and R. Munday. 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in chemically defined diluent containing antioxidants. *Journal of Animal Reproduction Science*, 48: 269-278.
  - 35- Yousef, M. I., G. A. Abdollad, and K. I. Kamel. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Journal of Animal Reproduction Science*, 76: (1-2): 99-111.





## Antioxidant Effect of Melatonin on Arabic Ram Semen Parameters after Freeze - Thawing Process

S. Mohamadi<sup>1\*</sup> - M. Mamouei<sup>2</sup> - S. Tabatabaei Vakily<sup>3</sup> - J. Fayazi<sup>4</sup>

Received: 18-12-2016

Accepted: 12-09-2017

**Introduction** Semen collection evaluation and addition of preservatives to increase storage period of sperm are essential for successful artificial insemination. Cryopreservation of spermatozoa is becoming more important because of new clinical requirements and current clinical practice. Although frozen-thawed semen has great practical benefits for reproduction, it is widely reported that the cryopreservation process involving cooling, freezing, and thawing induces serious detrimental changes in sperm functions. The viability, motility and membrane integrity of mammalian spermatozoa decrease during the cryopreservation process. Many studies exist as regards the effects of antioxidants on the cryopreservation aimed at improving the quality of post-thaw semen. Antioxidant molecules could decrease the impact of oxidative stress and therefore improve Sperm quality following the freeze-thawing process. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), a derivative of tryptophan, is mainly synthesized and secreted by the pineal gland during the night in reaction to changes in light levels. Melatonin can stimulate the activity of antioxidant enzymes such as SOD and GSH-Px. melatonin scavenges a variety of reactive oxygen and nitrogen species in vivo and in vitro, signifying it has a powerful non-enzymatic antioxidant property. It has been shown that the spermatozoa undergo a freeze-thawing process produced high concentrations of reactive oxygen species. The aim of this study was to investigate the effects different levels of melatonin supplementation (0, 0.5, 1, 2 and 4 mM/ml) in extender on semen characteristics the Arabic ram after freezing-thawing.

**Materials and Methods** This research was performed at Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan in the fall in 2015. Semen samples were collected from 6 Arabic ram with an average weight  $73 \pm 3$  kg by electro ejaculator twice a week. Sperm samples motility were assessed by Computer Aided Sperm Analysis (CASA) after freezing and thawing. The pH, viability, abnormal sperm percentage, membrane integrity and total antioxidant capacity were also assessed after freezing-thawing process. Pearson correlation test was used to assess correlation of melatonin with routine sperm parameters (pH, viability, abnormal sperm percentage, membrane integrity and total antioxidant capacity of plasma). Data analysis was performed using SAS software.  $P < 0.05$  was considered significant.

**Results and Discussion** the Results of this experiment showed that the diluent of ram semen containing 0.5 mM/ml of melatonin improved the motility, membrane integrity and viability of Arabic ram spermatozoa compared to the control. The total antioxidant capacity was highest in diluent contained whit 1 mM/ml of melatonin. The effect of melatonin on the pH of semen at all levels was not significant. Cryopreservation causes an irreversible damage to enzymatic activity and sperm organelles leading to a reduction in the sperm kinetic parameters. Composition of extender may also affect the freeze ability of spermatozoa and their fertilizing ability. Many studies reported that melatonin has beneficial effects on preservation of mammalian sperm function and improves the microscopic parameters of spermatozoa. Melatonin supplementation to ram semen freezing extender protected spermatozoa from the cryopreservation injuries, as proved by post-thaw viability, motility, intracellular ATP concentrations, DNA integrity, and fertilizing ability. It is suggested that melatonin stimulates the activities of antioxidant enzymes. In consequence, melatonin reduces the number of free radicals, ROS, and also may increases the production of molecules protecting sperm cells against oxidative stress. As a conclusion, supplementation of melatonin in the freezing medium can counteract the adverse effects of the freeze-thawing process on the motility, viability, normal morphology and plasma membrane integrity in ram spermatozoa. The results were suggested that the protective effects of melatonin on spermatozoa were associated with a reduction in LPO as a consequence of increasing the TAC and antioxidant enzymes activity.

1- Master of Animal Physiology, University of Agriculture and Natural Resources, Ramin Khuzestan

2- Professor of Reproductive Physiology, University of Agriculture and Natural Resources, Ramin Khuzestan

3- Associate Professor of Reproduction Physiology and Midwifery, University of Agriculture and Natural Resources, Ramin Khuzestan

4- Associate Professor of Genetics and Animal Breeding, University of Agriculture and Natural Resources, Ramin Khuzestan

(\*- Corresponding author email: sedighemohamadi70@gmail.com)

**Conclusion** Cryopreservation of sperm is an applicable technique in infertility management but it may influence the post-thaw qualities of sperm, including morphology, motility, viability and DNA integrity. In this research, we show that supplementation of cryopreservation extenders with melatonin provide a cryoprotective effect on pH, viability, abnormal sperm percentage, membrane integrity and total antioxidant capacity. Overall addition of 0.5 mM/ml of melatonin to the extender improved the most of spermatozoa quality characteristics as well as total antioxidant capacity of semen after freezing-thawing process in Arabic ram. In the current study, we observed no correlation between melatonin and pH, viability, abnormal sperm percentage, membrane integrity and total antioxidant capacity of plasma.

**Key words:** Sperm, Motility, Membrane Integrity, Survival, Total Antioxidant Capacity