Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

Effect of L-carnitine on buck's sperm quality after freezing-thawing process

Reza Masoudi[1], Navid Dadashpour Davachi[2*], Reihaneh Nateghi[3], Mohammad Heidari[4], Fatemeh Zarei[4], Shahrouz Khorrami[2]

[1] Associate Professor, and [2]Assistant Professor of Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran, Email: navid.d.davachi@gmail.com

[3]Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Physiology, Faculty of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

[4] PhD graduated of Animal Physiology, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Article Info

Article type:

Article history:
Received: 09/14/2024
Revised: 11/24/2024
Accepted: 11/25/2024

Keywords:
Freezing
Goat
L-carnithine
Sperm

ABSTRACT

Background and Objectives: Goat is one of the first animals that was domesticated by humans, and according to the available evidence, the origin of domestication of this animal is considered to be in the country of Iran. Considering the hot and dry climate developing in Iran, the reproduction management of this valuable livestock can improve livestock production in the country. One of the technologies that help reproductive management is artificial insemination. In this method, superior genes of animals with high genetic value are rapidly developed in the herd. In the first stage, for successful artificial insemination, suitable sperm is needed for insemination. One of the methods to preserve sperm is its long-term preservation by freezing. Osmotic, chemical, and mechanical stresses during freezing processes are the most important reasons that cause ultrastructural, biochemical and functional changes in sperm, which reduce sperm fertility. Peroxidation of membrane lipids is one of the most important chemical stresses in the freezing-thawing process. L-carnitine is a quasi-vitamin derived from the amino acid lysine and methionine with antioxidant properties that plays an important role in increasing sperm fertility. L-Carnitine is essential for the beta oxidation of long-chain fatty acids in the mitochondria, and it has a positive effect on the metabolism, maturation, and motility of sperm by supplying the energy required by sperm. Therefore, the purpose of this research was to investigate the effect of different levels of L-carnitine during the freezing process to maintain the quality of goat semen.

Materials and Methods: In this experiment, 5 Saanen goats were used in this experiment. After sperm collection and initial evaluation, in order to eliminate individual effects, semen samples were mixed. Different levels of L-carnitine (1, 0, 2, 5 and 10 mM) were added to the sperm diluent and the sperm samples were diluted and frozen. Microscopic evaluation of sperm was done after freezing-thawing and the qualitative parameters of sperm including motility, progressive motility, morphology, plasma membrane function, acrosome health, mitochondrial activity, DNA breakage rate, apoptosis, and membrane lipid peroxidation were evaluated.

Results: According to the results of this research, the use of L-carnitine in the freezing process improved the qualitative parameters of goat sperm, so that in the thawed sperm, the highest amount of total motility, progressive motility, plasma membrane health, mitochondrial activity, viability and the lowest level of lipid peroxidation and pseudo-apoptotic changes were observed in the treatment receiving 5 mM L-carnitine. The use of non-optimal concentrations (1 and 10 mM) of L-carnitine was not as effective as the optimal dose (5 mM).

Conclusion: To conclude, supplementation of goat semen freezing medium with an optimal dose of 5 mM L-carnitine is recommended due to the improvement of sperm quality parameters. Therefore, the use of this supplement can be a practical method to maintain the quality of goat semen during its transportation to farms for reproductive purposes and artificial insemination of commercial herds.

Cite this article: Masoudi, R., Dadashpour Davachi, N., Nateghi, R., Heidari M., Zarei, F., Khorrami, Sh. (2025). Effect of L-carnitine on buck's sperm quality after freezing-thawing process. *Journal of Ruminant Research*, 13(2), 153-170.

© The Author(s)
DOI: 10.22069/ejrr.2024.22762.1977
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش در نشخوارکنندگان
شاپا چاپی: ۴۲۶۱-۲۳۴۵
شاپا الکترونیکی: ۴۲۵۳-۲۳۴۵

تأثیر افزودن ال–کارنیتین به رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم بز پس از فرآیند انجماد–یخگشایی

رضا مسعودی[۱]، نوید داداشپور دواچی[۲*]، ریحانه ناطقی[۳]، محمد حیدری[٤]، فاطمه زارعی[٤]، شهروز خرمی[۲]

[۱] دانشیار و [۲] استادیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
رایانامه: navid.d.davachi@gmail.com
[۳] استادیار گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
[٤] دانش آموخته دکتری فیزیولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

نوع مقاله:

تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/٦/۲٤
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۳/۹/٤
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/۹/۵

سابقه و هدف: بز ازجمله اولین حیواناتی است که به دست انسان اهلی‌شده است و با توجه به شواهد موجود منشأ اهلی شدن این دام را کشور ایران می‌دانند. با توجه به اقلیم نیمه گرمسیری ایران، مدیریت تولیدمثل این دام ارزشمند می‌تواند موجب بهبود تولیدات دامی در کشور شود. یکی از فناوری‌های کمک‌کننده به مدیریت تولیدمثل، تلقیح مصنوعی است. در این روش ژن‌های برتر دام‌های با ارزش ژنتیکی بالا به‌سرعت در گله توسعه می‌یابد. یکی از راه‌های نگهداری اسپرم، نگهداری طولانی‌مدت آن توسط پدیده انجماد است. استرس‌های اسمزی، شیمیایی و مکانیکی، طی فرآیندهای انجماد مهم‌ترین دلایلی هستند که تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی را در اسپرم به وجود می‌آورند که موجب کاهش باروری اسپرم می‌شوند. پراکسیداسیون لیپیدهای غشا یکی از مهم‌ترین استرس‌های شیمیایی در فرآیند انجماد–یخ‌گشایی است. ال–کارنیتین یک شبه ویتامین مشتق از اسیدآمینه لیزین و متیونین با خواص آنتی‌اکسیدانی است که نقش مهمی در افزایش قابلیت‌های باروری اسپرم بازی می‌کند. ال–کارنیتین برای بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره بلند در میتوکندری ضروری است و با تأمین انرژی موردنیاز اسپرم، تأثیر مثبتی بر متابولیسم، بلوغ و تحرک اسپرم دارد؛ بنابراین هدف از اجرای این پژوهش بررسی اثر سطوح مختلف ال–کارنیتین در طول فرایند انجماد برای حفظ کیفیت منی بز بود.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش از ۵ رأس بز نژاد سانن استفاده شد. پس از اسپرم‌گیری و ارزیابی اولیه، به‌منظور حذف اثرات فردی، نمونه‌های منی مخلوط شدند. سطوح مختلف ال–کارنیتین (۰، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) به رقیق‌کننده اسپرم افزوده شد و نمونه‌های منی رقیق‌سازی و منجمد شدند. ارزیابی میکروسکوپی اسپرم بعد از انجماد–یخ‌گشایی انجام شد و فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل تحرک، تحرک پیش‌رونده، مورفولوژی، عملکرد غشا پلاسمایی، سلامت آکروزوم، فعالیت میتوکندری، میزان شکست DNA، آپوپتوز، میزان و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی:
اسپرم
ال–کارنیتین
انجماد
بز

یافته‌ها: بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، استفاده از ال-کارنیتین در فرایند انجماد موجب بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز شد، به‌طوری‌که در اسپرم یخ گشایی شده بیشترین میزان تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، فعالیت میتوکندری، زنده‌مانی و کمترین میزان پراکسیداسیون لیپید و تغییرات شبه آپوپتوز در تیمار دریافت‌کننده ۵ میلی‌مولار ال-کارنیتین مشاهده شد. استفاده از غلظت‌های غیربهینه (۱ و ۱۰ میلی‌مولار) ال-کارنیتین به‌اندازه دوز بهینه (۵ میلی‌مولار) مؤثر نبود. در این آزمایش میزان اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی تحت تأثیر مکمل ال-کارنیتین قرار نگرفت.

نتیجه‌گیری: بنابراین، مکمل سازی محیط انجماد منی بز با دوز بهینه ۵ میلی‌مولار ال-کارنیتین به دلیل بهبود شاخص‌های کیفی اسپرم توصیه می‌شود. به‌طوری‌که استفاده از این مکمل می‌تواند روشی عملی برای حفظ کیفیت منی بز در انتقال آن به مزارع برای اهداف تولیدمثلی و تلقیح مصنوعی گله‌های تجاری باشد.

استناد: مسعودی، رضا؛ داداشپور دواچی، نوید؛ ناطقی، ریحانه؛ حیدری، محمد؛ زارعی، فاطمه؛ خرمی، شهروز. (۱٤۰٤). تأثیر افزودن ال-کارنیتین به رقیق کننده بر کیفیت اسپرم بز پس از فرآیند انجماد-یخگشایی. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۳(۲)، ۱۵۳-۱۷۰

DOI: 10.22069/ejrr.2024.22762.1977

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

بز از جمله اولین حیواناتی است که به دست انسان اهلی‌شده است. از ویژگی‌های ارزشمند این دام چندمنظوره بودن (تولید شیر، گوشت و الیاف)، مقاومت بالا در برابر شرایط سخت محیطی، تغذیه از مواد خشبی کم‌ارزش مثل سرشاخه‌ها و بوته‌زارها که برای دام‌های دیگر قابل‌استفاده نیست و در نهایت هزینه پایین نگهداری در مقایسه با سایر دام‌هاست (Heidari و همکاران، ۲۰۲۲)؛ بنابراین با توجه به اقلیم گرم و خشک درحال‌توسعه در ایران، مدیریت تولیدمثل این دام ارزشمند می‌تواند موجب بهبود تولیدات دامی در کشور شود. یکی از فناوری‌های کمک‌کننده به مدیریت تولیدمثل و اصلاح نژاد دام، تلقیح مصنوعی است (Masoudi و همکاران، ۲۰۱۲). در این روش ژن‌های برتر دام‌های با ارزش ژنتیکی بالا به‌سرعت در گله توسعه می‌یابد. در مرحلهٔ نخست برای انجام موفقیت‌آمیز تلقیح مصنوعی، به اسپرم مناسب برای تلقیح نیاز است. یکی از راه‌های نگهداری اسپرم بسیاری از گونه‌های حیوانی، نگهداری طولانی‌مدت آن‌ها توسط پدیده انجماد است (Walters و همکاران، ۲۰۱۸). از مزایای انجماد اسپرم می‌توان به بارور نمودن هم‌زمان تعداد زیادی دام ماده با استفاده از اسپرم دام‌های نر با نژاد برتر، حذف هزینه مربوط به مراقبت حیوانات نر، افزایش مخزن ژنی، انتقال آسان مایع منی از مراکز تولید و جمع‌آوری به دورترین مکان‌ها و از بین رفتن اختلاف در فصل جفت‌گیری اشاره نمود. استرس‌های اسمزی، شیمیایی و مکانیکی، طی فرآیندهای انجماد مهم‌ترین دلایلی هستند که تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی را در اسپرم به وجود می‌آورند که درنهایت موجب کاهش باروری اسپرم می‌شوند (Walters و همکاران، ۲۰۱۸). پراکسیداسیون لیپیدهای غشا یکی از مهم‌ترین استرس‌های شیمیایی در فرآیند انجماد-یخ‌گشایی است. رادیکال‌های آزاد حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، عملکرد طبیعی سلول را مختل کرده و احتمال مرگ سلولی را افزایش می‌دهند (Rezaei و همکاران، ۲۰۲۳؛ Esmaeilkhanian و همکاران، ۲۰۲۳). غشای پلاسمایی اسپرم دارای اسیدهای چرب غیراشباع با پیوند دوگانه فراوان است و نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع در غشا اسپرم نشخوارکنندگان کوچک نسبت به دیگر گونه‌ها بالاتر است که همین امر غشا آن‌ها را به آسیب پراکسیداتیو مستعد می‌سازد. به‌منظور حفاظت از اسپرم در برابر تنش اکسیداتیو از آنتی‌اکسیدان‌ها در محیط انجمادی استفاده می‌شود. ال-کارنیتین یک شبه ویتامین مشتق از اسیدآمینه لیزین و متیونین با خواص آنتی‌اکسیدانی است که نقش مهمی در افزایش قابلیت‌های باروری اسپرم بازی می‌کند. ال-کارنیتین برای بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره بلند در میتوکندری ضروری است و با تأمین انرژی موردنیاز اسپرم، تأثیر مثبتی بر متابولیسم، بلوغ و تحرک اسپرم دارد (Heidari و همکاران، ۲۰۲۲). ال-کارنیتین می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل نموده و یون‌های سوپر اکسید تولیدشده را مهار کرده و ROS انباشته‌شده را سم‌زدایی نماید (Banihani و همکاران، ۲۰۱٤). فعالیت گزانتین‌اکسیداز را مهار کرده و کلات فلزی و پراکسید هیدروژن را از بین می‌برد (Guengerich، ۲۰۰٦). ال-کارنیتین از اسپرم در برابر پراکسیداسیون لیپید محافظت می‌کند که ممکن است به نقش متابولیکی و بیوشیمیایی آن مرتبط باشد (Fattah و همکاران، ۲۰۱۷). کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در اثر افزودن ال-کارنیتین به‌طورمعمول در مطالعات کلینیکی نشان داده‌شده است (Derin و همکاران، ۲۰۰٤). هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات حفاظتی ال-کارنیتین بر پارامترهای حرکتی اسپرم، عملکرد غشا، شکست DNA، تولید MDA،

فعالیت میتوکندری، یکپارچگی آکروزوم و نیز بر میزان آپوپتوز اسپرم بز پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی بوده است.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش تعداد ۵ رأس بز نژاد سانن ۴-۳ ساله با میانگین وزنی ۵ ± ۸۰ کیلوگرم برای مطالعه انتخاب شدند. در طول اجرای آزمایش، دام‌ها جیره پایه را بر اساس استانداردهای ارائه‌شده توسط NRC 2007 و آب و نمک را به‌صورت آزاد دریافت نمودند. ترکیبات جیره پایه در جدول ۱ نشان داده‌شده است.

جدول ۱- اجزای خوراک پایه بر اساس درصد ماده خشک

Table 1- Ingredients of basal feed (based on dry matter%)

اجزا Ingredients	درصد percent
دانه ذرت Corn grain	28.00
جو Barley	6.04
سبوس گندم Wheat bran	10.18
نمک Salt	0.32
روغن ماهی Fish oil	2.00
کربنات کلسیم Calcium carbonate	0.50
پیش مخلوط مواد معدنی و ویتامینه Mineral and Vitamin Premix	0.50
یونجه Alfalfa	41.96
کاه گندم Wheat straw	9.50
ترکیبات شیمیایی (درصد) Chemical component	
پروتئین خام Crude protein	12.00
انرژی قابل متابولیسم ME (Mcal/kg)	2.24
الیاف محلول در شوینده خنثی NDF	48.60
عصاره اتری Ether Extract	5.28
کلسیم (درصد در ماده خشک) Ca (%DM)	0.79
فسفر (درصد در ماده خشک) P(%DM)	0.31

برای بررسی اثر ال-کارنیتین بر منی بز، نمونه جمع‌آوری‌شده منجمد و یخ گشایی شده و مورد ارزیابی میکروسکوپی قرار گرفت. به این منظور بزها به مدت دو هفته برای اسپرم گیری عادت دهی شدند و سپس جمع‌آوری منی دو بار در هفته و با استفاده از واژن مصنوعی انجام شد. پس از جمع‌آوری منی از دام و قبل از آنکه در فرایند انجماد مورداستفاده قرار گیرد، باید کمیت و کیفیت آن شامل رنگ، بو، غلظت، حجم منی و تحرک اسپرم موردبررسی قرار گیرد. بر این اساس فقط از نمونه‌هایی که به رنگ کرمی، حجم ۰/۱-۱ میلی‌لیتر و دارای اسپرم‌هایی بازنده‌مانی بیش از ۷۰ درصد و مورفولوژی غیرطبیعی کمتر از ۱۵ درصد و غلظت ۳×۱۰^{۹} اسپرم در هر میلی‌لیتر بود برای آزمایش استفاده شد (Heidari و همکاران، ۲۰۲۲). سپس برای از بین بردن اثرات فردی، نمونه‌های منی جمع‌آوری‌شده در هر نوبت اسپرم گیری با یکدیگر مخلوط شده و وارد مرحله انجماد شدند. رقیق‌کننده پایه منی در این آزمایش رقیق‌کننده بر پایه‌ی تریس بود که متشکل از ۳۰/۷ گرم بر لیتر تریس، ۱۲/۶ گرم بر لیتر فروکتوز، ۱۶/۴ گرم بر لیتر اسیدسیتریک، ۵ در

صد گلیسرول، ۰/٦ گرم بر لیتر جنتامایسین، ۱۵ در صد زرده تخم‌مرغ و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود. برای این منظور غلظت‌های مختلف ال-کارنیتین (۰، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) به رقیق‌کننده پایه اضافه شد. رقیق‌سازی در دمای اتاق و به نسبت ۱ حجم منی و ۱۰ حجم رقیق‌کننده پایه انجام شد. به‌طوری‌که غلظت نهایی اسپرم ۳۰۰ میلیون در هر میلی‌لیتر بود. ابتدا تمام مواد شیمیایی لازم برای ساخت رقیق‌کننده با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به تمام مواد اضافه‌شده و مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه توسط مگنت همگن شد. به ازا هر میلی‌لیتر رقیق‌کننده، ۰/٦ گرم در لیتر جنتامایسین به رقیق‌کننده اضافه شد. پس از تهیه رقیق‌کننده، pH محلول به‌وسیله pH متر دیجیتال به میزان ٦/۸ و اسمولاریته با دستگاه اسمومتر ٤۲۵ میلی‌اسمول در لیتر تنظیم شد. در مرحله بعد غلظت‌های مختلف ال-کارنیتین (۰، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) به رقیق‌کننده پایه اضافه شد (Heidari و همکاران، ۲۰۲۲).

به‌منظور انجماد، یک رک را روی ظرف حاوی ازت مایع قرار داده به‌طوری‌که فاصله رک از سطح ازت مایع ۱۰ سانتی‌متر بود. سپس پایوت‌ها را روی رک به‌صورت افقی چیده و بعد از ۱۰-۸ دقیقه قرارگیری در بخار ازت مایع و رسیدن دمای پایوت‌ها به ۸۰- تا ۱۰۰- درجه سانتی‌گراد، پایوت‌های منجمدشده به کانیستر منتقل‌شده و در ازت مایع با دمای ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد موجود در تانک ازت ذخیره شدند. به‌منظور یخ گشایی، پایوت‌ها به مدت ۱ دقیقه در آب ۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. سپس لبه پرس شده آن قیچی شده و به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل‌شده و جهت ارزیابی میکروسکوپی مورداستفاده قرار گرفت. سپس فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل تحرک و تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، عملکرد غشا، مورفولوژی اسپرم، یکپارچگی آکروزوم، فعالیت میتوکندری، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم و میزان شکست DNA مورد ارزیابی قرار گرفت (Heidari و همکاران، ۲۰۲۲).

برای بررسی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی از نرم‌افزار کامپیوتری آنالیز اسپرم[1] (SCA version 5.1; microptic, Barcelona, Spain) استفاده شد. به این صورت که دو پایوت از هر تیمار به داخل میکروتیوب انتقال داده شد. سپس توسط سمپلر، ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام منتقل و یک لامل تمیز روی آن قرار گرفت. لام زیر میکروسکوپ فازکنتراست منتقل‌شده و فراسنجه‌های حرکتی اسپرم با استفاده از رایانه مجهز به نرم‌افزار کامپیوتری آنالیز اسپرم ارزیابی شد (Masoudi و همکاران، ۲۰۲۲). به‌منظور بررسی یکپارچگی غشا پلاسمایی از آزمون تورم هیپواسموتیک[2] استفاده شد (Revell و Mrode، ۱۹۹٤). بر اساس اسمولاریته محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌نماید. اسمولاریته محیط هیپواسموتیک ۱۰۰ میلی‌اسمول و اسمولاریته موردنیاز برای اسپرم ۳۷۵-۳۲۰ میلی‌اسمول است. بر این اساس اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریته پایین‌تر به‌سرعت واکنش اسمزی نشان می‌دهد و انتهای دم آن گره می‌خورد. روشن است که فقط اسپرم‌های با غشا سالم می‌توانند به این تغییر واکنش نشان دهند و اسپرم‌های مرده هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند. در این آزمون اسپرم‌های با دم گره‌خورده اسپرم‌های زنده و اسپرم‌هایی که دم آن‌ها صاف است اسپرم مرده تلقی می‌شوند. برای انجام تست ۳۰ میکرولیتر نمونه اسپرم به نسبت ۱:۱۰ با ۳۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه را روی

1. Computer-Aided Sperm Analysis (CASA)
2. Hypo osmotic (HOST)

گوشه لام قرار داده و با لام دیگر گسترش تهیه نموده و پس از خشک شدن نمونه، آن را توسط میکروسکوپ نوری ارزیابی می‌نمایند. تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش‌شده و سپس درصد اسپرم‌های با غشا سالم و تخریب‌شده محاسبه شد (Masoudi و همکاران، ۲۰۲۲).

به منظور بررسی اختلالات مورفولوژی اسپرم از محلول‌هانکوک استفاده شد. محلول‌هانکوک شامل محلول سدیم سالین (۹/۰۱ گرم کلرید سدیم در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و محلول بافر است. برای ارزیابی اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیرطبیعی، ۳ قطره از هر نمونه (۳۰ میکرولیتر) به میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر محلول‌هانکوک اضافه شد. سپس یک قطره از این محلول روی لام قرارگرفته و لامل‌گذاری شد. با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست و بزرگنمایی ٤۰۰ اسپرم‌های غیرطبیعی شمارش‌شده و نتیجه به‌صورت درصد کل اسپرم‌های غیرطبیعی (آکروزوم غیرطبیعی، سر جداشده، اختلالات دم و قطعه میانی اسپرم) به کل اسپرم شمارش‌شده گزارش شد (Heidari و همکاران، ۲۰۲۲). بررسی یکپارچگی آکروزم اسپرم با استفاده از رنگ فلورسنت PSA انجام می‌شود (Zarei و همکاران، ۲۰۲۲). جهت این رنگ‌آمیزی، مقدار ۲۵۰ میکرولیتر اسپرم را به لوله ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه کرده و در ۱۲۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. پس از برداشتن پلت رویی و تنظیم غلظت پلت اسپرم به میزان یک میلیون اسپرم در میلی‌لیتر، ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم در ۵۰ میکرولیتر اتانول ۹٦ درصد حل‌شده و محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد تا تثبیت شود. سپس ۱۰ میکرولیتر محلول اسپرم و اتانول روی لام قرار می‌گیرد به‌طوری‌که بتوان از آن گسترش تهیه نمود. پس از خشک شدن اتانول، ۲۰ میکرولیتر PSA (۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر) روی لام قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده می‌شود. بعدازاین مرحله لام را ۱۵ بار در آب مقطر غوطه‌ور کرده و بعد از خشک شدن با گلیسرول پوشش داده‌شده و تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید با میکروسکوپ فلورسنت و بزرگنمایی ٤۰۰ ارزیابی انجام می‌شود. اسپرم‌هایی که دارای سر سبز هستند به‌عنوان اسپرم دارای آکروزوم سالم و اسپرم‌های دارای کمربند سبز به‌عنوان اسپرم با آکروزم تخریب‌شده در نظر گرفته می‌شود.

پتانسیل غشا میتوکندری اسپرم توسط رنگ رودامین ۱۲۳ مورد ارزیابی قرار گرفت (Masoudi و همکاران، ۲۰۲۲). رودامین ۱۲۳ یک پراب فلورسنت کاتیونی است که توسط پتانسیل بین غشایی میتوکندری جذب‌شده و به غشا داخلی میتوکندری متصل می‌شود. فقدان رنگ فلورسنس نشان‌دهنده بروز اختلال در پتانسیل غشا میتوکندری است. برای ارزیابی فعالیت میتوکندری ابتدا نمونه اسپرم برای حذف قسمت رقیق‌کننده سانتریفیوژ شده و سپس پلت تشکیل‌شده با ۵۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس مخلوط - می‌شود. رنگ رودامین در اتاق تاریک به نمونه اسپرم اضافه می‌شود. ۱۰ میکرولیتر رودامین به نمونه اضافه‌شده و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از ۲۰ دقیقه ۱۰ میکرولیتر پروپیودیم آیودید[1] به نمونه اضافه شد. پس از آن میزان فعالیت میتوکندری نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. در نمودار فلوسایتومتری، نمونه رودامین مثبت و پروپیودیم آیودید منفی (R123+/ PI-) نمونه دارای میتوکندری فعال و نمونه رودامین مثبت و پروپیودیم آیودید مثبت (R123+/PI+) میتوکندری غیرفعال در نظر گرفته شد.

1. Propidium Iodide (PI)

به‌منظور تشخیص میزان وقوع آپوپتوز اسپرم که معیاری از زنده‌مانی اسپرم است از فسفاتیدیل‌سرین به‌عنوان یک نشانگر استفاده شد. فسفاتیدیل سرین در حالت طبیعی یا زنده اسپرم در داخل سیتوپلاسم اسپرم قرار دارد و حضور این نشانگر در سطح خارجی غشا پلاسمایی اسپرم علامت اولیه مبنی بر بروز آپوپتوز است زیرا در طول آپوپتوز، فسفاتیدیل-سرین از سطح سیتوپلاسمی غشا پلاسمایی به سطح خارج سلولی غشا تغییر مکان می‌دهد. انکسین وی[1] در حضور یون کلسیم تمایل زیادی به اتصال به فسفاتیدیل‌سرین دارد و به دلیل این ویژگی می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر برای تشخیص آپوپتوز مورداستفاده قرار گیرد. اگر انکسین وی به یک ماده فلورسنت متصل شود توسط دستگاه فلوسایتومتری تشخیص داده می‌شود. به‌طورمعمول برای تشخیص آپوپتوز از انکسین وی کونژوگه شده با رنگ‌های فلورسنت FITC و PI استفاده می‌شود تا بتوان توسط آن سه جمعیت سلولی زنده و مرده را تشخیص داد. به این منظور از کیت آپوتوز (IQP-116F, PSD Kit, the Netherland) استفاده شد. ابتدا نمونه منی برای حذف قسمت رقیق‌کننده سانتریفیوژ می‌شود. نمونه به‌وسیله بافر کلسیم شستشو شده و سپس ۱۰ میکرولیتر انکسین وی به منی اضافه‌شده و نمونه در مکان تاریک و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری می‌شود. پس از آن، ۱۰ میکرولیتر پروپیودیم آیودید به نمونه اضافه‌شده و بعد میزان جا-به‌جایی فسفاتیدیل‌سرین غشا اسپرم به وسیله دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در پایان دو گروه اسپرم سالم و آپوپوتوز اولیه به‌عنوان اسپرم زنده و دو گروه آپوپتوز ثانویه و نکروزه به‌عنوان اسپرم مرده گزارش شدند.

یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدهای غشا اسپرم اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدهید[2] توسط تیوباربیوتوریک اسید[3] است (Masoudi و همکاران، ۲۰۲۲). یک مولکول مالون دی آلدهید با دو مولکول تیوباربیوتوریک اسید واکنش داده و محصولی صورتی‌رنگ تولید می‌کند که دارای بیشترین جذب در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر است. برای انجام این آزمایش، یک میلی‌لیتر نمونه منی با یک میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید[4] ۲۰ درصد مخلوط شده در g×۹۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. سپس یک میلی‌لیتر از محلول بالای لوله با یک میلی‌لیتر تیوباربیوتوریک‌اسید در میکروتیوب مخلوط می‌شود. این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. نمونه پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شده و جذب نوری آن در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود.

یکی از روش‌های مناسب برای بررسی میزان آسیب‌های واردشده به DNA روش بررسی ساختار کروماتین اسپرم[5] است (Heidari و همکاران، ۲۰۲۲). این روش وابسته به رنگ فلورسنت است و بر اساس خاصیت دناتوره شدن ساختار DNA در مقابل حرارت یا ا اسیدی استوار است. در این روش از رنگ‌آمیزی توسط رنگ آکریدین اورنج[6] استفاده می‌شود. رنگ آکریدین اورنج یک رنگ انتخابی متاکروم برای اسید نوکلئیک است که به DNA یا RNA متصل می‌شود و در تعیین چرخه سلولی کاربرد دارد. این رنگ در اثر اتصال به DNA و طول‌موج ۵۲۵ نانومتر موجب انتشار رنگ سبز فلورسانس

1. Annexin V

2 .Malondialdehyde (MDA)
3. Thiobarbituric acid (TBA)
4. Trichloroacetic acid (TCA)
5. Sperm chromatin structure assay (SCSA)
6. Acridine Orange

می‌شود و بااتصال به RNA در طول‌موج ۶۳۰ نانومتر رنگ قرمز فلورسانس منتشر می‌کند. در اسپرم طبیعی، رنگ به DNA دورشته‌ای متصل شده و رنگ سبز دیده می‌شود و در اسپرم غیرطبیعی به DNA دناتوره شده که تک‌رشته‌ای است متصل می‌شود و رنگ قرمز یا نارنجی دیده می‌شود. نتیجه فرایند رنگ‌آمیزی سلول‌ها با این رنگ توسط دستگاه فلوسایتومتری یا میکروسکوپ فلورسنس آنالیز می‌شود. نتایج حاصل از آزمایش سطوح مختلف ال-کارنیتین در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از Proc GLM به‌وسیله نرم‌افزار آماری SAS آنالیز و سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش توکی انجام شد.

نتایج و بحث

اثر استفاده از ال-کارنیتین بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم بز پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی در جدول ۲ نشان داده‌شده است. بر اساس نتایج حاصل استفاده از غلظت‌های ۵ میلی‌مولار ال-کارنیتین در رقیق‌کننده انجماد اسپرم موجب حفظ تحرک و تحرک پیش‌رونده اسپرم پس از فرایند انجماد یخ‌گشایی شده است که این اختلاف در مقایسه با گروه کنترل و سایر گروه‌ها معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). استفاده از ال-کارنیتین تأثیری بر سایر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم نداشت.

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف ال- کارنیتین بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی

Table 2- The effect of different L-carnitine concentrations on sperm motility parameters after freezing-thawing process

تیمار ال-کارنیتین (میلی‌مولار) L-carnitine treatment (mM)						
خطای میانگین استاندارد SEM	10	5	2	1	0	فراسنجه‌ها Parameters
1.60	45.70[b]	53.60[a]	46.40[b]	45.70 [b]	44.30[b]	TM (%)
1.30	28.70[b]	33.30[a]	29.00[b]	28.60[b]	27.40[b]	PM (%)
1.50	86.00	87.50	86.10	87.40	85.30	VAP (µm/s)
1.00	77.70	78.80	77.90	78.20	77.00	VSL (µm/s)
2.0	165.50	167.40	166.40	165	164.20	VCL (µm/s)
1.10	46.90	47/00	46.80	47.30	46.80	LIN (%)

TM تحرک کل؛ درصد اسپرم‌های متحرک، PM تحرک پیش‌رونده؛ درصد اسپرم‌های دارای تحرک روبه‌جلو، VAP میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر،VSL سرعت در مسیر مستقیم، VCL سرعت در مسیر منحنی، LIN درصد خطی بودن حرکت اسپرم. حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ردیف است (P<۰/۰۵).

Different letters within the same row show significant differences among the groups (P<0.05). Means ± SEM of total motility (TM), progressive motility (PM), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), linearity (LIN) and lipid peroxidation (MDA) were assessed.

بر اساس مطالعات قبلی افزودن ال-کارنیتین به محیط انجماد اسپرم باعث حفظ تحرک (Zhang و همکاران، ۲۰۱۶) و یکپارچگی آکروزوم (Banihani و همکاران، ۲۰۱۲) اسپرم انسان شد. در حیوانات، ال-کارنیتین اثرات مفیدی بر تحرک اسپرم خوک (Yeste و همکاران ۲۰۱۰)، گاو (Sarıözkan و همکاران ۲۰۱۴)، بز (Bucak و همکاران، ۲۰۱۰)، قوچ (Galarza و همکاران، ۲۰۲۰)، خروس (Fattah و همکاران، ۲۰۱۷) و بلدرچین (Sarica و همکاران، ۲۰۰۷) نشان داده است که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعه حاضر، بهبود زنده‌مانی، تحرک و عملکرد غشا اسپرم ممکن است با نقش

متابولیکی ال-کارنیتین مرتبط باشد (Banihani و همکاران، ۲۰۱۲). ال-کارنیتین با تسهیل انتقال اسیدهای چرب از طریق غشا داخلی میتوکندری منجر به بهبود تولید آدنوزین‌تری‌فسفات در مسیر بتااکسیداسیون می‌شود که منبع مهم انرژی برای تحرک اسپرم محسوب می‌شود؛ بنابراین تسهیل در تأمین آدنوزین‌تری‌فسفات مکانیسم معقولی برای نقش ال-کارنیتین در حفظ تحرک و عملکرد غشایی اسپرم بز در طول فرآیند انجماد است. علاوه بر این، تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اسپرم منجر به تخریب غشا و کمبود آدنوزین‌تری‌فسفات می‌شود که می‌تواند بر کیفیت اسپرم تأثیر منفی داشته باشد (Dokmeci، ۲۰۰۵). ال-کارنیتین می‌تواند در از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن انباشته‌شده و ایجاد آسیب کمتر در طول ذخیره‌سازی اسپرم مؤثر باشد (Fattah و همکاران، ۲۰۱۷)، از سوی دیگر، غلظت ال-کارنیتین بالاتری در پلاسمای مایع منی نسبت به پلاسمای خون یافت شد (Jeulin و Lewin، ۱۹۹٦) که نشان‌دهنده نقش مهم ال-کارنیتین در تولید انرژی از طریق چرخه پیروات است (Gibb و همکاران، ۲۰۱۵). سیستم پیروات در حضور ال-کارنیتین کارآمدتر است (Stradaioli و همکاران، ۲۰۰۰)، بنابراین راندمان بالاتر سیستم پیروات می‌تواند دلیل دیگری برای تحرک و عملکرد غشایی بالاتر نمونه‌های تیمار شده با ال-کارنیتین باشد (Galarza و همکاران، ۲۰۲۰). با توجه به مطالعات پیشین، ال-کارنیتین تحرک اسپرم انسان (Zhang و همکاران، ۲۰۱٦)، بز (Bucak و همکاران، ۲۰۱۰)، قوچ (Galarza و همکاران، ۲۰۲۰) و گربه (Manee-In و همکاران، ۲۰۱٤) را بهبود بخشیده که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. مطالعه دیگری گزارش داد که تیمار اسپرم انسان با ال-کارنیتین هیچ اثر قابل‌توجهی بر تحرک اسپرم و عملکرد غشا ندارد (Duru و همکاران، ۲۰۰۰). این اختلاف می‌تواند به عوامل مختلفی مانند اختلاف گونه، اجزای رقیق‌کننده و روش‌های انجماد مربوط باشد. ال-کارنیتین همچنین قادر است غشا پلاسمایی اسپرم را تثبیت کند که احتمالاً از طریق تعامل با فسفولیپید غشایی که سیالیت غشا پلاسمایی را تعدیل می‌کنند انجام می‌شود. این پدیده مقاومت اسپرم را در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد و یخ گشایی بهبود می‌بخشد.

تأثیر استفاده از تیمار ال- کارنیتین در رقیق‌کننده انجماد بر سلامت غشا اسپرم، مورفولوژی غیرطبیعی و میزان شکست DNA اسپرم بز پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی در جدول ۳ نشان داده‌شده است. پس از انجام تست‌هاست بیشترین درصد اسپرم با غشا سالم در گروه دریافت‌کننده ۵ میلی‌مولار ال- کارنیتین مشاهده‌شده که این اختلاف نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). همچنین نتایج نشان داد استفاده از تیمارهای ال-کارنیتین در رقیق‌کننده انجماد اسپرم پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی تأثیری بر مورفولوژی غیرطبیعی نداشته و درصد این فراسنجه در میان گروه‌ها معنی‌دار نبوده است. کمترین درصد اسپرم با DNA آسیب‌دیده در گروه دریافت‌کننده ۵ میلی‌مولار ال- کارنیتین مشاهده‌شده که این اختلاف نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵).

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف ال-کارنیتین بر عملکرد غشا، مورفولوژی و شکست DNA اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی

Table 3- The effect of different concentrations of L-carnitine on membrane function, morphology and DNA fragmentation of sperm after freezing-thawing

تیمار ال-کارنیتین (میلی‌مولار) L-carnitine treatment (mM)						
خطای میانگین استاندارد SEM	10	5	2	1	0	فراسنجه ها Parameters
1.00	45.80^{b}	52.50^{a}	46.90^{b}	46.20^{b}	45.50^{b}	**عملکرد غشا (٪)** Membrane performance (%)
1.60	17.00	17.20	16.20	16.50	15.00	**مورفولوژی (٪)** Morphology (%)
1.20	13.10^{b}	9.50^{a}	12.90^{b}	13.30^{b}	14.80^{b}	شکست DNA (٪) DNA fragmentation (%)

حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ردیف است (P<۰/۰۵).

Different letters within the same row show significant differences among the groups (P<0.05).

در این آزمایش میزان اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی تحت تأثیر مکمل ال-کارنیتین قرار نگرفت. به نظر می‌رسد که مورفولوژی اسپرم تحت تأثیر تکنیک‌های پردازش قرار نمی‌گیرد، زیرا ناهنجاری‌های اولیه اسپرم در طول فرایند اسپرم‌زایی رخ می‌دهد. نتایج این پژوهش مطابق با برخی مطالعات اخیر است (Fattah و همکاران، ۲۰۱۷). آن‌ها گزارش نمودند افزودن ال-کارنیتن به رقیق‌کننده منی خروس هیچ تأثیری بر مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در طول فرآیند انجماد نداشت، اما اثر مفید ال-کارنیتن خوراکی بر مورفولوژی اسپرم در اسب گزارش‌شده است (Stradaioli و همکاران، ۲۰۰۰). جدول ٤ اثر استفاده از ال-کارنیتین بر میزان پراکسیداسیون لیپید، فعالیت میتوکندری و یکپارچگی آکروزوم اسپرم بز پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی را نشان می‌دهد. با استفاده از ال-کارنیتین در رقیق‌کننده انجماد اسپرم کمترین میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید در گروه دریافت‌کننده ۵ میلی‌مولار ال-کارنیتین مشاهده شد که اختلاف آن‌ها نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵).

در ارزیابی فعالیت میتوکندری توسط رنگ فلورسنت رودامین، بیشترین درصد اسپرم با میتوکندری سالم در گروه‌های دریافت‌کننده ۵ میلی‌مولار ال-کارنیتین مشاهده شد (P<۰/۰۵). همچنین به‌منظور ارزیابی یکپارچگی آکروزم اسپرم از رنگ فلورسنت PSA استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل بیشترین میزان حفظ یکپارچگی آکروزوم در گروه‌های دریافت‌کننده ۵ میلی مولار ال-کارنیتین مشاهده‌شده که با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشته است (P<۰/۰۵).

ال-کارنیتین می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل نموده و یون‌های سوپر اکسید تولیدشده را مهار کرده و رادیکال‌های آزاد اکسیژن انباشته‌شده را سم‌زدایی نماید (Banihani و همکاران، ۲۰۱٤). فعالیت گزانتین‌اکسیداز را مهار کرده و کلات فلزی و پراکسید هیدروژن را از بین می‌برد (Guengerich، ۲۰۰٦). ال-کارنیتین از اسپرم در برابر پراکسیداسیون لیپید محافظت می‌کند که ممکن است به نقش متابولیکی و بیوشیمیایی آن مرتبط باشد (Fattah و همکاران، ۲۰۱۷).

جدول ٤- اثر غلظت‌های مختلف ال-کارنیتین بر تولید MDA، فعالیت میتوکندری و یکپارچگی آکروزوم اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی

Table 4- The effect of different L-carnitine concentrations on MDA production, mitochondrial activity and sperm acrosome integrity after freezing-thawing

خطای میانگین استاندارد SEM	تیمار ال-کارنیتین (میلی‌مولار) L-carnitine treatment (mM)					فراسنجه‌ها Parameters
	10	5	2	1	0	
0.30	3.50^{b}	2.70^{a}	3.15^{ab}	3.55^{b}	4.25^{c}	غلظت مالون دی آلدهید MDA Concentration (nmol/ml)
1.10	54.50^{b}	58.90^{a}	55.00^{b}	53.40^{b}	50.20^{c}	فعالیت میتوکندری (٪) (%) Mitochondrial activity
1.30	56.60^{bc}	62.70^{a}	58.40^{b}	56.00^{bc}	54.80^{c}	یکپارچگی آکروزم (٪) (%) Acrosome integrity

حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ردیف است (P<۰/۰۵).

Different letters within the same row show significant differences among the groups (P<0.05).

کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در اثر افزودن ال-کارنیتین به‌طورمعمول در مطالعات کلینیکی نشان داده‌شده است (Derin و همکاران، ۲۰۰٤). نتایج مطالعه حاضر در ارتباط با پراکسیداسیون لیپیدی نیز نشان می‌دهد پراکسیداسیون لیپید در گروه دریافت‌کننده ۵ میلی‌مولار ال-کارنیتین کمتر بود که با یافته‌های مطالعات پیشین در مورد اثرات مفید ال-کارنیتین بر سلول‌های مختلف (Di Giacomo و همکاران، ۱۹۹۳) و سلول اسپرم (Banihani و همکاران، ۲۰۱۲) مطابقت داشت. افزودن غلظت بهینه ال-کارنیتین به محیط انجماد مهم است، زیرا غلظت مالون‌دی‌آلدهید در هنگام استفاده از غلظت‌های غیر بهینه افزایش می‌یابد. در مطالعات قبلی گزارش‌شده است که غلظت‌های بالاتر ال-کارنیتین برای اسپرم اپیدیدیمی گربه سمی بوده است (Manee-In و همکاران، ۲۰۱٤). اسپرم هرگونه ظرفیت شاتل ال-کارنیتین مخصوص به خود را برای انتقال ال-کارنیتین دارد، بنابراین دوز مطلوب در گونه‌های مختلف متفاوت است. در مطالعه حاضر، ۱۰ میلی‌مولار ال-کارنیتین غیر سمی بود، اما به‌اندازه دوز بهینه (۵ میلی‌مولار) مؤثر نبود، بنابراین عملکرد آن کمتر از گروه دریافت‌کننده ۵ میلی‌مولار ال-کارنیتین بود. مقدار اضافی آنتی‌اکسیدان نسبت به ظرفیت شاتل می‌تواند به یک سوبسترای اکسیداتیو تبدیل شود که اسپرم را در برابر پراکسیداسیون لیپیدی حساس‌تر می‌کند (Fattah و همکاران، ۲۰۱۷)؛ بنابراین مطالعات بیشتری برای شناسایی مکانیسم مولکولی دقیق اثرات مضر سطوح بالای ال-کارنیتین موردنیاز است. در این پژوهش استفاده از ال-کارنیتین در بهبود فعالیت میتوکندری مؤثر بود. تسهیل حمل‌ونقل اسیدهای چرب از طریق غشا داخلی میتوکندری توسط ال-کارنیتین منجر به بهبود تولید آدنوزین‌تری‌فسفات از طریق بتااکسیداسیون می‌شود که سوخت بهتری را برای تحرک اسپرم فراهم می‌کند. همچنین بین فعالیت میتوکندری و تحرک اسپرم رابطه منطقی وجود دارد. تحرک اسپرم نسبتاً وابسته به فعالیت میتوکندری است (Shahverdi و همکاران، ۲۰۱۵). این وضعیت می‌تواند به دلیل نقش اسمولالیتی ال-کارنیتین در رقیق‌کننده باشد. افزودن ال-کارنیتین به رقیق‌کننده منجر به حذف جزئی Na^{+}از رقیق‌کننده برای حفظ

ایزوتونیسیتی آن می‌شود (Silver و Erecińska، ۱۹۹۷). Na^+ کاهش آدنوزین‌تری‌فسفات را با فعال کردن پمپ‌های Na^+-ATPase افزایش می‌دهد (Silver و Erecińska، ۱۹۹۷)؛ بنابراین اثرات مفید ال-کارنیتین ممکن است به دلیل حذف Na^+ باشد (Gibb و همکاران، ۲۰۱۵). زیرا کاهش Na^+در محیط باعث کاهش انرژی موردنیاز اسپرم می‌شود که منجر به کاهش آهسته‌تر تخلیه آدنوزین‌تری‌فسفات می‌شود و به‌طور مؤثری فعالیت میتوکندری و زنده‌مانی اسپرم را برای دوره‌های ذخیره‌سازی طولانی‌تر بهبود می‌بخشد (Gibb و همکاران، ۲۰۱۵). انجماد باعث ایجاد تغییرات متعدد در آکروزوم اسپرم و کانال‌های کلسیمی می‌شود که ظرفیت پذیری انجمادی نامیده می‌شود (Kadirvel و همکاران، ۲۰۱۲). افزایش فاکتورهای آپوپتوز مانند خارج شدن فسفاتیدیل‌سرین در طول فرآیند انجماد می‌تواند واکنش آکروزوم را القا نماید (Anzar و همکاران، ۲۰۰۲). استفاده از ۵ میلی‌مولار ال-کارنیتین یکپارچگی آکروزوم بیشتری را تأمین می‌نماید که نشان‌دهنده نقش محافظتی ال-کارنیتین بر یکپارچگی آکروزوم است. اثر ال-کارنیتین بر یکپارچگی آکروزوم در حین انجماد در اسپرم خروس (Fattah و همکاران، ۲۰۱۷) و بزهای آنغوره (Bucak و همکاران، ۲۰۱۰) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج ارائه‌شده در حفظ یکپارچگی آکروزوم پس از فرآیند انجماد با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت.

جدول ۵، تأثیر استفاده از تیمار ال-کارنیتین در رقیق‌کننده بر زنده‌مانی و میزان پیشرفت آپوپتوز اسپرم بز پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی را نشان می‌دهد. در این جدول اسپرم‌های سالم و دارای آپوپتوز اولیه به‌عنوان زنده و اسپرم‌های نکروزه و دارای آپوپتوز ثانویه به‌عنوان مرده در نظر گرفته شدند. در میان گروه‌های دریافت‌کننده ال-کارنیتین بیشترین تعداد اسپرم زنده مربوط به گروه دریافت‌کننده ۵ میلی‌مولار ال-کارنیتین است که اختلاف آن با گروه‌های کنترل و سایر تیمارها معنی‌دار بوده است ($P<0/05$). نتایج نشان می‌دهد استفاده از ال-کارنیتین موجب کاهش تعداد مرگ سلولی ناشی از آپوپتوز در طول فرایند انجماد-یخ‌گشایی شده است و کمترین تعداد اسپرم مرده مربوط به تیمار ۵ میلی‌مولار ال-کارنیتین بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($P<0/05$).

جدول ۵- اثر غلظت‌های مختلف ال-کارنیتین برآپوپتوز اسپرم پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی

Table 5- The effect of different L-carnitine concentrations on sperm apoptosis after freezing-thawing process

خطای میانگین استاندارد SEM	تیمار ال-کارنیتین (میلی‌مولار) L-carnitine treatment (mM)					فراسنجه‌ها Parameters
	10	5	2	1	0	
1.50	51.30^b	56.40^a	52.40^b	51.50^b	50.00^b	زنده (٪) Live (%)
1.50	48.70^b	43.60^a	47.60^b	49.50^b	50.00^b	مرده (٪) Dead (%)

حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ردیف است ($P<0/05$).

Different letters within the same row show significant differences among the groups ($P<0.05$).

تغییرات شبه آپوپتوز در اسپرم با استفاده از انکسین وی/ پروپیودیم آیودید برای تشخیص جابجایی فسفاتیدیل‌سرین به‌عنوان نشانه‌ای از تغییرات شبه آپوپتوز مورد ارزیابی قرار گرفت. فرآیند انجماد و یخ گشایی خارج شدن فسفاتیدیل‌سرین از سمت داخلی غشا به سمت خارج غشا را افزایش می‌دهد

(Anzar و همکاران، ۲۰۰۲). فرضیه ما این بود که ال-کارنیتین ممکن است بروز نشانگرهای آپوپتوز مانند فسفاتیدیل‌سرین را به دلیل اثر تثبیت‌کننده ال-کارنیتین بر غشا پلاسمایی اسپرم کاهش دهد. نتایج پژوهش ما با مطالعات قبلی مطابقت داشت. بر این اساس ال-کارنیتین آپوپتوز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در موش‌هایی که از رژیم غذایی حاوی مکمل ال-کارنیتین تغذیه می‌کردند کاهش داد (Kang و همکاران، ۲۰۱۱). در یک مطالعه انسانی مشابه، زنده‌مانی بالاتر اسپرم پس از نگهداری انجمادی در حضور ال-کارنیتین به دست آمد (Banihani و همکاران، ۲۰۱٤). علاوه بر این، ال-کارنیتین تغییرات شبه آپوپتوز را در حفاظت انجمادی اسپرم خروس که در رقیق‌کننده حاوی ال-کارنیتین منجمد شده بود را کاهش داد (Fattah و همکاران، ۲۰۱۷) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

آسیب‌های شیمیایی و اکسیداتیو ناشی از سردسازی و انجماد موجب اختلال در عملکرد اسپرم می‌شوند؛ بنابراین راه‌کار استفاده از دام‌هایی با صفات برتر، بهینه‌سازی ذخیره اسپرم است. استفاده از مواد آنتی‌اکسیدان در رقیق‌کننده اسپرم می‌تواند سبب بهبود بازده اسپرم منجمد شود. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، استفاده از ال-کارنیتین در فرایند انجماد موجب بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز شد، به‌طوری‌که در اسپرم یخ گشایی شده بیشترین میزان تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، فعالیت میتوکندری، زنده‌مانی و کمترین میزان پراکسیداسیون لیپید و تغییرات شبه آپوپتوز در تیمار دریافت‌کننده ۵ میلی‌مولار ال-کارنیتین مشاهده شد؛ بنابراین، مکمل سازی محیط انجماد منی بز با مقادیر بهینه ال-کارنیتین روشی عملی برای حفظ کیفیت منی بز برای اهداف تولیدمثلی و تلقیح مصنوعی گله‌های تجاری می‌باشد.

References

Anzar, M., He, L., Buhr, M. M., Kroetsch, T. G., & Pauls, K. P. (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biology of Reproduction*. 66(2), 354-360.

Banihani, S., Agarwal, A., Sharma, R., & Bayachou, M. (2014). Cryoprotective effect of L-carnitine on motility, vitality and DNA oxidation of human spermatozoa. *Andrologia*, 46(6), 637-641.

Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sarıözkan, S., Başpınar, N., Taşpınar, M., Coyan, K., Bilgili, A., Akalın, P. P., Büyükleblebici, S., Aydos, S., Ilgaz, S., Sunguroğlu, A., & Oztuna, D. (2010). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, 61(3), 248-253.

Derin, N., Izgut-Uysal, V. N., Agac, A., Aliciguzel, Y., & Demir, N. (2004). L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 55(3), 595-606.

Di Giacomo, C., Latteri, F., Fichera, C., Sorrenti, V., Campisi, A., Castorina, C., Russo, A., Pinturo, R., & Vanella, A. (1993). Effect of acetyl-L-carnitine on lipid peroxidation and xanthine oxidase activity in rat skeletal muscle. Neurochem Res, 18(11), 1157-1162.Dokmeci D. Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia Medica*. 2005;47:26-30.

Dokmeci, D. (2005). Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia Med* (Plovdiv), 47(1), 26-30.

Duru, N. K., Morshedi, M., Schuffner, A., & Oehninger, S. (2000). Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine does not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation-thawing. *Fertility and Sterility*, 74(4), 715-720.

Esmaeilkhanian, S., Asadzadeh, N., & Masoudi, R. (2023). Flow cytometry study of post-thawed buck spermatozoa: Mito-TEMPO improves cryopreservation performance by controlling apoptosis rate, DNA fragmentation and ROS production. *Cryobiology*, 110, 108-110.

Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., Esmaeili, V., & Najafi, A. (2017). L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*, 74, 148-153

Gibb, Z., Lambourne, S. R., Quadrelli, J., Smith, N. D., & Aitken, R. J. (2015). L-carnitine and pyruvate are prosurvival factors during the storage of stallion spermatozoa at room temperature. *Biology of Reproduction*, 93(4), 104.

Guengerich, F. P. (2006). Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*, 8(1), E101-111.

Heidari, M., Qasemi-Panahi, B., Moghaddam, G., Daghigh-Kia, H., & Masoudi, R. (2022). L-carnitine improves quality parameters and epigenetic patterns of buck's frozen-thawed semen. *Animal Reproduction Science*, 247, 107092.

Jeulin, C., & Lewin, L. M. (1996). Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Human Reproduction Update*, 2(2), 87-102.

Kadirvel, G., Periasamy, S., & Kumar, S. (2012). Effect of cryopreservation on apoptotic-like events and its relationship with cryocapacitation of buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(1), 143-150.

Kang, N., Ma, J. H., Zhou, X., Fan, X. B., Shang, X. J., & Huang, Y. F. (2011). Effects of L-carnitine on the apoptosis of spermatogenic cells and epididymal sperm count and motility in rats with diabetes mellitus. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 17(5), 422-426.

Manee-In, S., Parmornsupornvichit, S., Kraiprayoon, S., Tharasanit, T., Chanapiwat, P., & Kaeoket, K. (2014). L-carnitine Supplemented Extender Improves Cryopreserved-thawed Cat Epididymal Sperm Motility. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)*, 27(6), 791-796.

Masoudi, R., Esmaeilkhanian, S., Sharafi, M., Abdollahi, Z., Jafari, V., Hatefi, A., Zarei, F., Asadzadeh, N., Sadeghipanah, A., Barfourooshi, H. J., & Banabazi, M. H. (2022). Cysteamine enhances quality and fertility potential of rooster semen in cooled storage. *Theriogenology*, 177, 29-33.

Masoudi, R., Kohram, H., Shahne, A. Z., & Davoud, S. D. M. A. (2012). Effect of estradiol and oxytocin on ovine cervical relaxation. *African Journal of Biotechnology*, 11(11), 2803-2806.

Revell, S. G., & Mrode, R. A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36(1), 77-86.

Rezaei, A., Bahmani, H. R., Mafakheri, S., Farshad, A., Nazari, P., & Masoudi, R. (2023). Protective effects of different doses of MitoQ separately and combined with trehalose on oxidative stress and sperm function of cryopreserved Markhoz goat semen. *Cryobiology*, 110, 36-43.

Sarica, S., Corduk, M., Suicmez, M., Cedden, F., Yildirim, M., & Kilinc, K. (2007). The Effects of Dietary l-Carnitine Supplementation on Semen Traits, Reproductive Parameters, and Testicular Histology of Japanese Quail Breeders. *Journal of Applied Poultry Research*, 16(2), 178-186.

Shahverdi, A., Sharafi, M., Gourabi, H., Yekta, A. A., Esmaeili, V., Sharbatoghli, M., Janzamin, E., Hajnasrollahi, M., & Mostafayi, F. (2015). Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology*, 83(1), 78-85.

Silver, I. A., & Erecińska, M. (1997). Energetic demands of the Na+/K+ ATPase in mammalian astrocytes. *Glia*, 21(1), 35-45.

Stradaioli, G., Sylla, L., Zelli, R., Verini Supplizi, A., Chiodi, P., Arduini, A., & Monaci, M. (2000). Seminal carnitine and acetylcarnitine content and carnitine acetyltransferase activity in young Maremmano stallions. *Animal Reproduction Science*, 64(3-4), 233-245.

Walters, J. L. H., De Iuliis, G. N., Nixon, B., & Bromfield, E. G. (2018). Oxidative Stress in the Male Germline: A Review of Novel Strategies to Reduce 4-Hydroxynonenal Production. *Antioxidants* (Basel), 7(10).

Yeste, M., Sancho, S., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., & Bonet, S. (2010). A diet supplemented with L-carnitine improves the sperm quality of Piétrain but not of Duroc and Large White boars when photoperiod and temperature increase. *Theriogenology*, 73(5), 577-586.

Zarei, F., Daghigh-Kia, H., & Masoudi, R. (2022). Supplementation of ram's semen extender with Mito-TEMPO II: Quality evaluation and flow cytometry study of post-thawed spermatozoa. *Andrologia*, 54(1), e14299.

Zhang, W., Li, F., Cao, H., Li, C., Du, C., Yao, L., Mao, H., & Lin, W. (2016). Protective effects of l-carnitine on astheno- and normozoospermic human semen samples during cryopreservation. *Zygote*, 24(2), 293-300.