Veterinary Clinical Pathology, Vol.18, No. 69, Spring 2024

"Review article" **DOI: 10.30495/jvcp.2024.1984584.1411**

The importance and characteristics of sperm diluents

Moghaddam, Gh.[1*], Shafaati Alishah, P.[2]

1- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2- Physiology Graduate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
*Corresponding author's Email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir
(Received: 2024\1\16 Accepted: 2024\5\12)

Abstract

Despite the significant progress in sperm cryopreservation methods in recent years, research has proven that long-term storage of sperm in freezing and cold storage causes serious damage to sperm. The occurrence of fat peroxidation and the metabolism of spermatozoids results in destruction of spermatozoa during freezing and storage. Temperature shock, the formation of intracellular ice crystals, cellular dehydration, increased salt concentration and osmotic shock may occur during the freezing and thawing process. In addition, cryopreservation causes harmful structural changes in the plasma membrane. Changes in membrane permeability to some ions such as calcium during the freezing and thawing process have been reported. Also, during cryopreservation, the formation of intracellular and extracellular ice causes cell destruction and death. The sperm plasma membrane is the main site of damage during the freezing and thawing process and is very sensitive to lipid peroxidation due to the presence of many unsaturated fatty acids. These changes may have a role in the accumulation of toxic products of metabolism, mainly reactive oxygen species (ROS) that are generated through lipid peroxidation of sperm membranes. Small amounts of ROS play an important role in sperm capacitation, increased sperm motility, acrosome reaction, and oocyte fertilization in humans, cows, horses, pigs, and rams. Therefore, to solve these problems, various antioxidants, preservatives and chelators are used in sperm extenders.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Additives, Cooled preservation, Cryopreservation, Seminal plasma, Sperm.

"مقاله مروری" DOI: 10.30495/jvcp.2024.1984584.1411

اهمیت و خصوصیات رقیق‌کننده‌های اسپرم

غلامعلی مقدم[1*]، پریسا شفاعتی‌علیشاه[2]

۱- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۲۳)

چکیده

با وجود پیشرفت‌های چشمگیری که در روش‌های نگه‌داری انجمادی اسپرم در طول سال‌های اخیر صورت گرفته است، تحقیقات ثابت کرده که نگه‌داری طولانی مدت اسپرم در حالت انجماد و نگه‌داری سرمایی آسیب جدی به اسپرم وارد می‌کند. به‌وجود آمدن پراکسیداسیون چربی و متابولیسم خود اسپرماتوزوئیدها در هنگام انجماد و نگه‌داری، سبب از بین رفتن اسپرماتوزوئیدها می‌شود. شوک دمایی، شکل کریستال‌های یخ داخل سلولی، دهیدراتاسیون سلولی، افزایش غلظت نمک‌ها و شوک اسموتیک در طول فرآیند انجماد و یخ‌گشایی ممکن است صورت گیرد. علاوه بر این، نگه‌داری انجمادی تغییرات مضر ساختاری در غشای پلاسما ایجاد می‌کند. تغییرات در نفوذپذیری غشاء نسبت به برخی از یون‌ها مثل کلسیم در طول فرآیند انجماد و یخ‌گشایی گزارش شده است. همچنین در هنگام نگه‌داری انجمادی، تشکیل یخ داخل و خارج سلولی سبب تخریب و مرگ سلولی می‌شود. غشای پلاسمایی اسپرم محل اصلی آسیب در طی فرآیند انجماد و ذوب است و به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیراشباع زیاد، در مقابل پراکسیداسیون لیپیدها بسیار حساس است. این تغییرات ممکن است در تجمع محصولات سمی ناشی از متابولیسم، به طور عمده از گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygene species) که از طریق پراکسیداسیون لیپیدی غشاهای اسپرم ایجاد می‌شوند، نقش داشته باشد. گونه‌های فعال اکسیژن در مقادیر کم، نقش مهمی در کاپاسیته شدن اسپرم، افزایش تحرک اسپرم، واکنش آکروزوم و لقاح تخمک را در قوچ دارد. بدین منظور جهت رفع این مشکلات از مواد مختلف آنتی‌اکسیدانی، حفاظت‌کننده‌ها و همچنین کلاتورها در رقیق‌کننده‌های اسپرم استفاده می‌شود.

کلیدواژه‌ها: افزودنی‌ها، نگه‌داری انجمادی، نگه‌داری سرمایی، اسپرم، سمینال‌پلاسما.

مقدمه

-تلقیح مصنوعی

تلقیح مصنوعی برای ارتقاء ژنتیکی حیوانات مزرعه‌ای ابداع گردیده است (Salamon and Maxwell, 1995).در تلقیح مصنوعی به دلیل عدم تماس مستقیم تولید مثلی، از انتقال بیماری‌های مقاربتی جلوگیری می‌شود (Shafaati Alishah *et al*., 2021). همچنین با انتخاب چند حیوان نر، اسپرم کافی برای تلقیح حدود هزار حیوان ماده در سال فراهم می‌شود. تلقیح مصنوعی در پرورش گاوهای شیری کابرد زیادی داشته، ولی هنوز پذیرش جهانی را در پرورش گوسفند دریافت ننموده است (Shafaati Alishah *et al*., 2020). تلقیح مصنوعی موفق، تحت تأثیر پارامترهای متعددی است که یکی از اصلی‌ترین پارامترها دسترسی به اسپرم‌های بارور است که این امر تنها در یک فرآیند انجماد موفق حاصل می‌شود. همچنین بستگی به توانایی جمع‌آوری مؤثر، ارزیابی و نگه‌داری منی از نرهای باکیفیت برای استفاده دزهای بیشتر تلقیح نیز می‌باشد (Watson, 2000 : Ferdinand *et al*., 2012)، البته کیفیت اسپرم قوچ، تحت تاثیر فصول سال هم می‌باشد، چون جفت‌گیری فصلی دارد (Moghaddam *et al*., 2012).

-ترکیبات و خصوصیات سمینال‌پلاسما

ترکیب بیوشیمیایی مایع منی در بین گونه‌ها بسیار متغیر است. برخی از ترکیبات سمینال‌پلاسما برای متابولیسم اسپرم، همچنین عملکرد، زنده‌مانی و انتقال اسپرم در دستگاه تناسلی ماده بسیار ضروری است. pH آن در قوچ و گاو نر کمی اسیدی و در شترها کمی بازی است. ترکیبات بیوشیمیایی سمینال‌پلاسمای حاصله از رته‌تستیس، اپیدیدیم و غدد جنسی ضمیمهٔ مجرای تناسلی نر ناشناخته است (Mann and Lutwak-Mann, 1981). تشخیص و شناسایی چندین ماده در ترشحات غدد ضمیمهٔ جنسی مثل اسید سیتریک، پروستات فسفاتاز، فروکتوز و فسفریل کولین، راه را برای درک و مطالعهٔ فعالیت‌های مختلف شیمیایی ترشحی و نقش احتمالی غدد برای اسپرم، باز کرده است (Mann and Lutwak-Mann, 1981). استفاده از مایع منی رقیق‌سازی و حذف سمینال‌پلاسما در تلقیح مصنوعی گونه‌های اهلی منجر به پایین آمدن نرخ باروری در مقایسه با جفت‌گیری طبیعی می‌شود (Tummaruk *et al*., 2000).

-ترکیبات بیوشیمیایی سمینال‌پلاسما و عملکردهای آن‌ها

سمینال‌پلاسما از یون‌ها (Na^+، K^+، Zn^+، Ca^{2+}، Mg^+ و Cl^-)، ترکیبات انرژی‌زا (فروکتوز، سوربیتول، گلیسریل فسفوکولین)، ترکیبات آلی (اسید سیتریک، اسیدهای آمینه، پپتیدها، پروتئین‌های با وزن مولکولی کم و زیاد، لیپیدها، هورمون‌ها و سیتوکین‌ها) تشکیل شده است. ترکیبات نیتروژنی مثل آمونیاک، اوره، اسیداوریک و کراتینین و ترکیبات کاهنده مثل اسید آسکوربیک و هیپوتائورین نیز در سمینال‌پلاسمای نشخوارکنندگان وجود دارد (Juyana and Stella, 2012).

عملکرد سمینال‌پلاسما در فیزیولوژی طبیعی با انزال اسپرم و بقای آن در دستگاه تولیدمثلی ماده همراه است. نقش سمینال‌پلاسما در بلوغ اسپرم در گونه‌های مختلف بررسی شده است. مهم‌ترین نقش‌های مختلف سمینال‌پلاسما شامل:

فعال‌سازی و افزایش تحرک اسپرم،بافرینگ جهت بهبود محیط مغذی و اسمزی مطلوب، جلوگیری از

فعال‌شدن قبل از بلوغ در طی انتقال فیزیولوژیکی اسپرم و تثبیت غشای پلاسما با مهارکننده‌های ظرفیت‌پذیری، حفاظت از اسپرم‌ها از فاگوسیتوز در التهاب ، تنظیم انتقال و زدودگی، تخمک‌گذاری سزیع در گاو و القای آن در خوک و شتر،کمک به فعل و انفعالات اسپرم-تخمک، فعال‌سازی بیان سیتوکین‌های جنینی و کمک به آماده‌سازی رحم برای رشدامبریو و تأثیر بر باروری. افزودن سمینال‌پلاسما یا ترکیبات آن به اسپرم پس از یخ‌گشایی جذب اکسیژن و جنبندگی اسپرم را افزایش داده و بعضی از پروتئین‌های سطحی بهبود یمی دهد (Domı´nguez *et al.* 2008)، آسیب سرمایی غشای پلاسمایی اسپرم قوچ را ترمیم داده و تمامی پارامترهای کیفی اسپرم را افزایش می‌دهد (Maxwell *et al.*, 2007).

- پروتئین‌ها

پروتئین‌های سمینال‌پلاسما حاصل ترشح اپیدیدیم و وزیکول‌های سمینال هستند (Chandonnet *et al.*, 1990). افزودن و حذف انواع پروتئین‌های سمینال‌پلاسما در طول بلوغ در اپیدیدیم و زمان انزال نقش مهمی در حفظ پایداری سمینال‌پلاسما، جنبایی، ظرفیت‌پذیری و اثر متقابل تخمک-اسپرم و باروری بازی می‌کند (The´rie´n *et al.*, 1998). همچنین پروتئین‌های سمینال‌پلاسما می‌توانند نفوذ اسپرم به اووسیت را افزایش دهند (El-Hajj Ghaoui *et al.*, 2007). بین مقدار پروتئین کل و توانایی انجماد منی قوچ یک همبستگی مثبت گزارش شده است (Barrios *et al.*, 2000). اسپرم پستانداران جنبایی و توانایی تشخیص و باروری اووسیت‌ها را از طریق فعل و انفعالات توسط پروتئین‌های موجود در مایع اپیدیدیم به دست می‌آورند. پروتئین‌های مختلف اپیدیدم با تغییر سطح غشای اسپرم یا ترکیبات و یا کمک به حفظ یکپارچگی اسپرم، نقش‌های مختلفی را بر عملکرد اسپرم دارند (Juyana and Stella, 2012).

- اسیدهای آمینه و آنزیم‌ها

طیف وسیعی از اسیدهای آمینه در سمینال‌پلاسما بوده و بیشتر این‌ها از بیضه‌یا اپیدیدیم نشأت گرفته‌اند. غلظت آنها بعد از انزال به دلیل فعالیت گسترده‌ی پروتئولیتیک در مایع منی افزایش می‌یابد (Mann and Lutwak-Mann, 1981). اسیدهای آمینه به عنوان یک ماده شیمیایی به راحتی قابل اکسیداسیون برای انرژی هستند و منجر به فعل و انفعالات در منی می‌شوند (Neumark H and Schindler, 1967). گلوتامیک اسید بیشترین غلظت را در سمینال‌پلاسما داشته که با سطح بالای فعالیت گلوتامیک اگزالواستیک ترانسفراز همراه است (Flipse, 1960). L- آرژنین در سمینال‌پلاسمای نشخوارکنندگان به عنوان منبع انرژی برای حرکت نرمال اسپرم‌ها در شکل آرژینین فسفریک اسید فعالیت می‌کند. سایر آنزیم‌های سمینال‌پلاسما شامل آسپارتات آمینوترانسفراز، گلوتامین پیروات ترانس‌آمیناز، آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز هستند. این آنزیم‌ها به عنوان شاخص‌های خوبی از کیفیت مایع منی هستند زیرا پایداری اسپرم را بیان می‌کنند (Sirat *et al.*, 1996 : .Patel *et al.*, 1998).

- آنتی‌اکسیدان‌ها

اسپرم‌ها در برابر پراکسیداسیون لیپیدی توسط گونه‌های آزاد اکسیژن (ROS) مثل هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، سوپراکسید آنیون (O^{2-})، نیتریک اکسید و رادیکال هیدروکسیل (OH-) بسیار حساس هستند. در مایع منی

گاو و قوچ، ROSها به طور عمده توسط اسپرم‌های مرده از طریق واکنش اکسیداز-کاتالاز وآمینواسید آروماتیک تولید می‌شوند (Nateq *et al*., 2020). از لحاظ فیزیولوژیک ROS نقش مهمی در ظرفیت‌پذیری اسپرم ، واکنش آکروزومی و تثبیت میتوکندری کپسول در قطعه‌ی میانی در گاو دارندو اثرات مفید آنها روی عملکرد اسپرم به غلظت ROS خاص درگیر، بستگی دارد (De Lamirande and Gagnon, 1992).

برای حفظ فعالیت‌های فیزیولوژیکی، تعادل بین تولید ROSها و بازیافت آنها در محیط اطراف سلول‌های اسپرم ضروری است. در غیر این‌صورت هرگونه عدم تعادل باعث اختلال در عملکرد اسپرم از طریق استرس اکسیداتیو خواهد شد (Behnam *et al*., 2022). برای محافظت اسپرماتوزوا از استرس اکسیداتیو، اسپرماتوزئیدها و سمینال‌پلاسما دارای آنزیم‌هایی هستند که به نام سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase; SOD)، گلوتاتیون ردوکتاز (Glutathione reductase; GR)، گلوتاتین پراکسیداز (Glutathione peroxidases; GPx) و سوبستراهای آن (Glutathione; GSH و GPx–Se^{-} plus oxidized glutathione; GSSG) و کاتالاز (Catalase; CAT) شناخته می‌شوند (Mann and Lutwak-Mann, 1981). کاتالاز که یک آنزیم اپیدیدیمی است، اسپرماتوزوا را از آسیب اکسیداتیو در لومن اپیدیدیم محافظت می‌کند درحالی‌که SOD و GPx ترشح شده از وزیکول سمینال بعد از انزال از اسپرم حفاظت می‌کند (Zubkova and Robaire, 2004). محل تجمع SOD در آکروزوم، پس‌آکروزم و دم، GPx در پس‌آکروزم و ابتدای سر و GR در دم اسپرم نشان داده شده است. SOD خودبه‌خود O^{2-} را از شکل O_2 و H_2O_2 دیسموتاز می‌کند، درحالی‌که کاتالاز، H_2O_2 را به O_2 و H_2O تبدیل می‌کند (Alvarez *et al*., 1987).

یکی از ویژگی‌های پاک‌کنندگی آنتی‌اکسیدان سمینال‌پلاسما در رابطه با غلظت بالای GSH است. گلوتاتیون یک سوبسترا برای آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز حاوی سلنیوم (آنزیم اصلی در حذف پراکسیدهای هیدروژن) و گلوتاتیون ترانسفراز (آنزیمی که واکنش‌های کووالانتی گلوتاتیون را با مواد الکتروفیلیک کاتالیز می‌کند) است. گلوتاتیون به عنوان دهنده‌ی الکترون عمل می‌کند و می‌تواند از طریق گروه تیولیک با هیدروژن پراکسید، سوپراکسید آنیون و رادیکال‌های هیدروکسیل و گروه سولفیدیریل آن و همچنین با رادیکال‌های آلکوکسیل و هیدروپراکسی‌ها واکنش نشان دهد (Lenzi *et al*., 1996). گلوتاتیون ردوکتاز، GSH را از گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG) احیاء می‌کند. در طول عملکرد آنتی‌اکسیدانی، گلوتاتیون در فروکتولیز اسپرماتوزویید نیز درگیر است. این یک کوآنزیم از ۱و۳- دی فسفو گلیسیریک آلدئید دهیدروژناز است که منجر به اکسیداسیون تریوزفسفات به فسفوگلیسریک اسید می‌شود که به اسیدپیرویک و اسید لاکتیک تبدیل می‌شود که باعث بهبود فعالیت متابولیکی و جنبندگی اسپرماتوزوا می‌شود (Sinha *et al*., 1996).

عوامل ضد پراکسیداسیون در انزال به اسپرم‌ها متصل شده و آنها را از پراکسیداسیون لیپیدی در دستگاه تناسلی ماده محافظت می‌کنند. GPx و SOD به‌طور عمده در پیشگیری از شوک سرمایی دخالت دارند. سطوح آنتی‌اکسیدانی سیستم‌های دفاعی بسته به گونه،

فصل و نوع انزال متفاوت است (Juyana and Stella, 2012).

- یون‌ها

عملکرد اسپرم به شدت وابسته به محیط یونی بوده و سطوح مواد معدنی رژیم غذایی می‌تواند غلظت یونهای سمینال‌پلاسما اثربگذارد. کاتیون‌هایی مثل Na، K، Ca و Mg در ایجاد تعادل اسمزی و اجزای بسیاری از آنزیم‌ها نقش دارند (Cevik *et al.*, 2007).

سدیم کاتیون اصلی در سمینال‌پلاسما به استثنای گاو بوده که در آن غلظت Ca بسیار بالاست (Setchell and Brooks, 1988). پتاسیم یک عنصر طبیعی و مهارکننده است و غلظت بالای K در سمینال‌پلاسما متابولیسم اسپرم را کاهش داده و درنتیجه حرکت اسپرم نیز کاهش می‌یابد (Massa´nyi *et al.*, 2003). کلسیم واکنش آکروزومی را در پستانداران راه انداخته و با جنبندگی اسپرم در ارتباط است (Kaya *et al.*, 2002). منیزیم تقریبا در تمامی سیستم‌های آنزیمی یافت می‌شود و به عنوان یک نشانگر ترشح وزیکول سمینال است و می‌تواند در جنبندگی اسپرم نقش ایفا کند (Jobim *et al.*, 2004). یک همبستگی منفی بین اسپرم‌های غیرطبیعی با غلظت‌های فسفر، کلسیم و سدیم و همچنین یک همبستگی مثبت با غلظت K در منی گاو دیده شده است. مس برای بسیاری از آنزیم‌ها مثل CuZn-SOD لازم است. اخیرا چندین محقق بین محتوای مس و جنبندگی اسپرم در سمینال‌پلاسمای بوفالو همبستگی مثبتی مشاهده کرده اند (Eghbali *et al.*, 2008). عنصر روی یک فعالیت آنتی‌اکسیدانی محافظتی را اعمال می‌کند و عامل اصلی فعالیت ضدباکتریایی سمینال‌پلاسما است. روی نقش مهمی در کنترل حرکت با کنترل مصرف انرژی از طریق سیستم‌های آدنوزین تری فسفات و تنظیم ذخایر انرژی فسفولیپیدی ایفا می‌کند (Hidiroglou and Knipfel, 1984).

توزیع یون‌های عمده بین اسپرم و سمینال‌پلاسما ممکن است مبنایی برای تغییرات در کیفیت منی انزال‌های متوالی مختلف باشد و باید در تفسیر و ارزیابی باروری در نظر گرفته شود. بسیاری از مطالعات انجام شده بر روی خواص یون‌های سمینال پلاسما، در منی انسان انجام گرفته است (Juyana and Stella, 2012).

- قندهای احیاءکننده

فروکتوز اصلی‌ترین ساکارید موجود در سمینال‌پلاسمای نشخوارکنندگان است. غدد ضمیمه‌ی جنسی با نحریک تستوسترون فروکتوز را از گلوکز خون تولید و غلظت آن در طول فصل تولیدمثل افزایش می‌یابد اسپرماتوزوا فروکتوز را برای تولید ATP استفاده می‌کند (Matsuoka *et al.*, 2006). غلظت فروکتوز در سمینال‌پلاسما اغلب به عنوان شاخصی از وضعیت آندروژنی حیوان استفاده می‌شود، زیرا ترشح آن تحت کنترل سطح آندروژن خون است (Mann and Lutwak-Mann, 1981). ثبت غلظت فروکتوز در سمینال‌پلاسمای گونه‌های مختلف می‌تواند در تعیین مقدار ان جهت اضافه کردن به رقیق‌کننده کمک کند (Juyana and Stella, 2012).

یک قند احیاءکننده‌ی دیگر به نام سوربیتول در سمینال‌پلاسمای نشخوارکنندگان وجود دارد. اسپرم قوچ دارای آنزیم سوربیتول دهیدروژناز است که تبدیل سوربیتول به فروکتز را ممکن می‌سازد. ترکیب قند

سمینال‌پلاسما با توجه به تولید انرژی با باروری ارتباط دارد (Garner *et al*., 2001).

- لیپیدها

یکی از ویژگی‌های کلیدی در عملکرد اسپرماتوزوئید، ترکیب چربی در غشای پلاسمایی و سمینال‌پلاسما است. پروفیل‌های لیپیدی شامل کلسترول، فسفولیپیدها، دی‌گلیسریدها، تری‌گلیسریدها و استرهای مومی است. منبع احتمالی لیپید اپیدیدیم و خود اسپرم میباشد. لیپیدهای سمینال به ویژه فسفولیپیدها و کلسترول، ارتباط خاصی در ساختار و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم دارند و ممکن است نقش مهمی در ساختار اسپرم، متابولیسم، ظرفیت‌پذیری اسپرم و باروری گامت‌های ماده داشته باشد (Cross, 1998). انواع مختلف فسفولیپیدهای موجود در سمینال‌پلاسما شامل فسفاتیدیل کولین (کولین پلاسموژن)، فسفاتیدیل اتانولامین، اسفینگومیلین، فسفاتیدیل سرین، فسفاتیدیل اینوزیتول، لایزوفسفاتیدیل اتانولامین، لایزوفسفاتیدیل کولین، دی فسفاتیدیل گلیسرول و فسفاتیدیک اسید می‌باشد که پلاسمینوژن فسفولیپید اصلی سمینال‌پلاسمای نشخوارکنندگان است (Juyana and Stella, 2012).

اگرچه فروکتوز اصلی‌ترین ماده‌ی تولیدکننده‌ی انرژی است، اسپرم‌ها ممکن است از فسفولیپیدها برای تولید انرژی در صورت عدم وجود کربوهیدرات‌ها استفاده کنند (Scott T W and Dawson, 1968). مطالعات روی منی قوچ نشان داد که کاهش غلظت اسپرم و جنبایی با کاهش محتوای لیپید سمینال‌پلاسما همراه است (Taha *et al*., 2000). بررسی‌ها بر روی عملکردهای واقعی لیپیدهای سمینال‌پلاسما در اسپرم نشخوارکنندگان ممکن است فرآیند نگه‌داری سرمایی را بهبود ببخشد زیرا انتقال پروتئین‌ها از طریق غشای اسپرم به وسیله‌ی توزیع لیپیدها در امتداد غشا تنظیم می‌شود (Parks and Graham, 1992).

- هورمون‌ها و سیتوکین‌ها

هورمون‌هایی مانند استروژن‌ها، پروژسترون، تستوسترون، هورمون لوتئینه‌کننده (LH)، پرولاکتین و پروستاگلندین‌ها در سمینال‌پلاسمای نشخوارکنندگان وجود دارد. عملکرد خاص این هورمون‌ها در سمینال‌پلاسما ناشناخته است (Juyana and Stella, 2012). هورمون‌های استروئیدی و پروستاگلندین نتیجه‌ی فعالیت سلول‌های لایدیگ، اپیدیدیم، وزیکول سمینال و پروستات وهمچنین خود اسپرم‌ها هستند زیرا سلول اسپرم هم حاوی آروماتاز و هم سیکلواکسیژناز است (Hess *et al*., 2001). پروفیل هورمونی سمینال‌پلاسما در گونه‌های مختلف متفاوت است. سمینال‌پلاسمای قوچ حاوی مقادیر پایین غلظت‌های استروژن و تستوسترون در مقایسه با سمینال‌پلاسمای گاو نر است. مایع منی قوچ مقدار مناسبی پروستاگلندین دارد که برای تحریک فعالیت انقباضی سرویکس و رحم و بهبود انتقال اسپرم در میش بوده و سطح پروستاگلاندین وابسته به فصل است (Shore *et al*., 2003).

-روش‌های نگه‌داری اسپرم

-نگهداری اسپرم به شکل مایع (نگه‌داری سرمایی)

در این روش ابتدا منی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با رقیق‌کننده مخلوط می‌شود و حدود ۳۰ دقیقه در این دما نگه می‌شود تا اثر آنتی‌بیوتیکی رقیق کننده اعمال شود و سپس به تدریج تا ۵ درجه

سلسیوس خنک می‌گردد. رقیق‌کننده‌ای که برای رقیق‌کردن منی می‌توان استفاده نمود شامل زرده تخم مرغ، گلوکز، سیترات یا شیر گاو (چربی گرفته یا نگرفته) و شیر با قابلیت نگه‌داری مدت طولانی می‌باشد. این رقیق‌کننده‌ها اسپرماتوزوییدها را تا حد امکان در مقابل شوک سرمایی، در مدت سردکردن محافظت می‌نمایند. برای کنترل رشد میکروبی، باید ۱۰۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین و ۱ میلی‌گرم استرپتومایسین به هر میلی‌لیتر رقیق‌کننده اضافه گردد (Soultanpour *et al*., 2014). منی جمع‌آوری‌شده بدون افزودن زرده تخم‌مرغ را می‌توان در داخل ظرف آب در یخچال بدون نیاز به رقیق‌کننده به مدت۲۴ الی ۴۸ ساعت نگه‌داری کرد (Nateq *et al*., 2020).

-نگه‌داری اسپرم به شکل منجمد (نگه‌داری انجمادی)

ذخیره‌ی اسپرم راه مفیدی جهت نگه‌داری منابع ژنتیکی برای برخی از گونه‌های در خطر است. اولین کوشش جهت نگه‌داری سرمایی اسپرم پستانداران در چند دهه‌ی قبل صورت گرفته است. وقتی که منی منجمدشده و در دمای خیلی پایین، یعنی در ازت مایع در ۱۹۶- درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شود، واکنش‌های متابولیکی اسپرماتوزوا متوقف می‌شود. این کار امکان نگه‌داری منی برای مدت طولانی و در نتیجه ذخیره‌ی ژن‌ها برای استفادهٔ آینده و استفاده از نرهای منحصربفرد را مهیا می‌نماید. همچنین حمل و نقل داخلی و بین‌المللی منی آسان شده و می‌توان آن را خارج از دوره‌ی تولیدمثل، جمع‌آوری و ذخیره نمود (Behnam *et al*., 2022).

-اثرات مخرب سردسازی و انجماد اسپرم

فرآیند انجماد به دلیل ایجاد تنش‌های اسمزی و اکسیداتیوی، اثرات مضری بر DNA، میتوکندری، ساختار غشای پلاسمایی و عملکرد اسپرم پستانداران، کاهش در جنبندگی و زنده‌مانی اسپرم، تغییرات در مورفولوژی اسپرم (در غشای پلاسمایی و تغییرات آکروزومی) و افزایش رادیکال‌های آزاد دارد (Shafaati Alishah *et al*., 2020). نخستین آسیب‌های ناشی از سرما یا انجماد اسپرم، در غشای آن بروز می‌کند. استرس‌های حرارتی در طی سردسای بر غشا وارد می‌شود. در نتیجه‌ی این امر، تغییراتی در توزیع فسفولیپیدهای سرتاسر هر دو لایه‌ی غشا ایجاد شده و علاوه بر این ممکن است باعث جداشدن ساختمان غشایی شود (Shafaati Alishah *et al*., 2020).

انجماد اسپرم حتی با تکنیک‌های روز نیز روی عملکرد و باروری اسپرم اثر مخرب دارد به طور کلی قابلیت زیست اسپرم ۵۰ درصد کاهش می‌یابد در حالی که ظرفیت باروری ممکن است تا هفت برابر تحت تاثیر قرار بگیرد. اندامک‌های مختلف اسپرم تحت تاثیر اثرات مخرب انجماد قرار می‌گیرند. القای واکنش زودرس آکروزومی، تغییر عملکرد میتوکندری، کاهش تحرک و اختلال در تراکم کروماتین که همگی باروری و قابلیت زیست اسپرم را تحت تاثیر قرار می دهند (Alvarez *et al*., 1987) . جهت مقابله با این مشکلات در حین انجماد و یا بعد از پروسهٔ یخ‌گشایی، استفاده از رقیق‌کننده‌ها و محافظت‌کننده‌های مناسب بسیار ارزشمند و مهم می‌باشد (Shafaati Alishah *et al*., 2020).

-انواع افزودنی‌ها به مایع منی برای نگه‌داری اسپرم مایع (نگه‌داری در یخچال در دمای ۵ درجه‌ی سلسیوس) و

انجماد (نگه‌داری در ازت مایع در دمای ۱۹۶- درجه‌ی سلسیوس)

ذخیره‌سازی موفق اسپرم (به صورت مایع و منجمد) نیاز به کاهش متابولیسم سلولی دارد تا طول عمر سلول افزایش یابد. برای رسیدن به این هدف و بهبود کیفیت اسپرم، استفاده از یک رقیق‌کننده‌ی مناسب ضروری می‌باشد. برای حفظ حرکت و ظرفیت باروری و یکپارچگی غشای اسپرم ترکیبات گوناگونی به رقیق‌کننده افزوده می‌شود (Allai *et al.*, 2018).

رقیق‌کنندهٔ اسپرم از اجزایی تشکیل شده است که از اسپرم در برابر عوامل مخرب محیطی در خارج از دستگاه تولیدمثل جلوگیری می‌کند. اسپرم در منی رقیق‌نشده، برای مدت کوتاهی زنده می‌ماند و سرد کردن آهسته منی تا دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سبب مرگ بسیاری از اسپرم ها می‌شود. بنابراین، مایع رقیق‌کننده، افزون بر این که باید برای رقیق‌کردن مناسب باشد، لازم است که اسپرم‌ها را در خلال سردشدن حفظ کند و دوره‌ی زنده‌مانی آنها را افزایش دهد. رقیق‌کننده باید خاصیت بافری داشته باشد تا بتواند لاکتیک اسید ناشی از متابولیسم سلولی را خنثی کند و pH را ثابت نگه دارد. همچنین رقیق‌کننده باید از اسپرم در برابر شوک سرمایی محافظت کند و از رشد و تکثیر باکتری‌ها جلوگیری کند و مواد غذایی لازم برای فعالیت سلول را مهیا کند (Rigby *et al.*, 2001). محققین استرالیایی پس از مقایسه‌ی تعدادی از رقیق‌کننده‌های اسپرم قوچ، استفاده از بافر تریس، فروکتوز و زرده تخم مرغ را برای نگه‌داری در شرایط مایع و اضافه‌کردن ۵ درصد گلیسرول به بافر تریس را برای نگه‌داری در شرایط انجماد، پیشنهاد نمودند (Salamon and Maxwell, 2000).

- افزودنی‌ها به عنوان محافظت‌کننده در برابر سرما و انجماد

یکی از علل اصلی تخریب و مرگ سلولی در طی انجماد، تشکیل یخ داخل و خارج سلولی می‌باشد. عمل اولیه‌ی حفاظت‌کننده‌ها کاهش سرعت تشکیل یخ و اندازه‌ی کریستال یخ می‌باشد. با مقدار کافی حفاظت-کننده، تخریب انجمادی می‌تواند حداقل شود. در حالی‌که غلظت بالای آن می‌تواند موجب تخریب و مسمومیت اسمزی شود (Shafaati Alishah *et al.*, 2020).

زرده تخم‌مرغ یکی از اجزای اساسی رقیق‌کننده منی است که به عنوان یک محافظت‌کننده سرمایی عمل می‌کند و از آسیب غشا جلوگیری می‌کند (Anand *et al.*, 2017). همچنین مقادیر پروتئین، فسفولیپیدها و کلسترول را تنظیم کرده و متعاقباً از غشای پلاسمایی در برابر آسیب ناشی از دما محافظت می‌کند (Ferreira *et al.*, 2014). اگرچه افزودن زرده تخم‌مرغ ترکیبات یونی رقیق‌کننده را تغییر می‌دهد، با این وجود به دلیل محافظت عالی از اسپرم توصیه می‌شود. همچنین، تأثیرات مفیدی بر روی زنده‌ماندن اسپرم به عنوان محافظ غشای پلاسمایی و آکروزوم در برابر شوک سرما دارد (Celeghini *et al.*,2008). فسفولیپیدها، کلسترول و لیپوپروتئین‌هایی با چگالی کم زرده تخم‌مرغ به طور خاص به عنوان اجزای محافظ شناخته شده‌اند. عمل محافظتی زرده تخم‌مرغ ممکن است به فسفولیپیدها، کلسترول و لیپوپروتئین‌هایی با چگالی بالا (HDL) و محتوای لیپوپروتئین‌هایی با چگالی کم (LDL) نسبت

داده شود که باعث حفظ موثر اسپرم در برابر شوک سرما و همچنین در فرآیند انجماد – ذوب می‌شود (Anand *et al.*, 2017). از این نظر، وجود زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس (هیدروکسی متیل‌آمینو متان) در هنگام انجماد به علت محافظت، آسیب کمتری به اسپرم وارد می‌شود (Khumran *et al.*, 2017). زرده تخم‌مرغ حاوی برخی آنتی‌اکسیدان‌های مؤثر مانند فسوویتین و آلفا توکوفرول است که سبب کاهش اکسیداسیون واکنش زنجیره‌ای و پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم می‌شود (Alcay *et al.*, 2015).

بسیاری از ترکیبات برای بررسی اثربخشی به عنوان محافظت‌کننده‌ی سرمایی اسپرم، مورد آزمایش قرار گرفتند ولی بسیاری از پروتکل‌های محافظتی منی هنوز استفاده از گلیسرول را در رقیق‌کننده، مناسب‌تر می‌دانند. در برخی موارد، احتمالا سایر محافظت‌کننده‌ها مثل دی‌متیل سولفوکساید برای اسپرم فیل ترجیح داده شده است (Jones, 1973).

گلیسرول به همراه موادی مانند متانول، اتیلن گلیکول، ۱و۲- پروپان دی اول (پروپیلن گلیکول)، بوتان دی‌اول، استامید و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) جزء گروهی هستند که به سیتوپلاسم سلول نفوذ می‌کند (Holt, 2000). همرستد و همکاران در سال ۱۹۹۲ اشاره کردند که از آنجا که گلیسرول به داخل سلول می‌رود، احتمالاً ویسکوزیته‌ی سیتوپلاسمی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. شواهد نشان می‌دهد که ویسکوزیته‌ی سیتوپلاسمی در بین گونه‌ها متفاوت است. گلیسرول می‌تواند اثرات خاصی بر اسپرم گونه‌ها بگذارد، البته این استدلال را می‌توان به سایر محافظت‌کننده‌های نفوذکننده مثل DMSO، اتیلن گلیکول و متانول نیز اعمال کرد. همچنین به طور تجربی نشان داده شده است که گلیسرول قادر به واردشدن بین دو لایه‌ی غشایی است (Hammerstedt *et al.*, 1992). همرستد و همکاران در سال ۱۹۹۰ در مورد توان گلیسرول به عنوان سوبسترا بیان کرده‌اند که می‌تواند وضعیت بیوانرژتیک اسپرم را تغییر دهد. شاید گلیسرول تعادل بین سنتز ATP و مصرف آن را تغییر می‌دهد. در صورت کمبود ATP در طول سردسازی ممکن است که کنترل متابولیسمی در فرآیندهای سلولی وابسته به یون به خطر بیفتد و سبب غیرفعال‌شدن فسفولیپازها و پروتئازها و آسیب غیرقابل برگشت سلولی شود (Hammerstedt *et al.*, 1990).

-آنتی‌بیوتیک‌ها

رقیق‌کنندهٔ استفاده‌شده برای ذخیره‌سازی اسپرم حاوی مقادیر زیادی از مواد مغذی لازم برای ادامه‌ی فعالیت اسپرم و زنده‌مانی آن در محیط آزمایشگاهی است اما این مواد مغذی به باکتری‌ها هم اجازه‌ی رشد می‌دهند. برای جلوگیری از آلودگی میکروبی، باید تمام وسایلی که در کار اسپرم‌گیری و رقیق‌سازی استفاده می‌شوند کاملاً استریل باشند. ولی نمی‌توان جلوی برخی آلودگی‌های میکروبی را گرفت چون میکرب می‌تواند از طریق خود اسپرم و انزال نیز وارد رقیق‌کننده شده و باعث کاهش راندمان فرآیند انجماد از طریق تولید رادیکال‌های آزاد شود و در نتیجه میزان زنده‌مانی و باروری کاهش یابد. در قوچ‌ها، منی معمولاً با واژن مصنوعی جمع‌آوری می‌شود که ممکن است به باکتری‌های سطح آلت تناسلی آلوده شود. در نتیجه، باکتری‌ها ممکن است کیفیت مایع منی را در حین ذخیره‌سازی به خطر بیندازند و دستگاه تولیدمثل میش

را آلوده کنند. برای کم کردن این عوارض جانبی، آنتی-بیوتیک‌ها در رقیق‌کننده‌های منی اضافه می‌کنند تا از رشد باکتری جلوگیری شود (Salamon and Maxwell, 2000)، که برای نزدیک به ۴۰ سال پنی‌سیلین (۱۰۰۰ واحد بین‌المللی) و استرپتومایسین (۱ میلی‌گرم) در رقیق‌کننده استفاده می‌شوند. پس از آن از پلی‌میکسین B استفاده گردید و امروزه از جنتامایسین، تایلوزین، لینکومایسین و اسپکتینومایسین (۶۰۰۰ میکروگرم) نیز در رقیق‌کننده استفاده می‌شود (Nateq *et al*., 2020).

-افزودنی‌ها به عنوان گیرندهٔ آب

انواع افزودنی‌ها که به عنوان گیرنده‌ی آب با حفظ تعادل اسمزی باعث حفاظت اسپرم‌ها در طی فرآیند سردسازی و انجماد می‌شوند شامل، گلوکز، فروکتوز، رافینوز و ترهالوز می‌باشند. عملکردهایی که قندها در رقیق‌کننده منی ممکن است بر عهده داشته باشند عبارتند از: تأمین سوبسترایی که به آسانی قابل متابولیز باشد، کمک به متابولیسم فروکتوز، نگه‌داری تعادل اسمزی، اثر بر روی ساختار اسپرم و کاهش صدمات اسپرم در دمای پایین (Lapwood and Martin, 1966).

-گلوکز

ورستیجن و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که کاهش گلوکز موجب کاهش درصد اسپرم متحرک و افزایش اسپرم‌های استاتیک در سگ می‌شود (Verstegen *et al*., 2005).

- فروکتوز

فروکتوز قندی بوده که به راحتی به انرژی تبدیل می‌شود. اضافه کردن فروکتوز می‌تواند یک منبع انرژی اصلی برای اسپرم باشد. استفاده از قندهایی مثل فروکتوز، سوکروز، گلوکز، ترهالوز و رافینوز در رقیق‌کننده منی می‌تواند تحرک اسپرم را افزایش دهد. قند در رقیق‌کننده منی می‌تواند به عنوان نگه‌دارنده فشار اسمزی، منبع انرژی و حفاظت‌کننده استفاده شود (Rasad and Simanjuntak, 2011).

- رافینوز

رافینوز برای جلوگیری از تشکیل یخ خارج سلولی، فراهم کردن هایپرتونیسیته و افزایش تشکیل حالت میکروکریستال استفاده می‌شود. رافینوز تری-ساکاریدی شبیه دیگر قندهاست که از طریق واکنش با غشای لیپیدی و پروتئین‌ها خطر تشکیل کریستال یخ را کاهش داده که موجب دهیدراسیون اسمزی در طول حفاظت انجمادی می‌شود و همچنین موجب حفاظت DNA در برابر آسیب‌های انجمادی می‌شود (Bucak *et al*., 2013). ساری‌اوزکان و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که استفاده از قندها اثر مفیدی روی نگه‌داری تحرک، مورفولوژی سالم و یکپارچگی DNA اسپرم موش صحرایی در برابر آسیب خنک‌سازی می-گذارد و رافینوز اثر محافظتی قوی‌تری نسبت به ترهالوز و فروکتوز در حفظ تحرک اسپرم دارد (Dovlati *et al*., 2015).

- ترهالوز

ترهالوز در ثبات غشاء و دیگر مجموعه‌های ماکرومولکولی تحت شرایط حاد زیست محیطی نقش کلیدی دارد (Dovlati *et al*., 2016).

ترهالوز دی‌ساکاریدی شناخته‌شده برای تثبیت پروتئین‌ها و غشای بیولوژیکی در طی فرایندهایی مثل انجماد می‌باشد. نمونه‌هایی از توانایی ترهالوز شامل حفظ ساختار زیستی سلول‌های قرمز خون لیوفیلیزشده، انجماد پوست جنین، اووسیت انسان، سلول‌های

هماتوپویتیک، جنین موش و اندام‌های برنامه‌ریزی‌شده برای پیوند می‌باشد. تره‌هالوز توسط موجودات مختلف در پاسخ به شرایط استرس مانند دهیدراسیون تولید می‌شود (Pérez *et al*., 2009) و از این طریق با انجام نقش حفاظت‌کنندگی در برابر اثرات اسمزی و اشکال خاص واکنش با فسفولیپیدهای غشا، ایجاد محیط هایپرتونیک، باعث جلوگیری از دهیدراسیون اسمزی سلول قبل از انجماد شده و از این رو آسیب سلول را توسط کریستال یخ کاهش می‌دهد و در بسیاری از گونه‌های غیرآبزی در غلظت بالا یافت می‌شود (Motta *et al*., 2014). این ترکیب نسبت به دیگر قندها حفاظت بهتری را در برابر خشکی ایجاد می‌کند، زیرا توانایی بالایی برای جایگزینی آب و کریستالەشدن دارد (Watanabe *et al*., 2003). شواهد نشان می‌دهد که تره‌هالوز با کاهش دمای فاز انتقال لیپید خشک اسپرم‌ها را در فاز کریستال مایع در عدم حضور آب محافظت می‌کند. همچنین از پروتئین‌های حساس در حین خشک شدن محافظت می‌کند و احتمالاً به طور مستقیم با پروتئین خشک از طریق اتصال هیدروژن بین گروه هیدروکسیل و باقیمانده‌های قطبی واکنش می‌دهد (Elbein *et al*., 2003). سه مکانیسم برای تره‌هالوز در رابطه با عمل پایداری غشا ذکر شده است: ۱- واکنش با فسفولیپید و افزایش سطح این مولکول‌ها در یک لایه‌ی فسفولیپید ۲- افزایش سیالیت غشاء و ۳- کاهش شرکت در فاز انتقال ژل به مایع در محلول‌های حجیم (Rudolph *et al*., 1986).

-افزودنی‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان

استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو زمانی اتفاق می‌افتد که مقدار اکسیدان‌ها (گونه‌های فعال اکسیژن و گونه‌های نیتروژن فعال یا RNS) افزایش یافته و آنتی‌اکسیدان ها کاهش یابند. زمانی که نمونه‌های اسپرم به مدت معینی در دمای پایین نگه‌داری می‌شوند، ROSها افزایش یافته و آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش می‌یابند. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در رقیق‌کننده می‌تواند تا حدود زیادی از این امر جلوگیری کند. به طور گسترده اثر مکمل آنتی‌اکسیدانی خوراکی روی گامت‌های نر و ماده در انسان مورد بحث شده است. ، همچنین آنتی‌اکسیدان به محیط های مورد استفاده در فن آوری های کمک باروری، عمدتا در رقیق‌کننده‌ها برای نگه‌داری منی استفاده می‌شود. در این زمینه، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در فرآیند انجماد-یخ‌گشایی به طور گسترده عمیقاً مورد بحث قرار گرفته است (Pezo *et al*., 2021).

در طی نگه‌داری در دمای یخچال، معمولاً از ۴ تا ۱۷ درجه‌ی سلسیوس، اسپرم ها دستخوش تغییراتی می‌شوند که می‌تواند توانایی لقاح آنها را به خطر بیندازد و متابولیسم اسپرم را کاهش داده اما آن را به طور کامل متوقف نمی‌کند (Maxwell and Stojanov, 1996). در دمای ۵ درجه‌ی سلسیوس، پمپ Na+/K+ به اندازه کافی کار نمی‌کند و غلظت Na+ درون سلولی را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، در طول نگه‌داری سرمایی، جریان کلسترول افزایش می‌یابد و ممکن است ظرفیت‌پذیری زودرس یا اگزوسیتوز آکروزوم رخ دهد (Peruma *et al*., 2013).

- آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی حاضر در اسپرم یا سمینال‌پلاسما شامل SOD، GPx و CAT هستند. آنتی-اکسیدان SOD مهم‌ترین آنزیم آنتی‌اکسیدانی در سمینال‌پلاسما است و سلول را در برابر O^{2-} از طریق

کاتالیز تغییر شکل آنیون H_2O_2 محافظت می‌کند. علاوه بر آن، این عمل از واکنش ^{-}OH، که بسیار واکنش‌پذیر است، با O^{2-} که منجر به تولید H_2O_2 می‌شود، جلوگیری می‌کند. افزودن SOD به رقیق‌کننده در حضور یا عدم حضور دیگر آنتی‌اکسیدان‌ها موجب بهبود جنبایی و زنده‌مانی اسپرم‌ها در مقایسه با گروه شاهد گونه‌های مختلف شده است ولی در سگ و گوسفند این اثرات همیشه مشاهده نگردیده است (Miguel *et al.*, 2021). آنتی‌اکسیدان CAT با کاتالیز H_2O_2 به آب از سلول محافظت می‌کند. نشان داده شده است که افزودن CAT به همراه SOD به رقیق‌کننده‌های اسپرم حیوانات اهلی تأثیر به‌سزایی در افزایش میزان جنبایی خواهد داشت ولی اثر آن روی اسب اثبات نشده است (Ball *et al.*, 2001).

آنزیم GPx اثرات آنتی‌اکسیدانی خود را با استفاده از شکل کاهش‌یافته‌ی گلوتاتیون (GSH) به عنوان دهنده الکترون برای کاهش H_2O_2 به آب اعمال می‌کند. به سبب این واکنش، GSH به گلوتاتیون دی‌سولفید (GSSG) اکسید می‌شود، بنابراین در نهایت یکی دیگر از اعضای خانواده آنزیم‌های GSH، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) مسئولیت بازسازی GSH را با انتقال یک پروتون از NADPH به GSSG انجام می‌دهد (Agarwal and Aponte-Mellado, 2012). علی‌رغم اهمیت آن در کاهش H_2O_2، در ۲۵ سال گذشته مطالعات اندکی با استفاده از GPx به تنهایی در نگه‌داری سرمایی اسپرم استفاده شده است و تنها در چند مطالعه از آن در ترکیب با سایر آنتی‌اکسیدان‌ها در سگ‌ها و اسب‌ها و گوسفند استفاده شده است (Del Prete *et al.*, 2019). مطالعات دیگری در مورد تأثیر GPx بر پارامترهای کیفیت اسپرم پس از انجماد/یخ‌گشایی گزارش شده است، اما نتایج آن قطعی نیست (Mousavi *et al.*, 2019).

- آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی

- اسیدهای آمینه و پپتیدهای کوچک

اثرات آنتی‌اکسیدانی بسیاری از اسیدهای آمینه و پپتیدهای کوچک مثل گلوتاتیون (GSH)، سیستئین، هیپوتائورین، تائورین، کارنیتین، گلوتامین، پرولین یا متیونین در بسیاری از مطالعات مربوط به نگه‌داری سرمایی در فاز مایع گزارش شده است. تیول‌ها (SH-) مثل سیستئین، به همراه گلوتامات و گلایسین یکی از اجزای GSH که گروه SH- را به این پپتید کوچک می‌رساند. در میان همه این‌ها، GSH گسترده‌ترین آنتی-اکسیدان مورد مطالعه در مایع منی سردسازی‌شده، عمدتاً در خوک، گوسفند و گاو است (Miguel *et al.*, 2021). GSH یک ترکیب با وزن مولکولی پایین است که از اسید آمینه‌های سیستئین، گلوتامات و گلایسین تشکیل شده است. این پپتید کوچک عمل آنتی‌اکسیدانی خود را به دو صورت انجام می‌دهد:

۱. خنثی‌کننده مستقیم ROS، عمدتاً به دلیل وجود SH- ناشی از باقی‌مانده سیستئین

۲. حفظ سایر آنتی‌اکسیدان‌ها مانند ویتامین C یا E در فرم فعال آنها

علاوه بر این، GSH با ترمیم پروتئین‌های آسیب‌دیده، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدهای پراکسید شده و حفظ حالت کاهشی گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها، از سلول‌ها محافظت می‌کند (Miro´nczuk *et al.*, 2018). به ویژه در قوچ‌ها، اکثر مطالعات هیچ اثر مثبتی از رقیق‌کننده حاوی GSH پیدا نکردند. این امکان وجود

دارد که در مورد GSH، غلظت ممکن است تعیین‌کننده باشد و ممکن است بسته به گونه متغیر باشد. در گاو و خوک، به نظر می‌رسد غلظت بهینه بین ۰/۵ تا ۱/۵ میلی‌مولار متغیر باشد (Zhang *et al*., 2016) ، اما در گوسفند، غلظت‌های مورد مطالعه بسیار بیشتر از سایر گونه‌ها بود (Shi *et al*., 2020).

آمینواسید دیگری که مرتبط با GSH است سیستئین می‌باشد. سطوح بالای این اسید آمینه برای اطمینان از سطوح کافی GSH ضروری است، زیرا تحت شرایط استرس اکسیداتیو/نیتروزاتیو دسترسی بیشتر به سیستئین ممکن است نیاز باشد. زمانی‌که سیستئین اکسید می‌شود در یک واکنش برگشت‌پذیر به سیستین تبدیل می‌شود. سیستین، GSH را افزایش داده و به دنبال آن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را هم در اسپرم تازه و هم انجماد-یخ‌گشایی‌شده افزایش می‌یابد (Miguel *et al*., 2021).

تائورین یک سولفونیل اسید آمینه از سیستئین است و هیپوتائورین واسط آن به عنوان آنتی‌اکسیدان در رقیق‌کننده‌های اسپرم استفاده می‌شود. به طور کلی تائورین از کاهش میزان جنبندگی و تحرک اسپرم، زنده‌مانی و یکپارچگی آکروزوم در طول نگه‌داری سرمایی در گونه‌های مختلف جلوگیری می‌کند. با این حال اثرات مفیدی در قوچ گزارش نشده است (Li *et al*., 2017).

کارنیتین یک ترکیب قطبی است که به شدت در بدن پراکنده شده و به ویژه در بافت‌های نیازمند انرژی بالا مانند اپیدیدیم متمرکز می‌شود (Heidari *et al*., 2022). از آنجایی که این ترکیب نقش مهمی در انتقال اسیدهای چرب به داخل میتوکندری اسپرم دارد، نقش کلیدی در تحرک اسپرم ایفا می‌کند که مقادیر زیادی انرژی از طریق بتا اکسیداسیون فراهم می‌کند. در واقع افزایش تحرک اسپرم در مایع اپیدیدیم با غلظت کارنیتین مرتبط است. با این حال، کارنیتین یک آنتی-اکسیدان موثر است، که: ۱- با اجازه دادن به اسیدهای چرب برای عبور از غشاهای میتوکندری، دسترسی لیپیدها را برای پراکسیداسیون کاهش می‌دهد، ۲- محافظت از سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیم های آنتی-اکسیدانی CAT، SOD و GPx و جلوگیری از آسیب پراکسیداتیو و ۳- دارای عمل مهار مستقیم رادیکال‌های آزاد مانند O^{2-} یا H_2O_2 است (Gülçin, 2006).

همچنین سایر اسیدهای آمینه مانند گلوتامین و پرولین به طور کلی اثرات شامل افزایش تحرک اسپرم، زنده ماندن و کاهش ROS در طول نگه‌داری سرمایی در مقایسه با گروه های شاهد نشان دادند. در این راستا، گلوتامین یک پیش‌ساز اسید آمینه GSH است و پرولین بر اساس ساختار آمین ثانویه خود دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است. متیونین آمینواسیدی است که قادر است با عمل به عنوان یک اسیدآمینه پیش‌ساز برای سیستئین و همچنین به دلیل ظرفیت آن در واکنش با اکسیدان‌ها برای تشکیل متیونین سولفوکسید از سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت کند (Levine *et al*., 1999).

- ویتامین‌ها، کاروتنوئیدها و پلی‌فنل‌ها

ویتامین Eو C، پلی‌فنل‌ها و کاروتنوئیدها به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شناخته می‌شوند که جهت محافظت از تخریب اسپرم در طی نگهداری سرمایی و انجماد استفاده می‌شوند (Safa *et al*., 2016). ویتامین E به مجموعه‌ای از توکوفرول‌ها (α، β، γ، δ) و

توکوترینول‌ها (α، β، γ، δ) اشاره دارد. در میان آنها، آلفا توکوفرول قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان محلول در چربی است و می‌تواند زنجیره واکنش لیپوپراکسیداسیون را با اهدای یک الکترون به یک رادیکال لیپیدی یا هیدروپراکسید لیپیدی مسدود کند و خود را به رادیکال توکوفروکسیل نسبتاً پایدار تبدیل کند. توکوفروکسیل را می‌توان با واکنش با سایر آنتی‌اکسیدان‌ها مانند ویتامین C یا GSH به شکل فعال توکوفرول تبدیل کرد (Amorini *et al*., 2021). ترولوکس یک آنالوگ صناعی محلول در آب ویتامین E می‌باشد. تأثیر ویتامین E چه به شکل آلفا توکوفرول و چه به شکل ترولوکس در بسیاری از مطالعات نگه‌داری سرمایی در اکثر گونه-های حیوانات اهلی (اسب، قوچ، بز و خوک) به اثبات رسیده است (Nateq *et al*., 2020).

ویتامین C به عنوان یک کاهنده عمل کرده و می-تواند یک یا دو الکترون اهداء کند و خود را به ترتیب به رادیکال آسکوربیل یا دهیدروآسکوربیک اسید (DHA) اکسید کند. سپس DHA را می‌توان با اکسیداسیون GSH به GSSG به شکل احیاء تبدیل کرد. عمل آنتی‌اکسیدانی ویتامین C شامل یک عمل مهار مستقیم طیف گسترده‌ای از RONS (reactive oxygen and nitrogen species) از جمله رادیکال‌های هیدروکسیل، سوپراکسید و پراکسی‌نیتریت و یک اثر مهار غیر مستقیم رادیکال‌های چربی دوست با کاهش رادیکال توکوفروکسیل به شکل فعال آن توکوفرول است. نشان داده شده است که ویتامین C در فاز نگه‌داری سرمایی تأثیر معنی‌داری روی پارامترهای اسپرم نداشت (Michael *et al*., 2009) و بایستی توجه کرد که غلظت‌های بالا سمی هستند (Aurich *et al*., 1997). افزودن ویتامین B12 به رقیق‌کننده اسپرم قوچ توانست درصد جنبایی و زنده مانی را نسبت به گروه شاهد افزایش و درصد اسپرم های غیر طبیعی را کاهش دهد (Asadpour *et al*,. 2012).

پلی‌فنل‌ها مثل رسوراتول، کوئرستین، پروسیانیدین، هیدروکسی‌تروزول و ۳و۴ هیدروکسی‌فنیل گلیکول به عنوان آنتی‌اکسیدان در نگه‌داری سرمایی و انجماد اسپرم استفاده می‌شوند. پلی‌فنل‌ها متابولیت‌های ثانویه مشتق‌شده از گیاهان هستند که با واحدهای فنلی متعدد مشخص می‌شوند. این ترکیبات از نظر ساختاری بسیار متنوع هستند و شامل چهار کلاس اصلی هستند: اسیدهای فنولیک، فلاوونوئیدها (مانند کوئرستین)، استیلبن‌ها (مانند رسوراترول) و لیگنان‌ها. به دلیل ساختار شیمیایی آنها، این ترکیبات آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند که تمایل به اکسیداسیون دارندو رادیکال‌های آزاد را رهگیری کرده و از آسیب اکسیداتیو سلولی جلوگیری می کنند. برخی از پلی‌فنل‌ها دارای یک اثر آنتی‌اکسیدانی آنزیمی هستند زیرا می‌توانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تنظیم کنند (Amidi *et al*., 2016).

- سایر مواد آنتی‌اکسیدانی

ملاتونین علاوه بر نقشی که در تنظیم چرخه شبانه‌روزی یا تولیدمثل فصلی در پستانداران دارد، عملکرد آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی نیز دارد. گیرنده‌های ملاتونین در اسپرم انسان، همستر و قوچ وجود دارد، اما در اسپرم اسب نر یافت نشده است (Balao *et al*., 2011; Chainy and Sahoo, 2020).ملاتونین هم اثر آنتی‌اکسیدانی مستقیم در از بین بردن برخی از گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن (reactive oxygen and

nitrogen species; RONS) مانند OH–، O^{2-}، $ONOO^-$ و NO– و هم اثر آنتی‌اکسیدانی غیرمستقیم با تحریک فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های درونی مانند CAT، SOD یا GPxنشان داده است (Chainy and Sahoo, 2020). ملاتونین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در رقیق‌کننده‌های اسپرم گاو، گوسفند، خرگوش و اسب مورد استفاده شده و افزایش قابل توجهی در تحرک اسپرم، زنده‌مانی و کاهش لیپیدپراکسیداسیون نسبت به گروه‌های شاهد گردیده است (Jang *et al*., 2010).

لیکوپن (کاروتنوئید قرمزرنگ) گوجه‌فرنگی، هویج و گریپ‌فروت به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی با اثربخشی دو برابر کاروتن و ۱۰ برابر توکوفرول می باشد(Rao *et al*., 2006). لیکوپن می‌تواند $ONOO^-$، دی اکسید نیتروژن و همچنین رادیکال‌های تیول و سولفونیل را از بین ببرد (Muzandu *et al*., 2006). اخیراً شیخ‌الاسلامی و همکاران مشاهده کردند که افزودن لیکوپن به رقیق‌کننده باعث افزایش تحرک و زنده مانی و کاهش لیپید پراکسیداسیون اسپرم سگ شد (Sheikholeslami *et al*., 2020).

سلنیوم کوفاکتور یا فعال‌کننده‌ی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز است که یکی از قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد و تجزیه‌ی پراکسیدازهای لیپیدی و هیدروژن پراکسید را کاتالیز می‌کند. آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز رادیکال‌های آزاد درون سیتوپلاسم را نابود می‌کند (Ozbal *et al*., 2008). به طور معمول، غلظت اکثر عناصر در کبد بالاتر از سایر اندام ها است اما در مورد سلنیوم، بیشترین غلظت آن در بیضه ها است. غلظت بالای سلنیوم در بیضه‌ها نشان دهنده‌ی نقش حفاظتی این عنصر و آنزیم‌های مرتبط با آن در اسپرماتوژنز می‌باشد. کمبود سلنیوم در حیوانات مزرعه ای باعث تغییر و شکنندگی بخش میانی اسپرم، میتوکندری‌های بخش میانی و پیچیدگی دم اسپرم می‌شود (Nateq *et al*., 2020). در مطالعه‌ای که بر روی خوکچه‌ها انجام شده است، مشخص شده است که کمبود طولانی مدت سلنیوم در جیره‌ی غذایی خوکچه‌های هندی، باعث کاهش غلظت و تحرک اسپرم و بروز قطرات سیتوپلاسمی در اسپرم می‌شود (Agarwal and Sekhon, 2010). بین فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز سمینال پلاسما و تراکم اسپرم ارتباط مثبت و معنی‌داری وجود دارد و با افزایش فعالیت این آنزیم درصد اسپرماتوزوئیدهای با مورفولوژی طبیعی و درصد اسپرم‌های زنده در کل نمونه افزایش می‌یابد (Mohammadi *et al*., 2008). برای تاثیر بیشتر و جلوگیری از مسمومیت سلنیومی، بیشتر از فرم نانوسلنیوم در رقیق‌کننده‌ها استفاده می‌شود (Nateq *et al*., 2020).

سیلیمارین فلاونوئیدی است که به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی تنظیم‌کننده‌ی مقدار گلوتاتیون درون سلولی و تثبیت‌کننده‌ی غشای سلولی مطرح است (Momeni *et al*., 2015). مکانیسم عمل سیلیمارین از طریق تحریک RNA ریبوزومی و محافظت از غشای سلولی از آسیب اکسیداتیو است. همچنین فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx را تحریک می‌کند (Wellington and Jarvis, 2001). سیلیمارین به عنوان افزودنی طبیعی به منی، آن را طی انجماد و سردسازی محافظت می‌کند و علاوه بربهبود زنده‌مانی بعد از یخ-گشایی، درصد اختلالات اسپرم را کاهش داده و درصد

اسپرم سالم و درصد تحرک را بهبود می‌بخشد (Behnam *et al*., 2022).

- افزودنی‌ها تحت عنوان کلاتور و گیرندهٔ یون‌ها

کلسیم یک نقش حیاتی در جنبندگی اسپرم و همچنین فرآیند اتصال غشاء در طول واکنش آکروزومی بازی می‌کند. اتصال به شکاف زونا یا پروژسترون یک افزایش در غلظت کلسیم داخل‌سلولی ناشی از بازشدن کانال‌های کلسیمی یا آزادشدن کلسیم از ذخایر داخل‌سلولی را ایجاد می‌کند. افزایش در غلظت کلسیم داخل‌سلولی باعث فعال‌شدن فسفاتیدیل اینوزیتول ۴و۵ بیس فسفات (PIP_2) می‌شود که فسفولیپاز آن را هیدرولیز کرده و دو پیامبر ثانویه به نام دی‌آسیل گلیسرول و اینوزیتول ۱و۴و۵ تری فسفات (IP_3) را به‌وجود می‌آورد. IP_3 آزاد شدن کلسیم از ذخایر داخل‌سلولی را تحریک کرده و دی‌آسیل گلیسرول پروتئین‌کیناز سیتوپلاسمیک و فسفولیپاز A_2 را فعال می کند. این وقایع یک بار دیگر باعث یک افزایش در غلظت کلسیم می‌شوند. سرانجام مقادیر بالای کلسیم که قبل از واکنش آکروزومی رخ می‌دهد با هم PIP_2 را هیدرولیز کرده و فرآورده‌ی حاصله از فعالیت فسفولیپاز A_2، دپلیمریزاسیون و اتصال غشاء را سبب می‌شود که اتفاق نهایی واکنش آکروزومی است. بر این اساس کلاتورهای کلسیم مثل EDTA (اتیلن دی آمین ترا استیک اسید) و EGTA (اتیلن گلیکول بیس آمینواتیلن اتر ترا استیک اسید) در برخی از مطالعات عملکرد اسپرم را بهبود بخشیده‌اند (Shafaati Alishah *et al*., 2020).

افزودن EDTA و EGTA در رقیق‌کننده‌ی منی کلسیم را کلات می‌کند و غلظت آن را در غشای پلاسمایی کاهش می‌دهد. EDTA یون‌های دیگر را نیز کلات می‌کند و همچنین ممکن است در مهار پراکسیداسیون لیپیدی نقش داشته باشد (Holt, 2000).

-افزودنی‌های طبیعی به رقیق‌کننده

استفاده از صمغ‌ها در رقیق‌کننده‌ی اسپرم پیشنهاد شده است. پلی‌ساکاریدهای گیاهی و مشتقات اصلاح‌شده آن‌ها به طور گسترده در پزشکی استفاده می‌شوند. پلی‌ساکاریدها اصلاح‌کننده‌های بالقوه واکنش‌های بیوشیمیایی هستند. آن‌ها دارای فعالیت‌های نرم‌کنندگی، پوشش‌دهنده، تنظیم سیستم ایمنی، ضد سرفه، ضد التهاب، ضد اسپاسم، ضد آلرژی، آنتی‌اکسیدان و ضد میکروب هستند. صمغ‌ها از درختان هلو، زردآلو، گیلاس و بادام می‌توانند ترشح شوند. صمغ درخت زردآلو نسبت به سایر صمغ‌ها pH نزدیک‌تری به منی قوچ دارد (Samaei *et al*., 1396). در ترکیب خود دارای آرابینوز است که از قندهای احیاءکننده است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد. دارای ترکیبات فنولیک است که این ترکیبات از عوامل آنتی‌اکسیدانی هستند و به‌عنوان پایان‌دهنده‌های رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند (Mahmoudi *et al*., 2010). صمغ‌ها به علت ساختمان پلی‌ساکاریدی که دارند بسیار هیدروفیل هستند و به‌راحتی تا ۴۰۰ برابر خود آب جذب کرده و ذخیره می‌کنند که می‌توانند تشکیل کریستال یخ داخل سلول اسپرم را کاهش دهند. صمغ‌ها به دلیل داشتن گلوکز در ترکیبات خود می‌توانند انرژی اسپرم را نیز تأمین کنند. همچنین به‌دلیل داشتن ترپنوئیدها که دارای خاصیت ضدباکتریایی هستند، می‌توانند با کاهش باکتری‌ها در رقیق‌کننده هم از رقابت باکتری‌ها با اسپرم‌ها جلوگیری کنند و هم با کاهش مواد

زاید حاصل از متابولیسم باکتری‌ها از اسیدی‌شدن pH محیط جلوگیری کرده و زنده‌مانی اسپرم‌ها را افزایش دهند. همچنین با کاهش تراکم باکتری‌ها مصرف مواد مغذی توسط باکتری‌ها را کاهش داده و در نتیجه تولید ROSها را نیز کاهش می‌دهد. صمغ زردآلو به دلیل داشتن دی‌ساکاریدها و پلی‌ساکاریدها، که نمی‌توانند از غشای اسپرم عبور کنند ولی با فسفولیپازهای غشای اسپرم تقابل کرده واز به‌هم خوردن نظم غشاء جلوگیری می کند و باعث زنده‌مانی بهتر اسپرم می‌شوند اسیدگلوکرونیک صمغ درخت زردآلو با ترکیب با مواد سمی آن‌ها را بی‌خطر می‌سازد و احتمالاً از این طریق می‌تواند در رقیق‌کننده مواد زاید را پاک‌سازی کند (Khanzadeh *et al.*, 2021). افزودن کافئین به رقیق‌کننده اسپرم قوچ درصد صفات حرکتی و زنده‌مانی و مقادیر گلوتاتیون پراکسیداز و ظرفیت اکسیدانی کل را نسبت به گروه شاهد افزایش داد (Alipour *et al.*, 2018).

بحث و نتیجه‌گیری

انجماد منی پستانداران، تحولی اساسی در نگه‌داری و حفاظت سلول اسپرم به‌وجود آورده و راهی برای حفظ پروتوپلاسم سلول جنسی می‌باشد که می‌تواند با حفظ DNA گونه‌ها، در دامپروری، آبزی‌پروری و حفظ تنوع زیستی کاربرد زیادی داشته باشد و بانک‌های ذخیره‌ی اسپرم می‌توانند همراه با دیگر تکنولوژی‌های تولیدمثلی، در بهبود نژادها و حفظ گونه های وحشی و بومی در حال انقراض نقش مهمی داشته باشند. همچنین با انجماد اسپرم، امکان انتقال به فاصله‌های خیلی دور، کنترل بیماری‌ها و حفظ بانک‌های ژنتیکی ممکن می‌گردد. با استفاده از انجماد اسپرم‌ها و تکنیک‌های تولیدمثلی، بسیاری از مشکلات باروری حیوانات آزمایشگاهی، دامی و انسانی قابل حل می‌باشد. به طورکلی، کیفیت اسپرم یخ‌گشایی‌شده از روی فاکتورهای مهمی مانند تحرک، درصد اسپرم‌های زنده و سلامت آکروزوم آنها ارزیابی می‌شود. استفاده از سطوح مختلف انواع افزودنی‌ها به رقیق‌کننده‌ی اسپرم منجمد و سرمایی در حیوانات سبب شده که توانایی زنده‌مانی، جنبایی، یکپارچگی آکروزوم و سایر پارامترهای کیفی اسپرم را تا حدود زیادی بهبود ببخشد.

سپاسگزاری

از تمامی نویسندگان مقالاتی که در تهیه این مقاله استفاده‌شده قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

• Agarwal, A. and Sekhon, L.H. (2010). The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. Human Fertility, 13(4): 217-225.

- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B.J., Shaman, A. and Gupta, S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: A review. Reproductive Biology and Endocrinology, 10: 1-31.
- Alcay, S., Toker, M.B., Gokce, E., Ustuner, B., Onder, N.T., Sagirkaya, H., et al. (2015). Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. Cryobiology, 71(2): 329-333.
- Alipour, P., Daghigh Kia, H. Moghaddam, Gh. and Ebrahimi, M. (2018). Evaluation caffeine antioxidant properties on Ghezel ram sperm quality after freeze- thawing. Revue de Medecine Veterinaire, 169(10-12): 233-240.
- Allai, L., Benmoula, A., Marciane da Silva, M., Nasser, B. and El Amiri, B. (2018). Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. Animal Reproduction Science, 192(2018): 6-17.
- Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L. and Storey, B.T. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. Journal of Andrology, 8(5): 338-348.
- Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani Nashtaei, M., Khodarahmian, M. and Nekoonam, S. (2016). The role of antioxidants in sperm freezing: A review. Cell Tissue Bank, 17(4): 745-756.
- Amorini, A.M., Listorti, I., Bilotta, G., Pallisco, R., Saab, M.W., Mangione, R., et al. (2021). Antioxidant-Based Therapies in Male Infertility: Do We Have Sufficient Evidence Supporting Their Effectiveness? Antioxidants, 10(2): 1-31.
- Anand, M., Baghel, G. and Yadav, S. (2017). Effect of egg yolk concentration and washing on sperm quality following cryopreservation in Barbari buck semen. Journal of Applied Animal Research, 45(1): 560-565.
- Asadpour, R., Pourseif, M.M., Moghaddam, Gh., Jafari, R., Tayefi, H. and Mahmodi, H. (2012). Effect of vitamin B12 addityion to extenders on some physiochemical paraameters of semen in crossbred rams. African Journal of Biotechnology, 11(54): 11741-11745.
- Aurich, J.E., Schönherr, U., Hoppe, H. and Aurich, C. (1997). Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. Theriogenology, 48(2): 185-192.
- Balao Da Silva, C.M., MacÍas-García, B., Miró-Morán, A. González-Fernández, L., Morillo-Rodriguez, A., Ortega-Ferrusola, C., et al. (2011). Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. Journal of Pineal Research, 51(2): 172-179.
- Ball, B.A., Medina, V., Gravance, C.G. and Baumber, J. (2001). Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 50C. Theriogenology, 56(4): 577-589.
- Barrios, B., Pe´rez-Pe´, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J. and Muin˜o-Blanco, T. (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. Biology Reproduction, 63(5): 1531-1537.
- Behnam, M., Moghaddam, Gh., Daghigh kia, H., qasqmi panahi, B. and Nateq, S. (2022). Effect of of silymarin on the membrane integrity, viability and motlility of ram frozen sperm. Journal of Animal Science Researches, 32(2): 95-105. [In Persian]
- Boron, W.F. (2004). Regulation of intracellular pH. Advances in physiology education, 28: 160–179.
- Bucak, M.N., Keskin, N., Taşpınar, M., Çoyan, K., Başpına, N., Cenariu, M.C., et al. (2013). Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. Cryobiology, 67(1): 34-39.
- Celeghini, E.C.C., De Arruda, R.P., De Andrade, A.F.C., Nascimento, J., Raphael, C.F. and Rodrigues, P.H.M. (2008). Effects that Bovine Sperm Cryopreservation Using Two Different Extenders have on Sperm Membranes and Chromatin. Animal Reproduction Science 104(2-4): 119-131.
- Cevik, M., Tuncer, P.B., Tas demer, U. and Ozgurtas, T. (2007). Comparison of spermatological characteristics and biochemical seminal plasma parameters of normozoospermic and oligoasthenozoospermic bulls of two breeds. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 31(6): 381-387.

- Chainy, G.B.N. and Sahoo, D.K. (2020). Hormones and oxidative stress: An overview. Free Radical Research, 54(1): 1-26.
- Chandonnet, I., Roberts, K.D., Chapdelaine, A. and Manjunath, P. (1990). Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. Molecular Reproduction and Development, 26(4): 313-318
- Chatdarong, K., Chaivechakarn, A., Thuwanut, P. and Ponglowhapan, S. (2012). Effects of Cold Storage Prior to Freezing on Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase Activities, Level of Total Reactive Oxygen Species and Sperm Quality in Dogs. Reproduction in Domestic Animals, 47(6): 274-277.
- Cross, N.L. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. Biology of reproduction, 59(1): 7-11.
- De Lamirande, E. and Gagnon C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa II depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. Journal of Andrology, 13(5): 379-386.
- Del Prete, C.; Stout, T., Montagnaro, S., Pagnini, U., Uccello, M., Florio, P., et al. (2019). Combined addition of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase improves quality of cooled stored stallion semen. Animal Reproduction Science, 210: 1-10.
- Domı´nguez, M.P., Falcinelli, A., Hozbor, F., Sa´nchez, E., Cesari, A. and Alberio, R.H. (1992). Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. Theriogenology, 69(5): 564-573.
- Dovlati, P., Moghaddam, Gh, Daghigh kia, H., Taghizadeh, A. and Rafat, A. (2015). The effect of adding different raffinose concentrations in the diluents in semen cryopreservation of different breeds of ram at reproductive season. Journal of Animal Science Researches, 25(2): 121-132. [In Persian]
- Dovlati, P., Moghaddam, Gh. and Ahmadian, H. (2016). Evaluation of the effects of cysteine and trehalose on long- term cryopreservation of ram semen. Journal of Agri-Food and Applied Sciences, 4(1): 1-6.
- Eghbali, M., Alvi-Shoushtari, S.M. and Rezaii, S.A. (2008). Effects of copper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11(15): 1964-1968.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I. and Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule, Glycobiology. 13(4): 17-27.
- El-Hajj Ghaoui, R., Gillan, L., Thomson, P.C., Evans, G. and Maxwell, W.M.C. (2007). Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status, and in vitro fertility of ram spermatozoa. Journal of Andrology, 28(1): 109–122.
- Ferdinand, N., Thomas, T.T., Augustave, K., Herny, D.F., Ferdinand, T. and Etienne, P.T. (2012). Effects of Buck Age, Storage Duration, Storage Temperature and Diluent on Fresh West African Dwarf Buck Semen. Journal of Reproduction and Fertility, 3(3): 58-66.
- Ferreira, V.D.S., Mello, M.R.B.D., Fonseca, C.E.M.D., Dias, A.C.F., Cardoso, J.M., Silva, R.B. et al. (2014). Effect of seminal plasma and egg yolk concentration on freezability of goat semen. Revista Brasileira de Zootecnia, 43(10): 513-518.
- Flipse, R.J. (1960). Metabolism of bovine semen IX glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase activities. Journal of Dairy Science, 43(6): 773-776.
- Garner, D.L., Thomas, C.A., Gravance, C.G., Marshall, C.E., DeJarnette, J.M. and Allen, C.H. (2001). Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. Theriogenology, 56: 31-40.
- Gülçin, I. (2006). Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. Life Science, 78: 803-811.
- Hammerstedt, R.H. and Graham, J.K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. Cryobiology, 29(1): 26-38.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K. and Nolan, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. Journal of Andrology, 11(1): 73-88.

- Heidari, M., qasqmi panahi, B., Moghaddan, Gh., Daghigh kia, H. and Masoudi, R. (2022). L-carintine improves quality parameters and epigenetic patterns of Bucks froen- thawed semen. Animal Reproduction Science, 247: 1-7.
- Hess, R.A., Zhou, Q., Nie, R., Oliveira, C., Cho, H., Nakaia, M., et al. (2001). Estrogens and epididymal function. Reproduction, Fertility and Development, 13(4): 273-283.
- Hidiroglou, M. and Knipfel, J.E. (1984). Zink in mammalian sperm: a review. Journal of Dairy Science, 67(6): 1147-1156.
- Holt, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science, 62(1-3): 3-22.
- Jang, H.Y., Kim, Y.H., Kim, B.W., Park, I.C., Cheong, H.T., Kim, J.T., et al. (2010). Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. Reproduction in Domestic Animals, 45(6): 943-950.
- Jobim, M.I.M., Oberst, E.R., Salbego, C.G., Souza, D.O., Wald, V.B., Tramontina, F., et al. (2004). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. Theriogenology, 61(2-3): 255–266.
- Jones, R.C. (1973). Collection, motility and storage of spermatozoa from the African elephant Loxodonta Africana. Nature, 243(5401): 38-39.
- Juyena, N.S. and Stella. (2012). Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. Journal of Andrology, 33(4): 536-551.
- Kaya, A., Aksoy, M. and Tekeli, T. (2002). Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. Small Ruminant Research, 44(2): 153-158.
- Khanzadeh, P., Moghaddam, G., Daghigh kia, H., Rafat, S.A. and Moradi, R. (2021). The effect of apricot Tree gum on the quality of frozen and melted ram sperm in the breeding season. Iranian Journal of ASpplied Animal Science, 11(4): 749-760.
- Khumran, A., Yimer, N., Rosnina, Y., Ariff, M., Wahid, H., Kaka, A., et al. (2017). Supplementation of Antioxidant BHT to Different Bull Semen Extenders Enhances Semen Quality after Chilling. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science, 40 (1): 131-142.
- Lapwood, K.R. and Martin, I.C.A. (1966). The Use of Monosaccharides, Disaccharides, and Trisaccharides in Synthetic Diluents for the Storage of Ram Spermatozoa at 37°C and 5°C. Australian Journal of Biological Sciences, 19(4): 655-672.
- Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L. and Dondero, F. (1996). Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. Human Reproduction Update, 2(3): 246-256.
- Levine, R.L., Berlett, B.S., Moskovitz, J., Mosoni, L. and Stadtman, E.R. (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. Mechanisms of Ageing and Development, 107(3): 323-332.
- Li, H., Zhang, X.G., Fang, Q., Liu, Q., Du, R.R., Yang, G.S., et al. (2017). Supplemental effect of different levels of taurine in Modena on boar semen quality during liquid preservation at 170C. Animal Science Journal, 88(11): 1692-1699.
- Mahmoudi, M., Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Hafezi, S., Nabavi, S.M. and Eslami, S.H. (2010). Antiinflammatory and antioxidant activities of gum mastic. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 14(9): 765-769.
- Mann, T. and Lutwak-Mann, C. (1981). Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Berlin, Germany: Springer-Verlag; pp: 495.
- Massa´nyi, P., Trandzik, J., Nad, P., Toman, R., Skalicka´, M. and Kore´nekova´, B. (2003). Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. Asian Journal of Andrology, 5(2): 101-104.

- Matsuoka, T., Imai, H., Asakuma, S., Kohno, H. and Fukui, Y. (2006). Changes of fructose concentrations in seminal plasma and glucose and testosterone concentrations in blood plasma in rams over the course of a year. Journal of Reproduction and Development, 52(6): 805-810.
- Maxwell, W. and Stojanov, T. (1996). Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. Reproduction, Fertility and Development, 8(6): 1013-1020
- Maxwell, W.M.C., Graaf, S.P., Ghaoui, R.E.H. and Evans, G. (2007). Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. Society of Reproduction and Fertility Supplement, 64(1): 13-38.
- Michael, A.J., Alexopoulos, C., Pontiki, E.A., Hadjipavlou-Litina, D.J., Saratsis, P., Ververidis, H.N. and Boscos, C.M. (2009). Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Animal Reproduction Science, 112(1-2): 119-135.
- Miguel, A., Jesús L. Fernando, J., Santolaria, P. and Castelló-Ruiz, M. (2021). Role of Antioxidants in Cooled Liquid Storage of Mammal Spermatozoa. Antioxidants, 10(7): 1-19.
- Miro´nczuk-Chodakowska, I., Witkowska, A.M. and Zujko, M.E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. Advances in Medical Sciences, 63(1): 68-78.
- Moghaddam, Gh., Pourseif, M.M. and Rafat, S.A. (2012). Seasonal variation n semen quality and quality traits of Iranian crossbred rams. Slovak journal of Animal Science, 45(3): 67-75.
- Mohammadi, S.H., Movahedin, M. and Mowla, S.J. (2008). Antioxidant effects of selenium on sperm parameters and testicular structure in young and aged mice. Journal of Reproduction and Infertility, 9(3): 229-237.
- Momeni, H.N., Sepehri, H. and Yosefi, M. (2015). Effect of Silymarin on Plasma Membrane and Acrosome of Sperm Treated with Aluminum Chloride. Journal of Arak University of Medical Sciences, 18(4): 71-80. [In Persian]
- Motta, J.P.R., Paraguassú-Braga, F.H., Bouzas, L.F. and Porto, L.C. (2014). Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. Cryobiology, 68(3): 343-348.
- Mousavi, S.M., Towhidi, A., Zhandi, M., Amoabediny, G., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Sharafi, M., et al. (2019). Comparison of two different antioxidants in a nano lecithin-based extender for bull sperm cryopreservation. Animal Reproduction Science, 209(1): 1-9.
- Muzandu, K., Ishizuka, M., Sakamoto, K.Q., Shaban, Z., El Bohi, K., Kazusaka, A. and Fujita, S. (2006). Effect of lycopene and carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications. Toxicology and Applied Pharmacology, 215(3): 330-340.
- Nateq, S., Moghaddam, Gh. Alijani, S. and Behnam, M. (2020). The effects of differen levels of Nano selenium on the quality of frozen- thawed sperm in ram. Journal of Applied Animal Science, 48(1): 434-439.
- Neumark, H. and Schindler, H. (1967). Amino acids, amines and peptides of ram epidiymal semen. Journal of Reproduction and Fertility, 14(3): 469-471.
- Ollero, M., Garcı ´a-Lo´pez, M., Cebria´n-Pe´rez, J.A. and Muin˜o-Blanco, T. (1996). Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. International Journal of Andrology, 19(5): 287-292.
- Ozbal, S., Erbil, G., Kocdor, H., Tugyan, K. and Pekcetin, C. (2008). The effects of selenium against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. Neurosci Letters, 438(3): 265-269.
- Parks, J.E. and Graham, J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology, 38(2): 209-222.
- Patel, A.B., Srivastava, S., Phadke, R.S. and Govil, G. (1998). Arginine activates glycolysis of goat epididymal spermatozoa: an NMR study. Biophysical Journal, 75(3): 1522-1528
- Pérez, G.O., Juárez-Mosqueda, M.D.L., Carvajal, S.U. and Ortega, M.E.T. (2009). Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. Cryobiology, 58(3): 287-292.

- Peruma, P., Chamuah, J.K. and Rajkhowa, C. (2013). Effect of catalase on the liquid storage of mithun (Bos frontalis) semen. Asian Pacific Journal of Reproduction, 2(3): 209-214.
- Pezo, F., Yeste, M., Zambrano, F., Uribe, P., Risopatrón, J. and Sánchez, R. (2021). Antioxidants and their effect on the oxidative/nitrosative stress of frozen-thawed boar sperm. Cryobiology, 98: 5-11.
- Rao, A.V., Ray, M.R. and Rao, L.G. (2006). Lycopene. Advances in Food and Nutrition Research, 51: 99-164.
- Rasad, S.D. and Simanjuntak, L.C. (2011). The Effect of Fructose Addition in Semen Extender on Quality of Separation of Garut Ram Sperm in Several Storage Length. Animal Production, 11(3): 196-201.
- Rigby, S.L., Brinshko, S.P. and Cochran, M. (2001). Advances in cooled semen technology: seminal plasma and semen extender. Animal Reproduction Science, 68(3-4): 171-180.
- Rudolph, A.S., Crowe, J.H. and Crowe, L.M. (1986). Effects of three stabilizing agents' proline, betaine, and trehalose on membrane phospholipids. Archives of Biochemistry and Biophysics, 245(1): 134-143.
- Ruffin, V.A., Salameh, A.I., Boron, W.F. and Parker, M.D. (2014). Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. Frontiers in Physiology, 43(5): 1-11.
- Safa, S., Moghaddam, Gh. Jafari, R., Daghigh kia, H. and Janmohammadi, H. (2016). Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post- thawn variables and oxidative statys of rooster semen. Animal Reproduction Science, 174: 100-106.
- Salamon, S. and Maxwell, W.M.C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Animal Reproduction Science, 37(3): 185-249.
- Salamon, S. and Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of ram semen. Animal Reproduction Science, 62(1): 7-111.
- Samaei, S.P., Ghorbani, M., Sadeghi Mahoonak, A.R. and Jafari, S. M. (2017). Physicochemical and functional properties of apricot tree gum. Journal of Food Science and Technology (Iran), 65(14): 335-342. [In Persian]
- Scott, T.W. and Dawson, R.M.C. (1968). Metabolism of phospholipids by spermatozoa and seminal plasma. Biochemical Journal, 108(3): 457-463.
- Setchell, B.P. and Brooks, D.E. (1988). Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. The Physiology of Reproduction. New York, NY: Raven Press; pp: 753-836.
- Shafaati Alishah, P. and Moghaddam, Gh. (2021). The effect of morphometry, viscosity and liquefaction of semen on the quality of frozen ram sperm, Veterinary Clinical Pathology, 15(2): 155-167. [In Persian]
- Shafaati Alishah, P., Moghaddam, Gh., Daghighkia, H. and Alijani, S. (2020). Investigating the effect of diluents containing EDTA and Propylene glycol on survival of frozen semen of Ghezel ram. Veterinary Clinical Pathology, 13(4): 353-369. [In Persian]
- Sheikholeslami, S.A., Soleimanzadeh, A., Rakhshanpour, A. and Shirani, D. (2020). The evaluation of lycopene and cysteamine supplementation effects on sperm and oxidative stress parameters during chilled storage of canine semen. Reproduction in Domestic Animals, 55(9): 1229-1239.
- Shi, L., Jin, T., Hu, Y., Ma, Z., Niu, H. and Ren, Y. (2020). Effects of reduced glutathione on ram sperm parameters, antioxidant status, mitochondrial activity and the abundance of hexose transporters during liquid storage at 50C. Small Ruminant Research, 189: 106-139.
- Shore, L., Yehuda, R., Marcus, S., Bartoov, B. and Shemesh, M. (2003). Effect of HCG injection on prostaglandin E concentrations in ram seminal plasma. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 70(3-4): 291-301.
- Sinha, M.P., Sinha, A.K., Singh, B.K. and Prasad, R.L. (1996). The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. Animal Reproduction Science, 41(3-4): 237-243.
- Sirat, M.P., Sinha, A.K., Singh, B.K. and Prasad, R.L. (1996). Effects of cryoprotectants on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing. Theriogenology, 45(2): 405-416.

- Soultanpour, F., Moghaddam, Gh., Daghigh kia, H. and Rafat, A. (2014). Evaluation of Ghezel- Merino, Merino- Moghani ram semen characteristics in breeding Season. Journal of Animal Science Researches, 24(3): 31-41. [In Persian]
- Taha, T.A., Abdel-Gawad, E.I. and Ayoub, M.A. (2000). Monthly variations in some reproductive parameters of Barki and Awassi rams throughout 1 year under subtropical conditions biochemical and enzymatic properties of seminal plasma. Journal of Animal Science, 71(2): 325-332.
- The´rie´n, I., Moreau, R. and Manjunath, P. (1998). Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. Biology of Reproduction. 59(4): 768-776.
- Tummaruk, P., Lundeheim, N., Einarsson, S. and Dalin, A.M. (2000). Reproductive performance of purebred Swedish Landrace and Swedish Yorkshire sows: II, Effect of mating type, weaning-to-first service interval and lactation length. Acta Agriculturae Scandinavica, 50(3): 217-224.
- Tuncer, P.B., Bucak, M.N., Sarıözkan, S., Sakin, F., Yeni, D., Çiğerci, İ.H., et al. (2010). The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (Capra hircus ancryrensis) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. Cryobiology, 61(1): 89-93.
- Verstegen, J.P., Onclin, K. and Iguer-Ouada, M. (2005). Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: In vitro and in vivo studies. Theriogenology, 64(3): 720-733.
- Watanabe, M., Kikawada, T. and Okuda, T. (2003). Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of Polypedilum vanderplanki. Journal of Experimental Biology, 206(13): 2281-2286.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science, 60-61: 481-492.
- Wellington, K. and Jarvis, B. (2001). Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. BioDrugs, 15(7): 465-489.
- Zhang, X.G., Liu, Q., Wang, L.Q., Yang, G.S. and Hu, J.H. (2016). Effects of glutathione on sperm quality during liquid storage in boars. Animal Science Journal, 87(10): 1195-1201.
- Zubkova, E.V. and Robaire, B. (2004). Effect of glutathione depletion on antioxidant enzymes in the epididymes, seminal vesicles, and liver and on spermatozoa motility in the aging brown Norway rat. Biology of Reproduction, 71(3): 1002-1008.