Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 17, Issue 1, 2026 p: 54- 64

OPEN ACCESS

Research Paper

Antioxidant Effects of Gamma Oryzanol at Different Incubation Times at 4 °C on Ram Epididymal Sperm Quality Parameters

Roughayeh Abbasi[1], Ramin Farhadi[2], Sara Ghaffarian[3] and Abouzar Najafi[4]

1- Master's degree in Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran,
(Corresponding author: roughayeh.abbasi@azaruniv.ac.ir)
2- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
3- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
4- Department of Animal Science and Poultry, Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 02 August, 2025 Revised: 05 October, 2025 Accepted: 10 November, 2025

Extended Abstract

Background: The progress of breeding programs and improvement of the reproductive status of livestock in the last few decades is the result of using the artificial insemination technique. This technique is widely used in heavy livestock, but in light livestock, the complex anatomical system of the female animal and the very high sensitivity of ram sperm to cold shock and oxidative stress are among the limitations that have often made the use of artificial insemination difficult. Given the importance of the quality of the produced sperm in sheep artificial insemination, the sperm used is mostly fresh and chilled semen. However, it is not always possible to use fresh semen, and sperm preservation is inevitably necessary. Therefore, sperm cooling can be used in sheep artificial insemination in the short term with minimal damage to sperm and also has the necessary fertility. However, due to the decrease in temperature and the occurrence of cold shock, the production of free radicals increases during the cooling process and causes numerous structural and biochemical damages to sperm, reducing their fertility chances. To combat this problem, it is crucial to use the right antioxidant compound in the diluent. Gamma oryzanol is a natural antioxidant compound derived from barley, whose antioxidant properties have been proven in many studies. The antioxidant properties of gamma oryzanol are primarily related to the scavenging of free radicals, especially superoxide, hydroxyl, and hydrogen peroxide radicals, with the hydroxyl group on the phenolic ring of the ferulic acid moiety being the main inhibitor of free radicals. Gamma oryzanol acts as an activator of intracellular antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase, increasing their activity. It has also been shown that gamma oryzanol can interfere with the Nrf-2 biochemical pathway and increase the expression of proteins related to some antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase, and increase their production. Therefore, this study aimed to investigate the effects of adding different concentrations of gamma oryzanol to the ram epididymal sperm diluent at different incubation times at 4 °C.

Methods: In this experiment, testicular tissue was transported to the laboratory within one hour after collection from the slaughterhouse. Sperm was prepared by cutting the epididymal tail. After initial evaluation, sperm samples, with viability above 85%, progressive motility above 75%, and abnormalities below 10%, were selected and diluted in the Tris-egg yolk-based diluent. At 37 °C, different concentrations of gamma oryzanol (0, 50, 100, and 200 µM) were added to the diluent containing sperm. Subsequently, the samples were transferred to 4 °C in isothermal water for cooling. The samples were gradually cooled to 4 °C and equilibrated after about 2 hours. At 6, 12, 24, and 48 hours after fixation, the samples were evaluated at this temperature for the following parameters: total motility, progressive motility, viability, plasma membrane integrity, percentage of abnormalities, malondialdehyde (MDA) concentration, and antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), and catalase (CAT). The data obtained from the evaluations were analyzed by the SAS software and the GLM procedure at a significance level of 0.05.

Results: The results of this experiment showed that the diluent containing 100 µM of gamma oryzanol significantly improved the overall motility characteristic compared to the control

Copyright ©2026 Abbasi et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

group at 12, 24, and 48 hours ($P < 0.05$). However, no significant difference was observed between the diluents in the progressive motility characteristic at all evaluated times ($P > 0.05$). In examining the percentage of sperm viability, only the diluent containing 100 µM of gamma oryzanol significantly increased sperm viability at 12 hours, but there was no significant difference between the groups at the other times. Regarding the sperm plasma membrane integrity parameter, adding 100 µM of gamma oryzanol had a significant effect compared to the control group. Regarding sperm abnormalities, no significant difference was found between the groups at any time. The results of the present experiment showed that adding 50 and 100 µM of gamma oryzanol significantly reduced MDA concentrations at 12 and 24 hours. Moreover, the 100 µM concentration of this compound significantly increased SOD enzyme activity at 12 and 24 hours, and the 100 and 200 µM concentrations significantly increased GPX enzyme activity only at 24 hours ($P < 0.05$). However, the addition of gamma oryzanol concentrations did not significantly increase CAT enzyme activity compared to the control group at all the evaluated times ($P > 0.05$).

Conclusion: The results of this experiment show that the use of the antioxidant compound gamma oryzanol in the diluent medium can improve the quality of ram epididymal sperm to some extent in short periods after refrigeration. Therefore, using gamma oryzanol at a concentration of 100 µM in ram sperm diluent is recommended for short-term refrigeration.

Keywords: Antioxidant, Cold Storage, Gamma Oryzanol, Oxidative Stress, Sperm

How to Cite This Article: Abbasi, R., Farhadi, R., Ghaffarian Verjoi, S., & Najafi, A. (2026). Antioxidant Effects of Gamma Oryzanol at Different Incubation Times at 4 °C on Ram Epididymal Sperm Quality Parameters. *Res Anim Prod,* 17(1), 54-64. DOI: 10.61882/rap.2026.1558

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

اثرات آنتی‌اکسیدانی گاما اوریزانول در زمان‌های مختلف انکوباسیون در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم اپیدیدیمال قوچ

رقیه عباسی[1]، رامین فرهادی[2]، سارا غفاریان[3] و ابوذر نجفی[4]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، (نویسنده مسوول: roughayeh.abbasi@azaruniv.ac.ir)
۲- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
۴- گروه علوم دام و طیور، دانشکده فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۱۱ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۱۹
صفحه: ۵۴ تا ۶۴

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: پیشرفت برنامه‌های اصلاح نژاد و بهبود وضعیت تولید مثلی دام‌ها در چند دهه اخیر، نتیجه استفاده از تکنیک تلقیح مصنوعی است. در دام‌های سنگین، این تکنیک به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما در دام‌های سبک، محدودیت‌هایی مانند سیستم آناتومیکی پیچیده حیوان ماده و حساسیت بسیار بالای اسپرم قوچ به شوک سرمایی و استرس اکسیداتیو، اغلب استفاده از تلقیح مصنوعی را با مشکل مواجه کرده است. با توجه به اهمیت کیفیت اسپرم تولیدی در تلقیح مصنوعی گوسفند، اسپرم مورد استفاده عمدتاً از منی تازه و سرد شده است. با این‌حال، استفاده از منی تازه همیشه امکان‌پذیر نیست و نگهداری اسپرم ناگزیر ضروری است. بنابر این، می‌توان از سردسازی اسپرم در تلقیح مصنوعی گوسفند در کوتاه‌مدت با حداقل آسیب به اسپرم استفاده کرد به‌طوری‌که همچنان باروری لازم را داشته باشد. با این‌حال، در طول فرآیند سرد کردن، به‌دلیل کاهش دما و وقوع شوک سرمایی، تولید رادیکال‌های آزاد افزایش یافته، باعث آسیب‌های ساختاری و بیوشیمیایی متعددی به اسپرم می‌شود و شانس باروری آن را کاهش می‌دهد. برای مقابله با این مشکل، استفاده از ترکیب آنتی‌اکسیدانی مناسب در رقیق‌کننده بسیار مهم است. گاما اوریزانول یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی طبیعی مشتق‌شده از جو است که خواص آنتی‌اکسیدانی آن در مطالعات بسیاری اثبات شده است. خواص آنتی‌اکسیدانی گاما اوریزانول در درجه اول مربوط به مهار رادیکال‌های آزاد، به‌ویژه رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن است که گروه هیدروکسیل روی حلقه فنلی قسمت فرولیک اسید، مهارکننده اصلی رادیکال‌های آزاد است. گاما اوریزانول به‌عنوان فعال کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی درون سلولی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز عمل می‌کند و فعالیت آنها را افزایش می‌دهد. همچنین نشان داده شده است که گاما اوریزانول می‌تواند در مسیر بیوشیمیایی Nrf-2 تداخل ایجاد کند و بیان پروتئین‌های مربوط به برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز را افزایش داده، تولید آنها را افزایش دهد. بنابر این، هدف از این مطالعه بررسی اثرات افزودن غلظت‌های مختلف گاما اوریزانول به رقیق‌کننده اسپرم اپیدیدیمی قوچ در زمان‌های مختلف انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، بافت بیضه ظرف یک ساعت پس از جمع‌آوری از کشتارگاه به آزمایشگاه منتقل شد. آماده‌سازی اسپرم با برش دم اپی‌دیدیم انجام شد. پس از ارزیابی اولیه، نمونه‌های اسپرم با قابلیت زنده‌مانی بالای ۸۵ درصد، تحرک پیش‌رونده بالای ۷۵ درصد و ناهنجاری‌های زیر ۱۰ درصد انتخاب و در رقیق‌کننده بر پایه تریس-زرده تخم‌مرغ رقیق شدند. در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، غلظت‌های مختلف گاما اوریزانول شامل صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار به رقیق‌کننده حاوی اسپرم اضافه شدند. متعاقباً، نمونه‌ها برای سرد شدن به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در آب هم‌دما منتقل شدند. پس از حدود ۲ ساعت، نمونه‌ها به‌تدریج تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سرد شدند و به تعادل رسیدند. در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تثبیت، نمونه‌ها در این دما برای پارامترهای زیر ارزیابی شدند: جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسما، درصد ناهنجاری‌ها، غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT). داده‌های به‌دست‌آمده از ارزیابی‌ها با نرم‌افزار SAS و روش GLM در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: افزودن گاما اوریزانول در غلظت ۱۰۰ میکرومولار به‌طور قابل‌توجهی جنبایی کل را در ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت افزایش داد ($P < 0.05$)، اگرچه جنبایی پیش‌رونده اسپرم در هیچ کدام از زمان‌های مورد ارزیابی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف گاما اوریزانول قرار نگرفت ($P > 0.05$). زنده‌مانی اسپرم فقط در زمان ۱۲ ساعت با افزودن ۱۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول به‌طور قابل‌توجهی بهبود یافت، اما در سایر زمان‌ها هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیماری مشاهده نشد ($P > 0.05$). یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم با افزودن ۱۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول به رقیق‌کننده در زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت بهبود یافت، در حالی‌که هیچ تغییر قابل‌توجهی در ناهنجاری‌های اسپرم در تمامی زمان‌های مورد ارزیابی بین تیمارها مشاهده نشد. تجزیه و تحلیل داده‌های بیوشیمیایی نیز نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول به‌طور قابل‌توجهی سطح مالون‌دی‌آلدئید را در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت کاهش داد ($P < 0.05$). علاوه بر این، غلظت ۱۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول فعالیت آنزیم SOD را در ۱۲ و ۲۴ ساعت افزایش داد، در حالی‌که هر دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار فعالیت GPx را در ۲۴ ساعت افزایش دادند ($P < 0.05$). با این‌حال، تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم CAT بین گروه‌ها در تمامی زمان‌ها مشاهده نشد ($P > 0.05$). با توجه به معنی‌داری اثر متقابل تیمار×زمان، می‌توان نتیجه گرفت که کارایی گاما اوریزانول در حفاظت از اسپرم به زمان وابسته است. در ساعات اولیه نگهداری (۱۲ تا ۲۴ ساعت)، افزودن این ترکیب باعث بهبود قابل ملاحظه فراسنجه‌های حرکتی و بیوشیمیایی اسپرم شد، اما در زمان‌های طولانی‌تر اثر حفاظتی آن کاهش یافت. این موضوع احتمالاً به نیمه‌عمر کوتاه گاما اوریزانول در محیط‌های آبی و کاهش پایداری آن در دمای پایین مرتبط است.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهند که مکمل گاما اوریزانول با افزایش جنبایی، یکپارچگی غشای پلاسما و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و در عین حال کاهش آسیب اکسیداتیو، کیفیت اسپرم اپیدیدیمی قوچ را در طول نگهداری کوتاه‌مدت در دمای یخچال بهبود می‌بخشد. بنابر این، غلظت ۱۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول برای بهبود کیفیت اسپرم قوچ در شرایط نگهداری سردسازی و کوتاه‌مدت توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسپرم، سردسازی، تنش اکسیداتیو، گاما اوریزانول

مقدمه

طی چند دهه اخیر، تکنیک انجماد گامت به سرعت در حیوانات مختلف برای دستیابی به لقاح موفق از طریق تکنیک کمک باروری پیشرفت کرده است (Clulow *et al*., 2008; Medeiros *et al*., 2002). انجماد اسپرم به حفظ و انتقال ژن‌های ارزشمند برای زمینه‌های تولید مثل، کشاورزی، علوم دامی و تحقیقات زیست‌پزشکی کمک می‌کند. با استفاده از این تکنیک می‌توان سلول‌های اسپرم را برای طولانی‌مدت نگهداری کرد که می‌تواند در درمان ناباروری انسان و جانوران مختلف به‌خصوص در گونه‌هایی که در خطر انقراض نسل هستند، حیاتی باشد (Ruane, 2000). از طرف دیگر، بهینه‌سازی تولیدمثل با استفاده از تکنیک‌های کمک‌باروری شامل تلقیح مصنوعی، انتقال جنین، انجماد تخمک، ذخیره منی، لقاح آزمایشگاهی[1] و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم حاصل می‌شود. به‌کارگیری موفقیت‌آمیز این تکنیک‌ها عمدتاً به کیفیت اسپرم بستگی دارد. البته روش فرآوری و کیفیت رقیق‌کننده به‌شدت کیفیت اسپرم از جمله ویژگی‌های فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی اسپرم را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Salamon & Maxwell, 2000). مهمترین اصل در نگهداری اسپرم برای مدت طولانی بهره‌گیری از کاهش دما است که به کاهش و حتی توقف متابولیسم سلولی منجر می‌شود، به‌طوری‌که در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد ازت مایع متابولیسم سلول اسپرم به صفر می‌رسد و از این طریق می‌توان سلول‌های اسپرم را برای زمان‌های طولانی نگهداری کرد. اما با توجه به کاهش شدید دما، دو عامل بسیار مهم به نام تنش اکسیداتیو و ایجاد بلورهای یخی سلول‌های اسپرم را دچار آسیب‌های فیزیکی و بیوشیمیایی می‌کنند که در نهایت احتمال باروری آنها را به‌شدت کاهش می‌دهند (Ikeda *et al*., 1999). از طرف دیگر، اسپرم پستانداران به‌ویژه قوچ با توجه به ساختار اسیدهای چرب موجود در غشای سلولی و نسبت پایین کلسترول به فسفولیپیدها به شدت در برابر تنش اکسیداتیو و آسیب‌های ناشی از کاهش دما حساس هستند (Kameni *et al*., 2021). در اثر کاهش دما، تولید رادیکال‌های آزاد به‌شدت افزایش می‌یابد و غشای سلول‌های اسپرم را مورد حمله قرار می‌دهند که در نهایت موجب آسیب‌های متعدد ساختاری و عملکردی اسپرم می‌شوند. مکانیسم آسیب‌های سرمایی ممکن است مربوط به تنش اسمزی، شوک سرمایی، تشکیل بلورهای یخ درون‌سلولی، و تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد به‌خصوص گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر[2] باشد (Chatterjee *et al*., 2001). در حالت نگهداری اسپرم به صورت مایع و سردشده، تا حدودی میزان آسیب‌ها و کاهش کیفیت اسپرم در مقایسه با حالت انجماد کمتر است ولی از این روش نمی‌توان برای ذخیره‌سازی بلندمدت اسپرم استفاده کرد (Amini *et al*., 2019; Macedo *et al*., 2018). طی یک دهه اخیر، برای مقابله با تنش اکسیداتیو ترکیبات متعدد آنتی‌اکسیدانی به محیط رقیق‌کننده اضافه و اثرات آنها بررسی شده‌اند و گزارشات مثبتی نیز در این زمینه حاصل شده‌اند. این ترکیبات موجب خنثی شدن و حذف رادیکال‌های آزاد می‌شوند (Sikka, 1996). گاما اوریزانول به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی طبیعی مشتق شده از برنج است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن ثابت شده است. به‌طوری‌که توان آنتی‌اکسیدانی این ترکیب در مقابل پراکسیداسیون لیپیدی ۱۰ برابر بیشتر از ویتامین E گزارش شده است (Huang *et al*., 2020). به‌طور مثال، ترکیبات اصلی گاما اوریزانول شامل کمپستریل-۷، سیکلوآرتنیل-۷ و فرول ۱۰- متیلن سیکلوآرتانیل همگی نسبت به توکوفرول‌ها و توکوترینول‌ها، توان آنتی‌اکسیدانی بالاتری در مهار اکسیداسیون کلسترول نشان دادند (Xu *et al*., 2001). خاصیت آنتی‌اکسیدانی گاما اوریزانول در درجه اول به پاکسازی رادیکال‌های آزاد به‌ویژه رادیکال‌های سوپر اکسید، هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن مربوط می‌شود که گروه هیدروکسیل روی حلقه فنولیک قسمت فرولیک اسید مسئول اصلی مهار رادیکال‌های آزاد عنوان شده است. ارائه اتم هیدروژن روی گروه هیدروکسیل به رادیکال‌های آزاد منجر به تشکیل یک فنوکسی رادیکال در حلقه فنلی می‌شود که به‌شدت ناپایدار است و سریعاً خنثی شده، از بین می‌رود (Kensler *et al*., 2007). همچنین، گاما اوریزانول با دخالت در مسیر سیگنالینگ Nrf-۲ موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی می‌شود (Rungratanawanich *et al*., 2020). بنابر این، هدف این مطالعه بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی گاما اوریزانول بر ویژگی‌های جنبایی، ساختاری و بیوشیمیایی اسپرم اپیدیدیمی قوچ نژاد شال در شرایط سردسازی بود. فرضیات تحقیق عبارت‌اند از ۱- افزودن گاما اوریزانول می‌تواند موجب بهبود کیفیت اسپرم اپیدیدیمی قوچ در شرایط سردسازی شود و ۲- اثرگذاری گاما اوریزانول در زمان‌های مختلف انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد می‌تواند متفاوت باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه متابولیسم عالی گروه علوم دام و طیور دانشکده فناوری کشاورزی دانشگاه تهران انجام شد. پودر گاما اوریزانول با خلوص ۹۹/۵ درصد ساخت شرکت Gamma-AHA International-China تهیه و در این مطالعه استفاده شد. در روز آزمایش، بافت‌های بیضه قوچ‌های سن ۲ الی ۳ سال نژاد شال از کشتارگاه تهیه و کمتر از یک ساعت با فلاسک مخصوص به آزمایشگاه منتقل شدند. برای تهیه اسپرم، دم اپیدیدیم بیضه برش داده شد و اسپرم‌ها جمع‌آوری شدند. پس از ارزیابی اولیه، نمونه‌های اسپرم با جنبایی پیش‌رونده بالای ۷۵ درصد، زنده‌مانی بالای ۸۵ درصد و ناهنجاری کمتر از ۱۰ درصد انتخاب و با غلظت ۵۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر رقیق‌کننده رقیق شدند (Merati *et al*., 2018; Najafi *et al*., 2023). ترکیبات محلول رقیق‌کننده این آزمایش محلول بر پایه تریس- زرده تخم‌مرغ (تریس ۲/۷۱ گرم در دسی لیتر، اسید سیتریک ۱/۴ گرم در دسی‌لیتر، فروکتوز ۱ گرم در دسی‌لیتر، و زرده تخم‌مرغ ۲۰ درصد) بودند (Najafi *et al*., 2023). غلظت‌های مختلف

1- In vitro Fertilisation
2- Reactive Oxygen Species

گاما اوریزانول شامل ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیز به محلول رقیق‌کننده اضافه شدند. سپس، رقیق‌کننده‌ها در فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری در داخل آب هم‌دما (۳۷ درجه سانتی‌گراد) به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و پس از ۲ ساعت در این دما به تعادل رسیدند (Salamon & Maxwell, 2000).

ارزیابی فراسنجه‌های کیفی، ساختاری و بیوشیمیایی اسپرم

تمام پارامترهای کیفی، ساختاری و بیوشیمیایی اسپرم در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تثبیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شدند.

ارزیابی ویژگی‌های جنبایی اسپرم

ویژگی‌های جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم با استفاده از سیستم CASA[1] (Vidio Test Sperm 3.1, jepan مدل) ارزیابی شدند. برای این کار، ابتدا ۵ میکرولیتر اسپرم رقیق شده روی لام قرار گرفت و با لامل پوشش داده شد و تعداد ۲۰۰ سلول اسپرم به‌صورت کاملاً تصادفی ارزیابی شد (Safa *et al*., 2016).

ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم

برای ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم از تست محلول هیپوسمتیک (۹ گرم فروکتوز و ۴/۹ گرم سیترات سدیم در یک لیتر آب دو بار تقطیر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی‌اسمول) استفاده شد. ابتدا، ۵۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم با ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک مخلوط و به‌مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شد. برای ارزیابی این تست، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه اسپرم روی لام از پیش گرم‌شده قرار گرفت و با لامل پوشانده شد. تعداد ۲۰۰ سلول اسپرم با بزرگنمایی۴۰۰× به‌وسیله میکروسکوپ فاز کنتراست (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) شمارش شدند. اسپرم‌های با دم متورم و تاب خورده به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم در نظر گرفته شدند و اسپرم‌های با دم صاف و غیرمتورم به‌عنوان اسپرم‌های با غشای ناسالم در نظر گرفته شدند (Revell & Mrode, 1994).

ارزیابی درصد ناهنجاری‌های اسپرم

برای ارزیابی درصد ناهنجاری‌های اسپرم از محلول هانکوک (۶۲/۵ لیتر فرمالین ۳۷ درصد، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سالین، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) استفاده شد. برای این کار، مقدار ۳۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم با ۳۰۰ میکرولیتر محلول هانکوک مخلوط شد. بلافاصله ۵ میکرولیتر از این مخلوط روی لام قرار گرفت و با بزرگنمایی ۴۰۰× به وسیله میکروسکوپ (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) بررسی شد. تعداد ۲۰۰ سلول اسپرم از نظر درصد ناهنجاری‌ها (ناهنجاری‌های آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) به‌صورت کاملاً تصادفی بررسی شدند (Najafi *et al*., 2020).

ارزیابی زنده‌مانی اسپرم

ارزیابی درصد زنده‌مانی اسپرم در زمان‌های مختلف با استفاده از رنگ ائوزین–نیگروزین (۱۶/۷ گرم ائوزین، ۱۰۰ گرم نیگروزین، و ۲۹ گرم بافر سیترات در یک لیتر آب دوبار تقطیر) انجام شد. ابتدا، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه اسپرم با پنج میکرولیتر رنگ ائوزین– نیگروزین مخلوط و گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن لام، با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) با بزرگنمایی۴۰۰× تعداد ۲۰۰ سلول اسپرم به‌طور تصادفی در حداقل ۱۰ فیلد شمارش شدند. اسپرم‌هایی که رنگ به خود جذب کرده بودند مرده و اسپرم‌هایی که رنگ به خود جذب نکرده بودند زنده در نظر گرفته شدند (Evans, 1987).

ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپید

برای ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم از تست اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید[2] استفاده شد. ابتدا، غلظت ۲۵۰ میلیون اسپرم با یک میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید سرد ۲۰ درصد (w/v) مخلوط شد تا پروتئین‌ها رسوب کنند. برای مهار فرآیند لیپید پراکسیداسیون، ۱ میلی‌لیتر محلول بتا هیدروکسی تولوئن ۲ درصد (محلول در اتانول) و ۱ میلی‌لیتر محلول EDTA[3] (غلظت نهایی یک میلی‌مولار) پیش از مرحله رسوب اضافه شدند. نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. یک میلی‌لیتر از محلول رویی نمونه‌های سانتریفیوژشده با ۱ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریتیک اسید[4] ۶۷ درصد (w/v) مخلوط و به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم با ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. سپس نمونه‌ها داخل یخ سرد شدند و به دمای اتاق رسیدند. عدد جذب نمونه‌ها پس از رسیدن به دمای اتاق در طول موج ۵۳۲ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Hermle Labortechnik GmbH, Germany) به‌دست آمد و سپس غلظت مالون‌دی‌آلدئید با معادله بیر–لامبرت ($A = \varepsilon CL$) محاسبه شد (Sariözkan *et al*., 2009).

ارزیابی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)[5] طبق پروتکل کیت شرکت Navand Lab Kit- Urmia, Iran (شماره کاتالوگ: ۱۵۰۳۳) ارزیابی شد. ابتدا، محلول با غلظت یک میلیون اسپرم با ۸۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. سلول‌های ته‌نشین شده با بافر فسفات سالین (PBS)[6] خنک شستشو داده شدند و مرحله قبلی دوباره تکرار شد. در مرحله بعد، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر لیز کننده[7] به نمونه‌ها اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت یخ ورتکس شد. سپس سلول‌ها همراه بافر لیزکننده، سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت پنج دقیقه) شدند و از مایع رویی به‌عنوان نمونه استفاده شد. مطابق دستورالعمل

1- Computer Assisted Sperm Analyzer

2- Malondialdehyde
3- Ethylenediaminetetraacetic acid
4- Thiobarbituric acid
5- Superoxid Dismutase
6- Phosphate-buffered saline
7- Buffer Lysing

کیت، نمونه‌ها و معرف‌ها در چاهک شیشه‌ای اضافه و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و تاریکی، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (BioTek ELX800, USA) قرائت شد. جهت نرمال‌سازی اعداد جذب نمونه‌ها با اعداد جذب پروتئین کل از کیت اندازه‌گیری سنجش پروتئین شرکت Navand Lab Kit- Urmia, Iran (کد محصول: ۱۵۰۷۲) استفاده شد. فعالیت SOD نمونه‌ها به‌وسیله فرمول استاندارد (= SOD OD Test/ OD Control × 200) محاسبه و به‌دست آمد (Partyka *et al*., 2012). آنزیم رایج موجود در سلول‌های پستانداران و غیر پستانداران کاتالاز (CAT)[1] است و تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن را کاتالیز می‌کند و می‌تواند در هر ثانیه میلیون‌ها مولکول پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل کند. در این آزمایش، برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از کیت اندازه‌گیری CAT شرکت Navand Lab Kit-Urmia, Iran (شماره کاتالوگ: ۱۵۰۵۴) و از روش Goth (۱۹۹۱) استفاده شد. برای سنجش فعالیت این آنزیم، ابتدا مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اسپرم در ۱ میلی‌لیتر بافر لیزکننده (۶۵ مول پراکسید هیدروژن در یک میلی‌لیتر و ۶۰ میلی‌مول در لیتر پتاسیم فسفات سدیم، pH = ۷/۴) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه انکوبه شد. یک واحد CAT در این شرایط، یک مول پراکسید هیدروژن را در دقیقه تجزیه می‌کند. واکنش آنزیمی با استفاده از افزودنیک میلی‌لیتر مولیبدات آمونیوم (۳۲/۴ میلی‌مول در لیتر) خاتمه یافت و کمپلکس زرد مولیبدات و پراکسید هیدروژن در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از میکروپلیت ریدر (BioTek ELX800, USA) اندازه‌گیری شد. اعداد جذب نمونه‌ها با اعداد جذب پروتئین کل نرمال‌سازی شدند و فعالیت آنزیم کاتالاز به‌وسیله فرمول استاندارد (y = Ax + B) محاسبه شد (Goth, 1991). فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) نیز طبق دستور کیت شرکت سازنده (Navand Lab Kit- Iran) اندازه‌گیری شد. ابتدا، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های اسپرم با ۸۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، پلت سلول‌ها با مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده مخلوط و با ۹۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. در چاهک شیشه‌ای، مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول رویی نمونه‌ها با ۴۰ میکرولیتر معرف A و ۱۰ میکرولیتر معرف B مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در محیط اتاق در تاریکی انکوبه شد. عدد جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد. برای به دست آوردن میزان فعالیت GPx از فرمول استاندارد (y = Ax + B) استفاده شد (Mehdipour *et al*., 2016).

واکاوی داده‌ها

این مطالعه در چهار تیمار و شش تکرار انجام شد. نتایج حاصل به‌وسیله نرم‌افزار SAS (۹/۱) و رویه GLM واکاوی شدند و سطح معنی‌داری (P < ۰/۰۵) در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون توکی انجام شد. مدل آماری این آزمایش عبارت است از:

$$Yijk = \mu + Ti + Pj + (T \times P)ij + eijk$$

Yijk = مقادیر مشاهده‌شده پارامترها
μ = میانگین جمعیت
Ti = اثر تیمارها
Pj = اثر زمان
(T × P)ij = اثر متقابل بین تیمار و زمان
eijk = اثر عوامل ناشناخته‌ام

نتایج و بحث

نتایج اثرات افزودن گاما اوریزانول به رقیق‌کننده اسپرم قوچ بر ویژگی‌های مختلف مورد ارزیابی در جداول ۱ تا ۷ نشان داده شده‌اند. طبق نتایج این آزمایش، استفاده از غلظت ۱۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول در زمان‌های ۱۲ و ۴۸ ساعت و غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در زمان ۲۴ ساعت پس از تثبیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد جنبایی کل را بهبود بخشیدند (P <۰/۰۵). اما استفاده از غلظت‌های مختلف گاما اوریزانول در مورد ویژگی جنبایی پیش‌رونده تأثیر معنی‌داری را در هیچ یک از زمان‌های مورد بررسی نشان نداد (P > ۰/۰۵). داده‌های جدول ۲ نشان می‌دهند که رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول در زمان ۱۲ ساعت به‌طور معنی‌داری درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ را نسبت به سایر رقیق‌کننده‌ها بهبود بخشید (P < ۰/۰۵)؛ ولی در سایر زمان‌ها تفاوت معنی‌داری بین رقیق‌کننده‌ها مشاهده نشد (P > ۰/۰۵). افزودن غلظت ۱۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول توانست در زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت موجب بهبود فراسنجه یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم شود (P < ۰/۰۵)؛ اما افزودن این ترکیب آنتی‌اکسیدانی به رقیق‌کننده تأثیر معنی‌داری بر درصد ناهنجاری‌های اسپرم در طول زمان‌های مورد ارزیابی نداشت (P > ۰/۰۵). با توجه به نتایج مندرج در جدول ۵، افزودن غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول به رقیق‌کننده موجب کاهش معنی‌دار غلظت مالون‌دی‌آلدئید در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت شده بود (P < ۰/۰۵). همچنین، نتایج آزمایش حاضر نشان دادند که رقیق‌کننده دارای غلظت ۱۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول در زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی SOD و در زمان ۲۴ ساعت رقیق‌کننده با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم GPx شد (P <۰/۰۵). اما در مورد فعالیت آنزیم CAT تفاوت معنی‌داری بین رقیق‌کننده‌ها در تمام زمان‌های مورد بررسی مشاهده نشد (P > ۰/۰۵).

بر اساس مدل آماری دوعاملی، اثر زمان انکوباسیون و اثر متقابل تیمار × زمان بر اغلب فراسنجه‌های ارزیابی‌شده معنی‌دار بود (P < 0.05). بررسی اثر اصلی زمان نشان داد که با افزایش مدت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، مقادیر جنبایی کل، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم به‌طور قابل توجهی کاهش یافتند و شاخص‌های پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) افزایش پیدا کردند. اثر متقابل تیمار × زمان نیز بیانگر آن بود که پاسخ اسپرم به افزودن گاما

1- Catalase

اوریزانول در زمان‌های مختلف متفاوت بود؛ به‌طوری‌که بیشترین بهبود کیفیت اسپرم در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت مشاهده شد، در حالی‌که در زمان ۴۸ ساعت، تفاوت بین تیمارها کاهش یافت. این نتایج وابستگی اثر گاما اوریزانول را به زمان نگهداری و محدود بودن پایداری اثر حفاظتی آن در دوره‌های طولانی‌تر نشان می‌دهند.

جدول ۱- اثرات غلظت‌های مختلف گاما اوریزانول بر ویژگی درصد جنبایی کل اسپرم در زمان‌های مختلف انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

Table 1. Effects of different concentrations of gamma oryzanol on total sperm motility parameter at different incubation times at 4 °C

48	24	12	6	تیمارها/ فراسنجه‌ها Times/Treatments
31/68^{b}	51/29^{b}	56/53^{b}	62/88	Control
35/66^{ab}	56/74^{a}	59/26^{ab}	64/02	50 µmol
39/23^{a}	57/56^{a}	63/28^{a}	66/49	100 µmol
32/08^{b}	55/11^{ab}	57/26^{b}	62/44	200 µmol
3/88	4/29	3/25	2/41	SEM

* اعداد دارای بالانویس در هر ستون تفاوت معناداری دارند (P < ۰/۰۵). SEM = خطای استاندارد میانگین‌ها

*Numbers with superscripts in each column are significantly different (P < 0.05).
SEM = Standard error of the means

جدول ۲- اثرات غلظت‌های مختلف گاما اوریزانول بر ویژگی درصد جنبایی پیش‌رونده اسپرم در زمان‌های مختلف انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

Table 2. Effects of different concentrations of gamma oryzanol on the progressive sperm motility parameter at different incubation times at 4 °C

48	24	12	6	تیمارها/ فراسنجه‌ها Times /Treatments
29/71	34/83	41/78	51/17	Control
31/44	36/36	42/24	52/50	50 µmol
33/27	40/46	45/26	56/03	100 µmol
30/83	36/48	44/29	50/37	200 µmol
3/89	4/26	4/68	5/69	SEM

* اعداد دارای بالانویس در هر ستون تفاوت معناداری دارند (P < ۰/۰۵). SEM = خطای استاندارد میانگین‌ها

* Numbers with superscripts in each column are significantly different (P < 0.05).
SEM = Standard error of the means

جدول ۳- اثرات غلظت‌های مختلف گاما اوریزانول بر درصد زنده‌مانی اسپرم در زمان‌های مختلف انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

Table 3. Effects of different concentrations of gamma oryzanol on sperm viability at different incubation times at 4 °C

48	24	12	6	تیمارها/فراسنجه‌ها Times/Treatments
37/16	54/34	59/54^{b}	67/68	Control
37/43	56/41	62/74^{ab}	69/06	50 µmol
41/91	57/37	65/54^{a}	69/75	100 µmol
35/66	56/39	60/07^{b}	69/31	200 µmol
4/23	2/81	3/16	2/14	SEM

* اعداد دارای بالانویس در هر ستون تفاوت معناداری دارند (P < ۰/۰۵). SEM = خطای استاندارد میانگین‌ها

*Numbers with superscripts in each column are significantly different (P < 0.05).
SEM = Standard error of the means

جدول ۴- اثرات غلظت‌های مختلف گاما اوریزانول بر درصد یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در زمان‌های مختلف انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

Table 4. Effects of different concentrations of gamma oryzanol on sperm plasma membrane integrity at different incubation times at 4 °C

48	24	12	6	تیمارها/فراسنجه‌ها Times/Treatments
33/81	53/44	57/58^{b}	63/15^{b}	Control
35/54	56/41	60/29^{ab}	67/09^{ab}	50 µmol
39/76	57/50	64.20^{a}	69/43^{a}	100 µmol
34/81	55/65	57/27^{b}	64/26^{b}	200 µmol
5/24	4/88	3/21	2/33	SEM

* اعداد دارای بالانویس در هر ستون تفاوت معناداری دارند (P < ۰/۰۵). SEM = خطای استاندارد میانگین‌ها

* Numbers with superscripts in each column are significantly different (P < 0.05).
SEM = Standard error of the means

جدول ۵- اثرات غلظت‌های مختلف گاما اوریزانول بر درصد ناهنجاری‌های اسپرم در زمان‌های مختلف انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

Table 5. Effects of different concentrations of gamma oryzanol on the percentage of sperm abnormalities at different incubation times at 4 °C

48	24	12	6	تیمارها/فراسنجه‌ها Times/Treatments
19/17	16/38	14/27	12/33	Control
18/70	15/46	14/02	11/66	50 µmol
18/20	15/16	13/81	11/31	100 µmol
19/36	17/84	14/39	12/15	200 µmol
1/51	2/72	0/59	0/71	SEM

* اعداد دارای بالانویس در هر ستون تفاوت معناداری دارند (P < ۰/۰۵). SEM = خطای استاندارد میانگین‌ها

* Numbers with superscripts in each column are significantly different (P < 0.05).
SEM = Standard error of the means

جدول ۶- اثرات غلظت‌های مختلف گاما اوریزانول بر غلظت مالون‌دی‌آلدهید (نانومول/میلی‌لیتر) در زمان‌های مختلف انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

Table 6. Effects of different concentrations of gamma oryzanol on malondialdehyde concentrations (nmoml/ml) at different incubation times at 4 °C

48	24	12	6	تیمارها/ فراسنجه‌ها Times / Treat
6.65	6.28^{a}	5.87^{a}	4/31	Control
6.54	5.51^{b}	5.15^{b}	3/74	50 µmol
5.96	5.20^{b}	4.62^{b}	4/54	100 µmol
6.78	5.78^{ab}	$5/66^{a}$	5/13	200 µmol
0.81	0.39	0/41	0/47	SEM

* اعداد دارای بالانویس در هر ستون تفاوت معناداری دارند (P < ۰/۰۵). SEM = خطای استاندارد میانگین‌ها

* Numbers with superscripts in each column are significantly different (P < 0.05).
SEM = Standard error of the means

جدول ۷- اثرات غلظت‌های مختلف گاما اوریزانول بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اسپرم (U/mg protein) در زمان‌های مختلف انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

Tabel 7. Effects of different concentrations of gamma oryzanol on sperm antioxidant enzyme activity (U/mg protein) at different incubation times at 4 °C

48			24			12			6			تیمارها/زمان‌ها
GPx	CAT	SOD	GPx	CAT	SOD	GPx	CAT	SOD	GPx	CAT	SOD	Times/Treatments
47/26	5/83	59/82	$51/87^{b}$	6/19	$77/63^{b}$	58/11	6/77	$86/35^{c}$	61/25	7/15	99/53	Control
45/37	6/58	62/73	$49/82^{b}$	6/79	$80/72^{ab}$	56/37	7/23	$91/36^{ab}$	66/36	8/11	102/59	50 µmol
47/03	6/68	63/41	$56/31^{a}$	7/08	$84/64^{a}$	59/40	7/35	$94/86^{a}$	66/46	8/28	104/15	100 µmol
46/10	6/32	59/68	$53/51^{a}$	6/55	$75/63^{b}$	56/61	6/87	$89/63^{bc}$	65/24	7/65	102/48	200 µmol
5/67	0/86	4/96	3/58	1/25	4/61	4/69	0/44	3/57	5/81	0/87	9/11	SEM

* اعداد دارای بالانویس در هر ستون تفاوت معناداری دارند (P < ۰/۰۵). SEM = خطای استاندارد میانگین‌ها

* Numbers with superscripts in each column are significantly different (P < 0.05).
SEM = Standard error of the means

در پرورش گوسفند با توجه به مشکل ساختاری سرویکس و عدم امکان تلقیح داخل سرویکال و رحمی معمولاً تلقیح لاپاراسکوپی مرسوم است؛ از طرف دیگر، به‌دلیل حساسیت بسیار بالای غشای اسپرم قوچ، معمولاً از منی تازه و یا سرد شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده می‌شود. به‌طوری که طبق مطالعات متعدد، مشخص شده است که تلقیح مصنوعی با منی تازه و سرد شده در دمای ۸-۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت بدون کاهش معنی‌داری در میزان زنده‌مانی و جنبایی اسپرم و حتی تا ۹۶ ساعت بدون کاهش معنی‌داری در میزان باروری قابل ذخیره است. با این وجود، با کاهش دما از ۳۷ به ۵ درجه سانتی‌گراد باز هم شوک سرمایی به‌وجود می‌آید و کیفیت اسپرم را تا حدودی کاهش می‌دهد (Amini *et al*., 2019). از طرف دیگر، از این روش نمی‌توان برای فواصل دور استفاده کرد و محدود به درون-گله‌ای می‌شود. بنابر این، مزیت اسپرم منجمد در این روش نخواهد بود و اسپرم را فقط تا چند روز می‌توان نگهداری کرد (Partyka *et al*., 2023). شایع‌ترین مشکل طی فرآیند سرد شدن مایع منی، آسیب به غشای اسپرم در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از بروز تنش اکسیداتیو است. اسپرم به‌راحتی در معرض تولید بیش از حد ROS ناشی از فرآیند تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد که می‌تواند جنبایی اسپرم را کاهش دهد و توان باروری آن را مختل کند (Sikka, 1996). بنابر این، سرد کردن منی یک ابزار کارآمد و موفق برای ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت به‌شمار می‌رود، اما این روش نیز اثرات منفی سردسازی نیز مانند کاهش میزان زنده‌مانی، سلامت ساختاری، جنبایی و میزان باروری را با خود به‌همراه دارد (Medeiros *et al*., 2002).

در مطالعات متعددی، اهمیت افزودن ترکیب آنتی‌اکسیدانی به رقیق‌کننده بیش از پیش مشخص شده است و امروزه یکی از ترکیبات ثابت در رقیق‌کننده هم برای سردسازی و هم انجماد محسوب می‌شود. در آزمایش حاضر، اثرات مثبت گاما اوریزانول در زمان‌های اولیه مشهود بود اما در زمان‌های بیشتر تقریباً اثرگذاری خود را از دست داده بود. افزودن ترکیب گاما اوریزانول به رقیق‌کننده در کوتاه‌مدت (زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت) موجب افزایش زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم شد که بهترین عملکرد مربوط به رقیق‌کننده دارای ۱۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول بود. تأثیرگذاری این ترکیب در رقیق‌کننده در زمان ۴۸ ساعت پس از تثبیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در اغلب فراسنجه‌های ارزیابی شده مشهود نبود. به نظر می‌رسد که دلیل این موضوع مربوط به

متابولیسم سریع، حلالیت پایین در محلول‌های آبی و جذب پایین غشایی گاما اوریزانول در محیط‌های اسیدی و حتی خنثی باشد که در برخی مطالعات نیز گزارش شده است (Rodsuwan *et al*., 2021).

اثرات مثبت گاما اوریزانول می‌تواند مربوط به پاکسازی رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش میزان تنش اکسیداتیو باشد. از طرف دیگر، در این آزمایش مشاهده شد که افزودن غلظت ۱۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول در زمان‌های اولیه موجب کاهش معنی‌دار غلظت مالون‌دی‌آلدئید شد که در راستای نتایج مربوط به بهبود کیفیت اسپرم در زمان‌های اولیه است. از طرف دیگر، مشاهده شد که همین غلظت در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و GPx شد که این نتیجه می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیب را نشان دهد. چرا که مشخص شده است این ترکیب با دخالت مستقیم در مسیر Nrf-2 و بیان پروتئین‌های دخیل در تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در کاهش احتمال بروز تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند. همچنین، به‌دلیل وجود گروه هیدروکسیل روی حلقه فنولیک، قسمت فرولیک اسید می‌تواند به‌طور مستقیم انواع رادیکال‌های آزاد را خنثی و پاکسازی کند (Kensler *et al*., 2007). حداقل نه فیتوستریل فرولات گاما-اوریزانول مانند کامپستریل، کامپستانیل، سیکلوآرتنیل، ۲۴- متیلن سیکلوآرتانیل، سیتوستانیل، سیتوستریل، استیگماستریل، Δ^{7} - کامپستنیل، و Δ^{7}- سیتوستنیل مشخص شده‌اند. در این میان، کامپستریل، سیکلوآرتنیل، ۲۴- متیلن سیکلوآرتانیل و سیتوستریل فرولات‌ها هستند که ۸۰٪ تا ۹۵٪ از گاما- اوریزانول را بر اساس ارقام و واریته‌های برنج تشکیل می‌دهند (Miller & Engel, 2006).

در مطالعه‌ای، مشخص شد که کیفیت اسپرم خوک با افزودن روغن سبوس برنج غنی از گاما اوریزانول به رقیق‌کننده پس از فرآیند انجماد به‌طور معنی‌داری بهبود پیدا کرد. در این مطالعه، برای نگهداری منی خوک در رقیق‌کننده بر پایه لاکتوز-زرده تخم‌مرغ، غلظت بهینه گاما اوریزانول (۰/۱۶ میلی‌مول) موجب بهبود پارامترهای جنبایی، پکپارچگی غشای پلاسمایی و آکروزومی اسپرم خوک بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی شد. همچنین، آنها نشان دادند که گاما اوریزانول، به‌ویژه به‌دلیل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و مهارکننده آن، توانست به عنوان یک آنتی‌اکسیدان و مهارکننده پراکسیداسیون لیپیدی (یعنی تثبیت‌کننده غشاء) طی انجماد برای حفظ کیفیت اسپرم خوک مفید باشد (Kaeoket *et al*., 2012). در یک مطالعه مشابه دیگر، افزودن ۶۰ و ۸۰ میکرومول گاما اوریزانول به رقیق‌کننده حاوی اسپرم منجمد توانست جنبایی کل و پیش‌رونده، یکپارچگی غشای پلاسمایی، و فعالیت غشای میتوکندری سلول اسپرم خروس را افزایش دهد و از طرف دیگر، همین غلظت‌ها موجب کاهش درصد آپوپتوز، مقدار ROS و درصد ناهنجاری‌های اسپرم خروس شد. در مطالعه ذکر شده، مشخص شد که استفاده از غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میکرومول گاما اوریزانول توانست به‌طور معنی‌داری قابلیت جوجه‌کشی تخم‌مرغ‌ها را افزایش دهد (Najafi *et al*., 2022). مشخص شده است که جنبایی پیش‌رونده اسپرم گاومیش بعد از انجماد با افزودن غلظت ۰/۵ میلی‌مولار گاما اوریزانول بهبود پیدا کرد ولی بر سایر پارامترهای مورد ارزیابی تأثیر معنی‌داری نداشت (Inyawilert *et al*., 2022). با توجه به این که روش کار در آزمایشات اشاره شده با آزمایش حاضر متفاوت بود، از این‌رو امکان مقایسه وجود ندارد. اما تقریباً نتایج مثبتی از به‌کارگیری این ترکیب در رقیق‌کننده اسپرم حاصل شده‌اند. در مطالعه حاضر، بین فراسنجه یکپارچگی غشای پلاسمایی و غلظت مالون‌دی‌آلدئید همخوانی مشاهده شد که به‌نظر می‌رسد گاما اوریزانول با کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدئید موجب حفظ ساختار و یکپارچگی غشای اسپرم قوچ شد. از طرف دیگر، فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx نیز در زمان‌های اولیه افزایش یافت که نشان‌دهنده تقویت توان آنتی‌اکسیدانی و مقابله با تنش اکسیداتیو است. البته، با توجه به معنی‌داری اثر متقابل تیمار × زمان، می‌توان نتیجه گرفت که کارایی گاما اوریزانول در حفاظت از اسپرم به زمان وابسته است. در ساعات اولیه نگهداری (۱۲ تا ۲۴ ساعت)، افزودن این ترکیب باعث بهبود قابل ملاحظه فراسنجه‌های حرکتی و بیوشیمیایی اسپرم شد، اما در زمان‌های طولانی‌تر اثر حفاظتی آن کاهش یافت. این موضوع احتمالاً به نیمه‌عمر کوتاه گاما اوریزانول در محیط‌های آبی و کاهش پایداری آن در دمای پایین مرتبط است. در یک مطالعه مشابه، به کارگیری ترکیب آنتی‌اکسیدانی دیگر مانند کورکومین در رقیق کننده اسپرم قوچ که ماهیت یکسانی از نظر ضریب حلالیت و سرعت متابولیسم دارد دارای نتایج مشابه مطالعه حاضر است که برای مقابله با این مشکلات از فناوری نانولیپوزوم استفاده و نتایج مثبتی نیز گزارش شده است (Farhadi *et al*., 2024). به‌نظر می‌رسد که در مطالعات آینده، افزودن شکل نانوذرات گاما اوریزانول به رقیق کننده اسپرم می‌تواند نتایج خوبی در راستای حفظ بیشتر کیفیت اسپرم طی فرآیند سردسازی و انجماد اسپرم داشته باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان می‌دهند که افزودن ترکیب آنتی‌اکسیدانی گاما اوریزانول می‌تواند در سردسازی کوتاه‌مدت اسپرم قوچ مفید باشد و از کیفیت اسپرم محافظت کند. به‌دلیل متابولیسم سریع، ضریب حلالیت پایین در محلول‌های آبی و نیمه‌عمر پایین، این ترکیب برای سردسازی بلندمدت اسپرم قوچ مفید نیست. بنابر این، استفاده از روش‌های نانوحامل می‌تواند بر این مشکل غلبه کرده، اثرگذاری این ماده را بیشتر و طولانی‌تر کند. از این‌رو، استفاده از غلظت ۱۰۰ میکرومولار گاما اوریزانول برای سردسازی کوتاه‌مدت اسپرم قوچ (کمتر از ۲۴ ساعت) توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از زحمات پرسنل محترم مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و گروه علوم دام و طیور پردیس کشاورزی ابوریحان دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Amini, S., Masoumi, R., Rostami, B., Shahir, M. H., Taghilou, P., & Arslan, H. O. (2019). Effects of supplementation of Tris-egg yolk extender with royal jelly on chilled and frozen-thawed ram semen characteristics. *Cryobiology,* 88, 75-80.

Chatterjee, S., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 60(4), 498-506.

Clulow, J., Mansfield, L., Morris, L., Evans, G., & Maxwell, W. (2008). A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science,* 108(3-4), 298-308.

Daghigh Kia, H., Farhadi, R., Ashrafi, I., & Mehdipour, M. (2016). Anti-oxidative effects of ethanol extract of Origanum vulgare on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved Holstein bull spermatozoa. *Iranian Journal of Applied Animal Science,* 6(4), 783-789.

Evans, G. (1987). Handling and examination of semen. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*, 93-106.

Farhadi, R., Farshad, A., Rostamzadeh, J., & Najafi, A. (2024). The effects of adding different levels of curcumin to the diluent on the epididymal sperm quality of Shal rams during storage at 5°C. *Journal of Animal Production*, 26(2), 207-217.

Goth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196(2-3), 143-151.

Huang, L., Jiang, W., Zhu, L., Ma, C., Ou, Z., Luo, C., Wu, J., Wen, L., Tan, Z., & Yi, J. (2020). γ-Oryzanol suppresses cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species-mediated mitochondrial signaling pathway in H_2O_2-stimulated L02 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy,* 121, 109-115.

Ikeda, M., Kodama, H., Fukuda, J., Shimizu, Y., Murata, M., Kumagai, J., & Tanaka, T. (1999). Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biology of Reproduction,* 61(2), 393-399.

Inyawilert, W., Rungruangsak, J., Liao, Y.-J., Wirojwutthikul, S., Phinyo, M., Tang, P.-C., Wanangkarn, A., & Tiantong, A. (2022). Gamma-oryzanol supplemented in extender enhances the quality of semen cryopreservation and alters proteomic profile in Thai swamp buffalo. *Cryobiology*, 107, 35-41.

Kaeoket, K., Donto, S., Nualnoy, P., Noiphinit, J., & Chanapiwat, P. (2012). Effect of gamma-oryzanol-enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(9), 1149-1153.

Kameni, S. L., Meutchieye, F., & Ngoula, F. (2021). Liquid storage of ram semen: associated damages and improvement. *Open Journal of Animal Sciences,* 11(3), 473-500.

Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 47*(1), 89-116.

Macedo, S., Bliebernicht, M., Carvalheira, J., Costa, A., Ribeiro, F., & Rocha, A. (2018). Effects of two freezing methods and two cryopreservation media on post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals,* 53(2), 519-524.

Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology,* 57(1), 327-344.

Mehdipour, M., Kia, H. D., Najafi, A., Dodaran, H. V., & García-Álvarez, O. (2016). Effect of green tea (Camellia sinensis) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, 73(3), 297-303.

Mehdipour, M., Daghigh-Kia, H., Najafi, A., Mehdipour, Z., & Mohammadi, H. (2022). Protective effect of rosiglitazone on microscopic and oxidative stress parameters of ram sperm after freeze-thawing. *Scientific Reports,* 12(1), 13981.

Merati, Z., Farshad, A., Farzinpour, A., Rostamzadeh, J., & Sharafi, M. (2018). Anti-apoptotic effects of minocycline on ram epididymal spermatozoa exposed to oxidative stress. *Theriogenology,* 114, 266-272.

Miller, A., and Engel, K.-H. (2006). Content of γ-oryzanol and composition of steryl ferulates in brown rice (Oryza sativa L.) of European origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8127-8133.

Najafi, A., Kia, H. D., Mehdipour, M., Hamishehkar, H., & Álvarez-Rodríguez, M. (2020). Effect of quercetin loaded liposomes or nanostructured lipid carrier (NLC) on post-thawed sperm quality and fertility of rooster sperm. *Theriogenology,* 152, 122-128.

Najafi, A., Mohammadi, H., & Sharifi, S. D. (2023). Enhancing post-thaw quality of ram epididymal sperm by supplementation of rutin in cryopreservation extender. *Scientific Reports,* 13(1), 10873.

Partyka, A., Łukaszewicz, E., & Niżański, W. (2012). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in avian semen. *Animal Reproduction Science*, 134(3-4), 184-190.

Partyka, A., Babapour, A., Mikita, M., Adeniran, S., & Niżański, W. (2023). Lipid peroxidation in avian semen. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 497–509.

Revell, S., and R. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2),77-86.

Rodsuwan, U., Pithanthanakul, U., Thisayakorn, K., Uttapap, D., Boonpisuttinant, K., Vatanyoopaisarn, S., Thumthanaruk, B., & Rungsardthong, V. (2021). Preparation and characterization of gamma oryzanol loaded zein nanoparticles and its improved stability. *Food Science & Nutrition*, 9(2), 616-624.

Ruane, J. (2000). A framework for prioritizing domestic animal breeds for conservation purposes at the national level: a Norwegian case study. *Conservation Biology,* 14(5), 1385-1393.

Rungratanawanich, W., Abate, G., & Uberti, D. (2020). Pharmacological profile of γ-oryzanol: Its antioxidant mechanisms and its effects in age-related diseases. *In Aging*, 201-208.

Safa, S., Moghaddam, G., Jozani, R. J., Kia, H. D., & Janmohammadi, H. (2016). Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. *Animal Reproduction Science,* 174, 100-106.

Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science,* 62(1-3), 77-111.

Sariözkan, S., Tuncer, P. B., Bucak, M. N., & Ulutaş, P. A. (2009). Influence of various antioxidants on microscopic-oxidative stress indicators and fertilizing ability of frozen-thawed bull semen. *Acta Veterinaria Brno*, 78(3), 463-469.

Sikka, S. C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library,* 1, 78-86.

Xu, Z., Hua, N., & Godber, J. S. (2001). Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2- azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 49(4), 2077-2081.