دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

تأثیر مکمل‌سازی رقیق‌کننده با سطوح مختلف ال-کارنیتین بر کیفیت منی قوچ قزل بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی در خارج فصل تولیدمثلی

سپهر جعفری[۱]، حسین دقیق‌کیا[۲]، غلامعلی مقدم[۳] و مرضیه ابراهیمی[۴]

۱، ۳ و ۴- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، استاد و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، (نویسنده مسوول: daghighkia@tabrizu.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱/۲۲

چکیده

این تحقیق باهدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی سطوح مختلف ال-کارنیتین بر فراسنجه‌های اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد-یخ گشایی انجام شد. نمونه‌های منی قوچ پس از جمع‌آوری، با رقیق‌کننده تریس-لسیتین به همراه غلظت‌های مختلف ۳۵، ۷۰، ۱۰۵ میلی‌مولار در میلی‌لیتر ال-کارنیتین رقیق‌شده و تا ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت سرد شده و سپس در معرض بخار ازت منجمد کرده و درنهایت در تانک ازت مایع ذخیره شدند. پس از یخ‌گشایی صفات حرکتی، زنده‌مانی، مورفولوژی، یکپارچگی غشاء و مقدار مالون‌دی آلدئید مورد ارزیابی قرار گرفتند. بیشترین میزان تحرک کل و حرکت پیش‌رونده، در محیط حاوی ۱۰۵ میلی‌مولار در میلی‌لیتر ال-کارنیتین مشاهده شد ولی نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. افزودن ال-کارنیتین باعث افزایش یکپارچگی غشاء و کاهش معنی‌دار درصد اسپرم‌های غیرطبیعی نسبت به گروه شاهد نشد. همچنین افزودن ۱۰۵ میلی‌مولار در میلی‌لیتر از ال-کارنیتین باعث افزایش معنی‌دار درصد زنده‌مانی و کاهش معنی‌دار میزان مالون‌دی آلدئید تولیدی اسپرم‌ها نسبت به گروه ۳۵ میلی‌مولار شد (p<۰/۰۵). به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از ال-کارنیتین در رقیق‌کننده منی قوچ قزل سبب بهبود برخی فراسنجه‌های اسپرم و کاهش اثرات منفی ناشی از فرآیند انجماد-یخ گشایی نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: ال-کارنیتین، انجماد-یخگشایی، اسپرم، قوچ

مقدمه

انجماد منی پستانداران، تحول مهمی در نگهداری منی و حفاظت از سلول اسپرم بوده و راهی برای حفظ پروتوپلاسم سلول جنسی می‌باشد (۱۶). اسپرم‌های منجمد، برای تلقیح مصنوعی باید از کیفیت بالایی برخوردار باشند؛ این سلول‌ها تنفس هوازی داشته و مواد و آنزیم‌های لازم برای واکنش‌های اکسیداتیو را دارا می‌باشند اما درصد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در اسپرم نسبتاً پایین بوده و در نتیجه این سلول‌ها مستعد واکنش‌های اکسیداتیو می‌باشند (۸). طی فرآیند انجماد؛ اسپرم در معرض تنش‌های مختلفی از قبیل شوک سرمایی، تنش اسمزی و تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد که موجب تغییر در عملکرد اسپرم بعد از یخ گشایی می‌شوند (۱۲). طی انجماد، میزان اکسیداسیون غشاء به واسطه درصد بیشتر واکنش‌های اکسیداتیو افزایش می‌یابد که این امر در نهایت عمر اسپرم را کاهش می‌دهد (۱۹). تحقیقات نشان می‌دهد که به دلیل عملکرد نامناسب غشای اسپرم میزان لقاح پس از فرآیند انجماد آن به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (۱۶). محافظت از غشای پلاسمایی اسپرم در مقابل واکنش‌های اکسیداتیو طی فرآیند انجماد توسط آنتی‌اکسیدان‌ها انجام می‌شود. در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش تشکیل رادیکال‌های آزاد، اکسیژن محیط سلولی را طوری تغییر می‌دهند که باعث حفظ تحرک اسپرم شوند (۱۱). وقتی اسپرم طی فرآیند انجماد در معرض آسیب قرار گیرد شرایط برای تولید رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد و از طرف دیگر کمبود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در منی رقیق‌شده شرایط را آسیب‌پذیرتر می‌کند. بنابراین برای برگشت شرایط منی به حالت اولیه، اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها در فرآیند انجماد منی ضروری به نظر می‌رسد (۱۳). در اسپرم هر گونه عدم تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌ها موجب بروز فرآیند تنش اکسیداتیو در سلول می‌گردد. وظیفه آنتی‌اکسیدان‌ها جمع‌آوری، خنثی‌سازی و یا حذف رادیکال‌های آزاد موجود در درون اسپرم و نیز محیط خارج از آن یعنی پلاسمای منی است (۲۲).

کارنیتین (β هیدروکس γ-تری متیل آمنیوم-بوتیرات) انتشار وسیعی در بدن دارد. ال-کارنیتین تنها ایزومر کارنیتین است که از نظر بیولوژیکی فعال است. ال-کارنیتین یک ماده شبه ویتامین است که در سلول‌ها و بافت‌های بدن یافت می‌شود. ال-کارنیتین برای انتقال اسیدهای چرب زنجیر بلند از دیواره سیتوزول به داخل میتوکندری مورد نیاز است و در نتیجه برای فعالیت پالمیتوئیل ترانسفراز I (CPTI) ضروری است (۶).

ال-کارنیتین با تأمین انرژی مورد نیاز اسپرم، تأثیر مثبت بر روند تحرک و بلوغ اسپرم، نقش اساسی در متابولیسم اسپرم ایفا می‌کند. ال-کارنیتین با فراهم کردن یک سیستم عبوری برای اسیدهای چرب آزاد و مشتقات اسیل کوآنزیم آ در میتوکندری نقش کلیدی در بتااکسیداسیون اسیدهای چرب بلند زنجیر و در نهایت تعادل انرژی ایفاء می‌کند (۱۵). ال-کارنیتین وظایف دیگری، مثل اصلاح نسبت استیل کوآ به کوآ، انتقال اسیدهای چرب زنجیر کوتاه و متوسط از غشای بیرونی میتوکندری، تنظیم سرعت جریان چرخه‌های وابسته با اسید چرب و گلوکز و متابولیسم نیتروژن دارد (۱۸).

اکثر مطالعات در زمینه ال-کارنیتین استفاده از آن به صورت مکمل غذایی بوده است. بر اساس اطلاعات ما، تاکنون گزارشی در رابطه با تأثیر ال-کارنیتین بر فراسنجه‌های بعد از یخ‌گشایی اسپرم قوچ ارائه نشده است. هدف از انجام این آزمایش، بررسی تأثیر سطوح مختلف ال-کارنیتین روی

فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشا، مورفولوژی اسپرم و میزان مالون‌دی‌آلدئید پس از یخ‌گشایی اسپرم قوچ قزل در خارج از فصل تولیدمثل بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشگاه تبریز انجام گرفت. رقیق‌کننده استفاده شده در این پژوهش رقیق‌کننده لسیتین بود و ال-کارنیتین از شرکت مرک آلمان خریداری شد. نمونه‌های منی به‌وسیله واژن مصنوعی از ۵ رأس قوچ قزل بالغ و سالم در فصل غیر تولیدمثل جمع‌آوری شدند. اسپرم‌گیری هفته‌ای دو بار انجام گرفت. به‌منظور حذف اثرات فردی دام‌ها با یکدیگر، نمونه‌های منی استحصالی پس از ارزیابی اولیه در صورت دارا بودن کیفیت مناسب باهم مخلوط شده و سپس توسط رقیق‌کننده‌های تریس-لسیتین رقیق شدند. قبل از افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها خصوصیات کمی و کیفی نمونه‌های منی تازه از قبیل حجم منی، غلظت، حرکت پیش‌رونده، اسپرم‌های با شکل غیر نرمال ارزیابی شدند. در این پژوهش پنج تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد.

روش انجماد و ذوب اسپرم

تیمارهای آزمایشی حاوی ۳ سطح (۳۵، ۷۰، ۱۰۵ میلی‌مولار در میلی‌لیتر) ال-کارنیتین و تیمار کنترل که فاقد هر گونه آنتی‌اکسیدان افزودنی بود، مورد استفاده قرار گرفتند. پس از افزودن رقیق‌کننده (تریس، اسید سیتریک، فروکتوز، گلیسرول و محلول آنتی‌اکسیدانی) به مایع منی، نمونه‌های منی به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس به مدت ۷ دقیقه در ارتفاع ۵ سانتی‌متری بالای بخار ازت قرار گرفتند و در آخر به داخل ازت مایع منتقل‌شده و در آن ذخیره گردیدند. برای ذوب منی، پس از بیرون آوردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، پایوت‌ها ۳۰ ثانیه در آب ۳۷ درج سانتی‌گراد قرار گرفتند.

تحرک اسپرم

پس از انجماد-یخ‌گشایی پارامترهای تحرک کل[1]، تحرک پیش‌رونده[2]، سرعت در مسیر منحنی[3]، سرعت در مسیر مستقیم[4]، سرعت در مسیر میانگین[5]، خطی بودن جنبانی[6]، حداکثر دامنه حرکات جانبی سر اسپرم[7]، معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم[8]، بسامد حرکات جانبی سر[9] مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این کار پایوت‌ها از هر گروه تیماری با روشی که در بالا توضیح داده شد ذوب شده و به داخل میکروتیوپ انتقال داده شدند و سپس با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست و با کمک نرم‌افزار CASA مورد بررسی قرار گرفتند. از هر نمونه حداقل ۱۰ فیلد به‌طور کاملاً تصادفی انتخاب شده و پارامترهای تحرک ۲۰۰ اسپرم به‌وسیله سیستم CASA مورد مطالعه قرار گرفتند.

زنده‌مانی

زنده‌مانی اسپرم‌ها با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین موردبررسی قرار گرفت. برای این کار مقداری از نمونه منی با سمپلر برداشته و روی یک لام گذاشته شد و ائوزین-نیگروزین به آن افزوده بعد از چند ثانیه به کمک لام دیگری گسترش تهیه شد. اسپرم‌های رنگ‌آمیزی شده در ۵ ناحیه با بزرگنمایی ×۴۰۰ با میکروسکوپ بررسی شدند. اسپرم‌های مرده به علت تغییر در ساختار غشاء رنگ را به خود جذب کرده و اسپرم‌های زنده مانع ورود رنگ به درون غشاء شده و رنگ نمی‌گیرند بطوریکه اسپرم‌های زنده دارای سرسفید و سر اسپرم‌های مرده به‌طور کامل یا کمی رنگ گرفته است.

ارزیابی یکپارچگی غشاء پلاسمایی

از تست هیپواسمتیک (HOST)[10] برای ارزیابی سلامت غشاء اسپرم پس از انجماد-ذوب استفاده شد. زمانی که اسپرم در محیط هایپوتونیک قرار می‌گیرد، اگر از لحاظ بیولوژیک سالم باشد با جذب آب-حجمش زیاد می‌شود تا تعادل اسمزی بین مایع درون و برون سلولی اسپرم برقرار شود. به این منظور غشایی که اطراف دم را فراگرفته متورم می‌شود و دم دچار پیچ‌خوردگی می‌شود. دم در اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالم ندارند، پیچ نمی‌خورد. اسپرم‌هایی که به این تست پاسخ مثبت می‌دهند زنده هستند. انجام تست با مخلوط کردن ۳۰ میکرولیتر از مایع منی رقیق‌شده (۲۰×۱۰^{۶} اسپرم/میلی‌لیتر) با ۳۰۰ میکرولیتر محلول هایپواسموتیک ۱۰۰ mOsm/kg انجام شد. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس قطره کوچکی از نمونه مخلوط شده، روی لام از پیش هم دما شده قرار داده و با لامل پوشانده شد و بلافاصله زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت (۴۰۰× بزرگنمایی). در نهایت، ۲۰۰ اسپرم با دم متورم و غیر متورم ثبت شد. اسپرم‌های با دم متورم و گره خورده به عنوان اسپرم‌های با غشاء پلاسمایی سالم در نظر گرفته شدند.

ارزیابی مورفولوژی اسپرم (تست هانکوک)

برای ارزیابی مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم‌ها، ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه ذوب شده به میکروتیوب‌های حاوی ۱۵۰ میکرولیتر محلول هانکوک که شامل فرمالین ۳۷ درصد (۶۲/۵ میلی‌لیتر)، محلول سالین (۱۵۰ میلی‌لیتر)، محلول بافر فسفات (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دو بار تقطیر (۵۰۰ میلی‌لیتر) بود، افزوده شد و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفت و وسط یک لامل پوشانده شد و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰× درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه گردید.

مالون دی آلدئید

برای بررسی غلظت مالون دی آلدئید از اسید تیوباربیتوریک استفاده شد. بدین منظور ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه منی با ۱ میلی‌لیتر EDTA و ۱ میلی‌لیتر BHT و ۲ میلی‌لیتر TCA مخلوط شده و در لوله مخروطی ریخته شدند. لوله‌ها در ۱۲۰۰×g برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ شدن، ۱ میلی‌لیتر از محلول بالای لوله با ۱ میلی‌لیتر TBA در میکروتیوب آمیخته شدند. لوله‌ها ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند. میزان جذب نوری نمونه‌های مختلف در طول موج ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتری مورد سنجش قرار گرفته و در پایان غلظت مالون دی آلدئید محاسبه شد.

1- Total Motility (TM)
2- Progressive Motility (PM)
3- Curvilinear velocity (micron/sec) (VCL)
4- Straight – line velocity (micron/sec) (VSL)
5- Average path velocity (micron/sec) (VAP)
6- Linearity (%) (LIN= VSL/VCL×100)
7- Lateral head displacement (micron) (ALH)
8- Straightness (%) (STR=VSL/VAP ×100)
9- Beat cross frequency (BCF)
10- Hypo-Osmotic Swelling Test

این مطالعه در ۵ تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی به کمک نرم‌افزار SAS رویه GLM تجزیه و تحلیل شده و مقایسه میانگین‌ها به روش توکی انجام گرفت. مدل آماری این طرح عبارت است از:

$$Y_{ij} = \mu + Treat_i + e_{ij}$$

در این مدل، Y_{ij} برابر است با داده مشاهده شده برای فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده، μ: میانگین جامعه، $Treat_i$: اثر تیمار i ام برابر است با اثر تیمار، و e_{ij}: اثر باقیمانده یا خطا بود.

نتایج و بحث

غشاء پلاسمایی اسپرم قوچ بدلیل دارا بودن مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع با پیوند دوگانه نسبت به آسیب‌های ایجاد شده توسط پر اکسیداسیون لیپید بسیار حساس است (۹). میزان لقاح پس از فرآیند انجماد اسپرم به‌واسطه عملکرد نامناسب غشاء آن کاهش می‌یابد (۳). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که محافظت از غشای پلاسمایی اسپرم در مقابل واکنش‌های اکسیداتیو طی حفاظت انجمادی توسط آنتی‌اکسیدان‌ها انجام می‌شود، در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش تشکیل رادیکال آزاد اکسیژن شرایط سلولی را طوری تغییر می‌دهند که تحرک اسپرم حفظ شود (۴). ال-کارنیتین نیز یک مولکول ناقل است که انتقال اسیدهای چرب با زنجیره بلند را از خلال غشاء داخلی میتوکندری بر عهده دارد. این مولکول جهت متابولیسم انرژی در پستانداران موردنیاز است. کارنیتین و استیل ال کارنیتین در اپیدیدیم وجود دارند و در حرکت اسپرم و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان نقش ثابت شده‌ای دارند (۱).

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن است که نمونه‌های منی دریافت‌کننده ال-کارنیتین تفاوت معنی‌داری در میزان حرکت کل و حرکت پیش‌رونده را نسبت به گروه شاهد نداشتند ($p<۰/۰۵$). این نتایج مغایر با پژوهشی بود که در آن افزودن ال-کارنیتین در طول انجماد منی انسان باعث افزایش قابل‌توجهی در تحرک اسپرم شد (۲).

در پژوهش دیگری که روی اسپرم انسان انجام گرفت، مشاهده شد که اضافه کردن ۱۰ میلی‌مولار بر میلی‌لیتر ال-کارنیتین باعث افزایش تحرک اسپرم شد اما بر مورفولوژی آن اثری نداشت (۱۵).

جدول ۱- مقایسه میانگین‌های پارامترهای جنبایی اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد-یخ گشایی در سطوح مختلف ال-کارنیتین

Table 1. Comparison of ram sperm motility parameters after the process of freezing / thawing at different levels of L- Carnitine

پارامترها	TM (%)	PM (%)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	VAP (µm/s)	STR (%)	ALH (µm)	LIN (%)	BCF (Hz)
شاهد	۳۹/۰^{ab}	۲۸/۰	۲۰/۵	۶۲/۹	۳۳/۶	۶۲/۵	۰/۹۵	۳۷/۲	۱۷/۶
۳۵	۳۷/۰^{b}	۲۶/۲	۱۹/۸	۵۹/۸	۳۰/۳	۶۷/۲	۱/۷۰	۳۳/۰	۱۶/۲
۷۰	۴۳/۰^{ab}	۳۳/۲	۱۲/۲	۷۳/۰	۳۳/۱	۶۳/۵	۰/۹۱	۳۲/۷	۱۶/۲
۱۰۵	۴۴/۵^{a}	۳۳/۵	۱۵/۳	۶۴/۳	۴۲/۴	۶۳/۰	۱/۵۰	۳۵/۰	۱۷/۰
SEM	۱/۶۵	۱/۹۶	۲/۲۹	۹/۴۹	۵/۱۶	۲/۳۵	۰/۲۱	۲/۸۳	۰/۷۶

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p<۰/۰۵$).

Total Motility (TM); Progressive Motility (PM); Straight line velocity (VSL); Curvilinear velocity (VCL); Average path velocity (VAP); Straightness (STR=VSL/VAP ×100); Lateral head displacement (LAH); Linearity (LIN= VSL/VCL×100); Beat cross frequency (BCF)

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف ال-کارنیتین بر زنده‌مانی، مورفولوژی، یکپارچگی غشا و میزان مالون دی آلدهید پس از فرآیند انجماد-یخ گشایی

Table 2. Effects of different levels of L-Carnitine on Viability, Morphology, Plasma membrane integrity and MDA after the process of freezing / thawing

پارامترها	Viability (%)	Morphology (%)	Plasma membrane integrity (%)	MDA (nM/ml)
شاهد	۵۳/۷^{ab}	۳۱/۵	۳۷/۵	۲/۰^{a}
۳۵	۴۷/۲^{b}	۳۷/۵	۳۶/۵	۱/۹^{a}
۷۰	۵۱/۷^{ab}	۲۸/۵	۴۰/۰	۱/۷^{ab}
۱۰۵	۵۹/۵^{a}	۲۴/۵	۴۸/۲	۱/۱^{b}
SEM	۲/۷۵	۳/۴۸	۲/۸۳	۰/۱۵

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p<۰/۰۵$).

ال-کارنیتین کوفاکتور ضروری بوده که توانایی سرعت بخشیدن به سوخت‌وساز چربی را داشته و یک نقش محوری در بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره بلند برای تولید انرژی سلولی میتوکندری دارد. کارنیتین آزاد در سطح اپیدیدیم نسبت به خون بیشتر است. کارنیتین همچنین برای از بین بردن مواد سمی داخل سلولی تولید شده و محافظت اسپرم از تنش اکسیداتیو نقش داشته باشد (۲۵). وظیفه اصلی کارنیتین در اپیدیدیم به ارائه انرژی برای اسپرم است. کارنیتین به‌طور مستقیم به حرکت و بلوغ موفق اسپرم کمک می‌کند. این امر به‌ویژه از آنجا که اسپرم از اسید چرب برای اکسیداسیون به‌عنوان منبع اصلی انرژی استفاده می‌کند، مهم می‌باشد (۱۰). نتایج بررسی‌های دیگر نشان دهنده بهبود خصوصیات اسپرم و کاهش آسیب‌های وارده به آن درنتیجه استفاده از ال-کارنیتین بود (۱۴،۲۴).

ال-کارنیتین سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز می‌شود که به واسطه داشتن خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، تعداد رادیکال‌های آزاد جهت شروع پراکسیداسیون لیپید را کاهش می‌دهد. انواع اکسیژن‌های

فعال باعث تغییر در میتوکندری سلول اسپرم می‌شوند. تغییر در عملکرد میتوکندری باعث تغییر در تحرک اسپرم می‌شود (۲۰).

عامل دیگری که ممکن است در تحرک اسپرم نقش داشته باشد فسفوریلاسیون پروتئین‌های آکسونم است که برای جابجایی اسپرم ضروری است. ROSها از توانایی‌های لازم جهت جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های مؤثر در فرآیند فسفوریلاسیون اکسیداتیو، گلیکولیز و دیگر مسیرهای تولید ATP برای تولید اسپرم برخوردار می‌باشند. استفاده از ال-کارنیتین می‌تواند سبب خنثی شدن اثر بر این آنزیم‌ها شده و از این طریق از کاهش تحرک اسپرم جلوگیری کند (۲۳).

با توجه به جدول بالا اثر ال-کارنیتین بر فراسنجه‌های کاسا معنی‌دار نبود، نتایج حاکی از آن است که افزودن ال-کارنیتین باعث کاهش معنی‌دار مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم‌ها نشد ($p>۰/۰۵$). نتایج ما با نتایج مطالعه‌ای که در آن افزودن دو سطح ۲/۵ و ۷/۵ میلی مولار ال-کارنیتین تأثیر مطلوبی در کاهش معنی‌دار درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم نسبت به گروه شاهد داشت، مطابقت ندارد (۴). همچنین در یک بررسی دیگر به‌کارگیری سه سطح ۲/۵ و ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کارنیتین در مکمل غذایی بزها باعث کاهش معنی‌دار میزان مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم‌ها شد (۱۰).

مطالعه انجام شده نشان داد که میزان آنتی‌اکسیدان ال-کارنیتین پلاسمای منی به‌طور قابل‌توجهی با مورفولوژی اسپرم مرتبط است (۲۴). به‌عبارت دیگر، افزایش میزان آنتی‌اکسیدان ال-کارنیتین باعث کاهش میزان اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی می‌شود.

نتایج به دست آمده از تست‌هاست بیانگر آن است که میزان سلامت غشا در نمونه‌های منی دریافت‌کننده تمام سطوح ال-کارنیتین نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود.

نتایج آزمایش Jeulin (۱۵) نشان داد که کارنیتین سبب حفاظت از آسیب DNA و غشای سلول از صدمات ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود.

نتایج ما مشابه با نتایج پژوهشی است که در آن طی فرآیند سردسازی سطوح مختلف ال-کارنیتین بعد از گذشت صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ ساعت به منی خرگوش افزوده شد و مشاهده گردید که در ساعات صفر، ۶ و ۱۲ در تحرک، سلامت غشا و آکروزوم اختلال معنی‌دار نشد (۲۱). در مطالعه دیگری ال‌کارنیتین باعث افزایش غیر معنی‌دار درصد کیفیت کروماتین اسپرم اپیدیدیم موش نسبت به گروه کنترل شد در حالی که بر روی فراسنجه‌های تحرک، قابلیت زنده ماندنی و مورفولوژی اسپرم اختلاف معنی‌داری ایجاد نکرد (۲۷) که با نتایج آزمایش ما مشابهت دارد.

نتایج پژوهش حاضر با نتایج مطالعه دورو و همکاران در سال ۲۰۰۰ که در آن افزودن ال-کارنیتین به مایع منی انسان هیچ اثر معنی‌داری بر یکپارچگی غشاء اسپرم نداشت، مشابهت دارد (۷).

از آنجایی که کارنیتین نقش آنتی‌اکسیدانی داشته و در انتقال اسیدهای چرب و متابولیسم انرژی مشارکت دارد، لذا می‌تواند چربی‌ها را از پراکسیداسیون لیپید حفظ کند و بدین ترتیب هم از غشا محافظت کرده و هم زنده‌مانی اسپرم را افزایش می‌دهد (۲۶).

میزان مالون‌دی‌آلدئید تولیدی در هر سه سطح ال-کارنیتین بکار رفته نسبت به گروه شاهد کاهش یافت اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. نمونه‌های دریافت‌کننده ۱۰۵ میلی‌مولار در میلی‌لیتر ال-کارنیتین کمترین میزان مالون دی آلدئید تولیدی را داشتند. نتایج ما مشابه با نتایج مطالعه دیگری مطابقت داشت (۵). در مطالعه دیگری نیز منی خروس‌های تغذیه‌شده با مکمل کارنتین کمترین میزان مالون دی آلدئید تولیدی را نسبت به گروه شاهد داشتند (۱۷).

یافته‌های این پژوهش نشان داد که افزودن ال-کارنیتین به رقیق‌کننده بر پایه تریس-لسیتین اثرات مثبتی بر کیفیت اسپرم نداشت و نمی‌تواند به‌عنوان مکملی مناسبی در رقیق‌کننده منی قوچ بکار رود.

منابع

1. Agarwal, A. and T.M. Said. 2004. Carnitines and male infertility. Reproductive Biomedicine Online, 8: 376-84.
2. Banihani, S., A. Agarwal, R. Sharma and M. Bayachou. 2014. Cryoprotective effect of L-carnitine on motility, vitality and DNA oxidation of human spermatozoa. Andrologia, 46: 637-41.
3. Bilodeau, J.F., S. Blanchette, N. Cormier and M.A. Sirard. 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. Theriogenology, 57: 1105-1122.
4. Bucak, M.N., A. Ateşşahin and A. Yüce. 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. Small Ruminant Research, 75: 128-134.
5. Bucak, M.N., P.B. Tuncer, S. Sariozkan, N. Baspınar, M. Taspınar, K. Coyan, A. Bilgili, P.P. Akalın, S. Buyukleblebici, S. Aydos, S. Ilgaz, A. Sunguroglu and D. Oztuna. 2010. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. Cryobiology, 61: 248-253.
6. Carlson, D.B., N.B. Litherl, H.M. Dann, J.C. Woodworth and J.K. Drackley, 2006. Metabolic effects of abomasal l-carnitine infusion and feed restriction in lactating Holstein cows. Journal of Dairy Science, 89: 4819-4834.
7. Duru, N.K., M. Morshedi, A. Schuffner and S. Oehninger. 2000. Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine does not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation-thawing. Fertility and Sterility, 74: 715-720.
8. Foote, R.H., C.C. Brockett and M.T. Kaproth. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. Animal Reproduction Science, 71: 13-23.
9. Funahashi, H. and T. Sano. 2005. Selected antioxidants improve the function of extender boar semen stored at 10 degree C. Theriogenology, 63: 1605-1616.
10. Goa, K.L. and R.N. Brodgen. 1987. L-carnitine preliminary review of its pharmacokinetics and its therapeutic use in ischemic cardiac disease and primary and secondary carnitine deficiencies in relationships to its role in fatty acid metabolism. Drugs, 34: 1-24.
11. Gonagle, L.S., M. Goldstein, J. Feldschuh and R.H. Foote. 2002. The influence of cryoprotective media and processing procedure motility and migration of freeze-thawed human sperm. Asian Journal of Andrology, 4: 137-141.
12. Hallak, J., R.K. Sharma, C. Wellstead and A. Agarwal. 2000. Cryopreservation of human spermatozoa comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. International Journal of Fertility and Women's Medicine, 45: 38-42.
13. Ijaz, A., A. Hussain, M. Aleem, M.S. Yousaf and H. Rehman. 2009. Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (Bubalus bubalis). Theriogenology, 71: 1326-1329.
14. Jacyno, E., A. Kolodziej, M. Kamyczek, M. Kawecka, K. Dziadek and A. Pietruszka. 2007. Effect of L-carnitine supplementation on boar semen quality. Acta Veterinaria Brno, 76: 595-600.
15. Jeulin, C. and L.M. Lewin. 1996. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. Human Reproduction Update, 2: 87-102.
16. Leboeuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Animal Reproduction Science, 62: 113-141.
17. Neuman, S.L., T.L. Lin and P.Y. Heste. 2002. The effect of dietary carnitine on semen traits of white Leghorn roosters. Poultry Science, 81: 495-503.
18. Owen, K.Q., J.L. Nelssen, R.D. Goodband, M.D. Tokach and K.G. Friesen. 2001. Effect of dietary l-carnitine on growth performance and body composition in nursery and growing-finishing pigs. Journal of Animal Science, 79: 1509-1515.
19. Parks, J.E. and J.K. Gaham. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology, 38: 209-222.
20. Sarica, S., M. Corduk, M. Suicmez, F. Cedden, M. Yildirim and K. Kiline. 2007. The effect of dietary L-carnitine supplementation on semen traits, reproductive parameters and testicular histology of Japanese quail breeders. The Journal of Applied Poultry Research, 16: 178-186.
21. Sariozkan, S., S. Ozdamar, F. Canturk and A. Yay. 2014. In vitro effects of L-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. Cryobiology, 68: 349-353.
22. Sharma, R.K. and Agarwal A. 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology, 48: 835-50.
23. Surai P.E., E. Blesbois, I. Grasseau, T. Chalah, J.P. Brillard, G.J. Wishart, S. Cerolini and N.H.C. Sparks. 1998. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 120: 527-533.
24. Stradioli, G., L. Syll, R. Zelli, P. Chiodi, M. Monaci. 2004. Effect of L-carnitine administration on the seminal characteristics of oligoasthenospermic stallions, Theriogeuology, 62: 761-777.
25. Vicari, E. and A.E. Calogero. 2001. Effects of treatment with carnitine in infertile patients with prostate-vesiculo-epididymis. Human Reproduction, 16: 2338-2342.
26. Yalcin, S., A. Ergun, H. Erol, B. Ozsoy and I. Onbasilar. 2004. The usage of l-carnitine and humates in laying hen and quail diets. Proceeding of World's Poultry Congress and Exhibition Istanbul, Turkey. June 8-13. 530 pp.
27. Zare, Z., H. Eimani, M. Mohammadi, M. Mofid and H. Dashtnavard. 2010. The Effect of Orally Administered L-carnitine on Testis Tissue, Sperm Parameters and Daily Sperm Production in Adult Mice. Yakhteh Medical Journal, 11: 382-389.

Effects of Different Concentrations of L-Carnitine in Lecithin-Based Semen Extender on Semen Quality of *Ghezel* Ram after Freeze Thawing Process

Sepehr Jafari[1], Hossein Daghigh Kia[2], Gholamali Moghaddam[3] and Marzyeh Ebrahimi[4]

1, 3 and 4- Graduated M.Sc. Student, Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
(Corresponding Author: daghighkia@tabrizu.ac.ir)
Received: June 28, 2017 Accepted: April 11, 2018

Abstract

The objective of this study was to investigate the effect of different levels of L-Carnitine on *Ghezel* ram semen characteristics after freeze-thawing. Semen samples were collected from 5 healthy and mature rams using an artificial vagina. Different concentrations of 35, 70, 105, mM L-Carnitine were diluted with lecithin-based semen extender and cooled to 5°C and then placed in liquid nitrogen vapor and finally were stored in liquid nitrogen tank. The experiment was carried out on the basis of completely randomized design with 5 replicates. The results showed that the highest total motility and progressive motility were observed in groups containing 70 and 105 mM L-Carnitine that were not significantly different from the control group. The lowest motility recorded in this experiment was the first level of L-Carnitine. In other parameters only VAP, ALH, VCL and LIN were significantly different from the control group. The first level of L-Carnitin was statistically significant in morphology compared to the control group. Addition of 105 mM of L-Carnitine caused higher membrane integrity and lower MDA level compared to 35 mM group ($p<0.05$). MDA was not significant at any level. Therefore, supplementation of L-Carnitine in lecithin-based semen extender can improve semen quality of *Ghezel* ram and reduce negative effects of freeze-thawing process.

Keywords: Freeze-Thawing, L-Carnitin, Ram, Sperm