دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

اثر آنتی‌اکسیدان رزوراترول به شکل نانو لیپوزوم و NLC در رقیق‌کننده اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ٤°C

ابوذر نجفی[۱]، حسین دقیق کیا[۲] و مهدیه مهدی‌پور[۳]

۱- استادیار گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران
۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، (نویسنده مسوول: daghighkia@tabrizu.ac.ir)
۳- دانش‌آموخته دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
تاریخ دریافت: ۹۹/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۲
صفحه: ۹۱ تا ۱۰۲

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر آنتی‌اکسیدان رزوراترول به شکل نانو شده بر اسپرم خروس بود. در این پژوهش از آنتی‌اکسیدان رزوراترول به شکل نانو (لیپوزوم و NLC) و غیرنانو شده در محیط رقیق‌کننده استفاده شد. بلافاصله پس از جمع‌آوری منی و بررسی‌های اولیه، منی جمع‌آوری شده از هر ۱۵ خروس به منظور حذف اثرات فردی با یکدیگر مخلوط و به محیط رقیق‌کننده اضافه شدند. رقیق سازی در دمای ۳۷ °C به نسبت یک به بیست انجام شد. غلظت‌های مختلف رزوراترول (۲۰، ٤۰ و ٦۰ میکرومولار) به رقیق‌کننده پایه به سه شکل به صورت غیر محافظت شده، لیپوزوم و NLC اضافه شد. پس از رقیق‌سازی منی، مرحله سرد شدن تدریجی در دمای ٤°C بمدت ۳ ساعت انجام شد. بعد از فرآیند سرد سازی صفات جنبایی (CASA)، یکپارچگی غشاء (HOST)، زنده‌مانی، پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) و ناهنجاری های اسپرم، مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج در زمان ٢٤ و ٤٨ ساعت نگهداری در دمایی ٤°C نشان دهنده آن است که استفاده از ٤۰ میکرومولار رزوراترول، رزوراترول لود شده در لیپوزوم و رزوراترول لود شده در NLC باعث بهبود جنبایی، جنبایی پیش رونده اسپرم، زنده‌مانی و یکپارچگی غشا در مقایسه با تیمار شاهد می‌شوند. نتایج این آزمایش نشان دهنده آن است که تیمارهای ٤۰ میکرومولار رزوراترول، رزوراترول لود شده در لیپوزوم و رزوراترول لود شده در NLC باعث بهبود بسیاری از پارامترهای مورد ارزیابی شد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم خروس، انجماد، رزوراترول، نانو

مقدمه

نرخ باروری پایین اسپرم منجمد طیور در مقایسه با دیگر گونه‌ها، یک چالش جدی برای تلقیح مصنوعی در گله‌های تجاری است. این چالش ممکن است با برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی اسپرم طیور مرتبط باشد. از طرف دیگر، تنش‌های اسمزی، شیمیایی و مکانیکی طی فرآیندهای انجماد–یخگشایی، از مهم‌ترین دلایلی هستند که باعث به وجود آمدن تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی در اسپرم می‌شوند. نتیجه این تغییرات وقوع مجموعه‌ای از پدیده‌های آبشاری است که منجر به کاهش باروری اسپرم خواهند شد (۱۴). در طی فرایند انجماد و یخ‌گشایی، تنش‌های رخ‌دهنده در طی فرایندهای سردسازی و یخ‌گشایی، اسپرم را دستخوش تغییرات نامطلوبی می‌نماید. لیپیدها از اجزای مهم غشای اسپرمی هستند که نقش عمده‌ای در توان باروری اسپرم‌ها دارند. برای مثال، در اسپرم پرندگان و پستانداران، چربی‌ها به‌عنوان یکی از منابع مهم انرژی در هنگام نگهداری اسپرم در شرایط برون‌تنی هستند. غشای پلاسمایی اسپرم پستانداران، ماهی‌ها و پرندگان سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع و فسفولیپیدها است. فسفولیپیدهای اسپرم پرندگان مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع مانند آراشیدونیک اسید (20:4n-6)[۱] و دوکوزا ترا انوییک اسید (22:4n-6)[۲] دارند. مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه (PUFAs)[۳] موجب می‌شود اسپرم به پراکسی داسیون لیپیدی[۴] بسیار حساس شود که با ناباروری آن همبستگی مثبت دارد (۱۷).

تمامی موجودات زنده هوازی با پارادوکسی به نام اکسیژن روبرو هستند؛ یعنی از یک سو نیازمند به O_2 مولکولی بوده و از سویی دیگر با وجود ضروری بودن اکسیژن، متابولیت‌های آن همانند رادیکال هیدروکسیل (OH)، آنیون سوپراکسید (O^-_2) و یا هیدروژن پراکسید (H_2O_2) بر عملکرد و ساختار سلول‌ها تأثیر منفی نهاده و بقای موجود زنده را در معرض خطر قرار می‌دهند؛ به همین علت اکسیژن را نوعی تیغ دو لبه در نظر می‌گیرند (۹). مجموعه مشتقات اکسیژن موسوم به گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) بوده که به‌عنوان یکی از عوامل ایجاد ناباروری در پستانداران شناخته می‌شوند. گونه‌های اکسیژن فعال دارای اثری دوگانه بر عمل و ساختار سلول‌های اسپرم است؛ از یک طرف جهت انجام برخی روندهای طبیعی همانند واکنش آکروزومی ضروری بوده و از طرفی دیگر در غلظت‌های زیاد در محیط باعث تنش اکسیداتیو می‌شود. تنش اکسیداتیو ناشی از ROS موجب مهار قدرت تحرک و نیز بروز تغییر شکل‌های ظاهری در اسپرم‌ها شده و بدین ترتیب منجر به ناباروری خواهند شد (۱۳). یکی از علایم مهم تنش اکسیداتیو در سلول‌ها، پراکسیداسیون چربی‌های غشایی است. پراکسیداسیون چربی‌ها یک پدیده فیزیولوژیک بوده و شامل مجموعه واکنش‌هایی است که منجر به تخریب و تشکیل مجدد پیوندهای دوگانه در این اسیدهای چربی غشایی می‌شوند. این پدیده در همه سلول‌هایی که غنی از اسیدهای چرب غیراشباع هستند، رخ می‌دهد (۳۲). روند پراکسیداسیون چربی موجب تخریب ساختار غشایی، کاهش قدرت تحرک، مهار فعالیت‌های آنزیمی و ایجاد شکستگی در DNA

1- Arachidonic acid (C20:4n-6) 2- Docosatetraenoic acid 3- Polyunsaturated Fatty Acid 4- Lipid peroxidation

سلول‌های اسپرم شده، که به نوبه خود منجر به کاهش توان باروری اسپرم می‌شوند. سلول‌های اسپرم طی روند اسپرماتوژنز، مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را همراه با مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در آن، از دست‌داده و بدین ترتیب در مقابل روند تنش اکسیداتیو حساس می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که قادر به جمع‌آوری گونه‌های فعال اکسیژن و سپس خنثی‌سازی آن‌ها در داخل و خارج سلول‌های بدن می‌باشند (۹). امروزه راهبرد استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در راستای رفع صدمات وارده به سلول‌ها مدنظر محققین قرار گرفته است (۱).

به‌منظور جلوگیری از آسیب به سلول‌های اسپرم، به‌طور طبیعی سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی در مایع منی وجود دارند. سامانه آنتی‌اکسیدانی در مایع منی پستانداران و پرندگان اهلی مشتمل بر سه سطح عمده‌ی گلوتاتیون پراکسیداز[1]، سوپراکسید دیسموتاز[2] و کاتالاز[3] است. سامانه آنتی‌اکسیدانی موجود در پلاسمای منی پرندگان اهلی در تولیدمثل طبیعی تنها برای مدت کوتاهی مؤثر است. پژوهش‌های گوناگون نشان داده‌اند که افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به جیره غذایی پرندگان اهلی موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای منی می‌شود (۳۸). اگرچه فراورده‌های پراکسیداسیون (MDA) در منی پرندگان در زمان انزال وجود دارند، اما بیشترین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم خروس (۸) و بوقلمون (۱۲،۱۸) در چند ساعت آغازین نگهداری برون‌تنی دیده می‌شود. تشکیل MDA در منی پرندگان و پستانداران در شرایط برون‌تنی، با کاهش معنی‌دار اسیدهای چرب غیراشباع 20:4n-6 و 22:4n-6 همراه است. به‌رغم وجود سامانه آنتی‌اکسیدانی پیچیده در مایع منی و اسپرم، باز هم اسپرم پرندگان دستخوش آسیب‌های اکسیداسیونی می‌شود (۳۸). لذا وجود یک آنتی‌اکسیدان مؤثر و قوی برای جلوگیری از تنش اکسیداتیو ضروری به نظر می‌رسد. از طرف دیگر استفاده بیش از حد از آنتی‌اکسیدان‌ها باعث صدمه به اسپرم‌ها می‌شود.

رزوراترول یک پلی فنول و فیتوآلکسین طبیعی است که حداقل در ۲۷ گونه گیاهی یافت می‌شود. تحقیقات نشان داده است که رزوراترول دارای اثرات ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد دیابتی می‌باشد (۱۹). نشان داده شده است که اثرات کاهش در پراکسیداسیون لیپیدی رزوراترول بسیار قوی‌تر از سایر فنول‌ها می‌باشد (۲۱). بوکاک و همکاران (۱۱) اثر افزودن رزوراترول را روی اسپرم گاو مورد بررسی قرار دادند و نتایج این تحقیق نشان‌دهنده آن است که افزودن رزوراترول باعث کاهش آسیب به DNA می‌شود.

استفاده از نانو حامل‌ها برای ترکیبات غذا و داروها می‌تواند مزایای متعددی از جمله کنترل رهایش در یک مکان و زمان معین، پایداری محصول درون‌پوشانی شده در برابر نور، حرارت و اکسیژن طی فرایند و نگهداری درون ماتریکس غذایی، افزایش حلالیت ترکیبات آب‌گریز در محیط‌های آبی، دسترسی زیستی بالاتر آنها بدلیل اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بالای قطرات و عدم کاهش شفافیت، به علت کوچک بودن اندازه را داشته باشد. اثر لیپوزوم‌ها روی غشای سلولی، بستگی به خصوصیات شیمیایی و فیزیکی لیپیدها در لیپوزوم‌ها دارد که این فراسنجه‌ها به‌وسیله طول زنجیره آسیل، تعداد پیوند دوگانه، نوع و بار گروه‌های عاملی سر لیپیدها تعیین می‌شود (۳۳). همچنین، تلفیق لیپوزوم با غشای اسپرم پستانداران، بسته به ترکیب لیپید، نسبت لیپوزوم به اسپرم و تفاوت‌های فردی، متفاوت است. امروزه با تهیه نانو ذرات دارو، می‌توان به ویژگی‌های بی‌نظیری دست یافت که این امر منجر به افزایش عملکرد و تنوع در اشکال دارویی آن خواهد شد. فرمولاسیون دقیق این ذرات منجر به پایداری بیشتر آن‌ها شده و می‌تواند سرعت در انحلال و رسیدن به سطوح بیولوژیک را افزایش دهد که نتیجه آن سرعت بخشی به اثر درمانی و بهبود قابلیت زیستی آن‌ها خواهد بود (۳۷). حلالیت کم برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها در آب و کم بودن قابلیت زیستی مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی جدید یکی از مشکلات اساسی آن‌ها می‌باشد. بدین منظور نیاز به توسعه سیستم‌های جدید که به این مشکلات فائق آید ضروری به نظر می‌رسد. این سیستم‌های حامل باید غیر سمی بوده، ظرفیت پذیرش مقدار کافی آنتی‌اکسیدان را داشته، و علاوه بر این امکان هدفمند کردن و کنترل آزادسازی آنتی‌اکسیدان در آن‌ها وجود داشته باشد (۲۶). نشان داده شده است که خیلی از داروها حلالیت بیشتری در روغن‌ها نسبت به چربی‌های جامد دارند که این امر به حل شدن آن‌ها در روغن و جلوگیری از دفع آن توسط چربی‌های جامد اطراف آن کمک خواهد نمود. این مدل حامل‌های لیپیدی نانوساختار چندگانه نام دارد و بسیار شبیه به امولسیون‌ها می‌باشد، چرا که در اینجا هم پراکندگی روغن در جامد و هم چربی در آب رخ داده است. اضافه کردن چربی‌های مایع منجر به شکل‌گیری جمعیتی از ذرات کوچک خواهد شد که این امر به پویایی ماتریکس کمک خواهد نمود (۳،۴). هدف از این پژوهش استفاده از آنتی‌اکسیدان رزوراترول به شکل نانو (لیپوزوم و NLC) و غیرنانو شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در گروه علوم دامی دانشگاه تبریز انجام شد. در ابتدای آزمایش ۱۵ خروس گله مادر گوشتی سویه تجاری رأس ۳۰۸ (۳۰ هفته‌ای) به سالن نگهداری خروس‌ها منتقل شدند. سپس خروس‌ها از نظر سلامت عمومی و وضعیت سلامتی و اسپرم‌دهی مورد معاینه قرار گرفتند. اسپرم‌گیری از خروس‌ها پس از یک ماه دوره عادت‌پذیری به اسپرم‌دهی بصورت هفته‌ای دو بار و به روش مالش پشتی- شکمی از تمام خروس‌ها صورت گرفت.

غلظت‌های مختلف رزوراترول (سیگما آلدریچ- آمریکا) (۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار) به رقیق‌کننده پایه به سه شکل بصورت معمولی (نانو نشده)، لیپوزوم و حامل‌های لیپیدی نانوساختار (NLC)[4] و تیمار شاهد (فاقد آنتی اکسیدان) اضافه شدند.

تهیه NLCهای حاوی آنتی‌اکسیدان به روش هموژنیزاسیون گرم انجام شد (۳۰). ابتدا فاز روغنی (شامل لیپید جامد، ۸۰ میلی‌گرم پریسرول) در مقادیر وزنی مشخص شده، تا ۵ درجه سانتی‌گراد بالاتر از نقطه ذوب چربی (دمای ۸۰°C) در داخل

1- Glutathione peroxidase 2-Superoxide dismutase 3-Catalase 4- Nanostructured Lipid Carriers

دستگاه بن‌ماری حرارت داده شد. سپس محلول سورفاکتانت فاز آبی (پولاکسامر ۴۰۷ (سیگما آلدریچ- آمریکا)) با دمای ۸۰°C، قطره قطره به داخل فاز روغنی حاوی آنتی‌اکسیدان رزوراترول با دمای ۸۰°C، افزوده شد و تحت هموژنایزر با دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه هموژن گردید. به دلیل استفاده از دمای بالا در تهیه فرمولاسیون، لیپید جامد و مایع به صورت «قطرات لیپیدی احاطه شده با لایه سورفاکتانت» در داخل محیط آبی تولید شد و سپس با خنک شدن سامانه در دمای اتاق، ذرات حاوی لیپید جامد و روغن مایع به شکل کریستال‌های لیپیدی تشکیل شد.

جهت تهیه لیپوزوم‌ها از لسیتین استفاده شد. برای تولید لیپوزوم از روش لایه نازک استفاده شد (۲۹). لایه نازک با حل کردن آنتی‌اکسیدان و لسیتین در حلال (اتانول) و سپس تبخیر حلال در اواپراتور چرخشی (شرکت Heidolph کشور آلمان) تحت دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تشکیل شد و سپس توسط ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر هیدراته شد. لیپوزوم‌های تولید شده در این مرحله چندلایه و در مقیاس میکرومتری بود. عمل هموژنیزاسیون نمونه‌ها توسط هموژنایزر (شرکت Heidolph کشور آلمان) با دور ۲۰۰۰۰ rpm صورت گرفت. در نهایت عمل سونیکاسیون نمونه‌های لیپوزومی توسط سونیکاتور پروب (مدلSonics ،Materials vibracell کشور انگلستان) با ۱۰ سیکل ۱ دقیقه‌ای و ۱ دقیقه استراحت ما بین هر سیکل، انجام شد. به این صورت لیپوزوم‌های تک لایه‌ای در مقیاس نانومتریک تولید شد. نانولیپوزوم‌های تولید شده در دمای اتاق جهت استفاده نگهداری شد.

اندازه ذرات با دستگاه سنجش

اندازۀ ذرات SALD 2101 ساخت ژاپن، در آزمایشگاه تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز اندازه‌گیری شدند. بلافاصله پس از جمع‌آوری منی از خروس‌ها (به روش مالش پشتی- شکمی) بررسی‌های اولیه صورت گرفت و حجم بین ۱-۰/۲ میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از ۳ میلیارد اسپرم در هر میلی لیتر، جنبایی بیش از ۸۰ درصد و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد در هر انزال، به عنوان اسپرم طبیعی در نظر گرفته شد. منی جمع‌آوری شده از هر ۱۵ خروس به منظور حذف اثرات فردی با یکدیگر مخلوط و به محیط رقیق‌کننده (جدول ۱) اضافه شدند. رقیق‌سازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به نسبت یک به بیست انجام شد (غلظت نهایی اسپرم $۱۰^{۸} \times ۲$) (۲۹). غلظت‌های مختلف رزوراترول (۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار) در سه شکل (غیر محافظت شده و در داخل ساختارهای لیپوزومی و NLC) به ترکیب رقیق‌کننده پایه اضافه شد. سپس سرد شدن تدریجی نمونه‌های منی رقیق‌شده در دمای 4°C به مدت ۳ ساعت انجام گردید. سپس در زمان‌های صفر (بلافاصله پس از رسیدن نمونه‌ها به دمای ۴°C)، ۲۴ و ۴۸ ساعت (در داخل یخچال)، پارامترهای جنبایی، یکپارچگی غشایی، پراکسیداسیون لیپیدی، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و درصد زنده‌مانی نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱- اجزای رقیق‌کننده مورد استفاده (محیط انجماد) (۲۴)

Table 1. The components of the diluent used (freezing medium)

مواد	مقدار
پتاسیم دی فسفات	۰/۷۵۸ (gr)
سدیم گلوتامات	۰/۸۶۶ (gr)
پتاسیم سیترات	۰/۰۶۴ (gr)
پتاسیم منوفسفات	۰/۰۷ (gr)
سدیم استات	۰/۳۱ (gr)
منیزیم کلراید	۰/۰۳۴ (gr)
تریس	۰/۲۷ (gr)
فروکتوز	۰/۵ (gr)
لسیتین (٪)	۱

جنبایی اسپرم با استفاده از CASA ارزیابی شد (جدول ۲). برای این پژوهش از سیستم CASA، مدل video test sperm 3.1 کالیبره شده استفاده شد. از هر نمونه حداقل ۵ زمینه به صورت کاملاً تصادفی انتخاب و به تعداد ۲۰۰ اسپرم بوسیله سیستم CASA آنالیز شدند (۳۴).

جدول ۲- مشخصات تنظیمات سیستم CASA مدل Video Test Sperm 3.1

Table 2. The properties of the casa system setting model video test sperm 3.1

پارامتر	تنظیمات
نرخ فریم (هرتز)	۵۳
فریم حاصل شده	۳۰
حداقل کنتراست	۵۰
	89Threshold
	اندازه سلول (پیکسل) ۲
حداقل VSL	۱۲
حداقلVCL	۴۰
حداقلVAP	۲۰
بزرگنمایی میکروسکوپ	۲۰
دما	۳۷

برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد (ائوزین ۱/۶۷ گرم، نگروزین ۱۰ گرم، سدیم سیرات ۲.۹ گرم، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد) (۲۷). پایه‌ی این روش این گونه است که اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند، ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای ارزیابی هر نمونه، ۱۰ میکرولیتر رنگ ائوزین- نیگروزین به‌وسیله سمپلر بر روی یک لام گرم و تمیز قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از منی رقیق شده با استفاده از سمپلر بر روی رنگ ریخته و مخلوط گردید. با کشیدن لام دیگری بر روی نمونه‌ی مخلوط شده اسپرم و رنگ، گسترشی از مخلوط آن‌ها بر روی لام تهیه شد. پس از خشک شدن، لام در زیر میکروسکوپ قرار داده شد و با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد مشاهده قرار گرفت. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد.

در این پژوهش برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از آزمون تورم هیپواسموتیک (HOST) استفاده شد (۲۸). ده میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاست، که داری فروکتوز و سیترات سدیم بود، افزوده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شد. پس از گذشت این زمان ۱۰ میکرولیتر از نمونه انکوبه شده بر روی لام قرار داده شد و با استفاده از لامل بر روی لام گسترده شد. بررسی میکروسکوپی در دمای ۳۷°C و با بزرگنمایی ۴۰۰ به کمک میکروسکوپ فازکنتراست صورت گرفت. از هر تیمار ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های با دم گره‌خورده نسبت به کل اسپرم محاسبه شد.

برای ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم‌ها از محلول هانکوک استفاده شد. برای ساخت محلول هانکوک از روش هانکوک استفاده شد (۲۴). محیط هانکوک شامل ۶۲/۵ میلی‌لیتر فرمالین (۳۷ درصد)، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سالین، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر است. محلول سالین شامل ۹/۰۱ گرم کلرید سدیم در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر می‌باشد. محلول بافر خود از دو محیط جداگانه تشکیل‌شده است. محیط نخست شامل ۲۱/۶۸۲ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبدار ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$) در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و محیط دوم از ۲۲/۲۵۴ گرم فسفات پتاسیم (KH_2PO_4) در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر تشکیل‌شده است. با مخلوط کردن ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط نخست با ۸۰ میلی‌لیتر از محیط دوم، ۲۸۰ میلی‌لیتر محلول بافر تهیه می‌شود. برای ارزیابی ناهنجاری‌های اسپرم سه قطره از هر نمونه اسپرم به میکروتیوب حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک افزوده شد. سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و لامل گذاری شد و با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. برای محاسبه درصد کل اسپرم‌های نابهنجار (ناهنجاری‌های آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) تعداد ۲۰۰ اسپرم از هر نمونه مورد بررسی و شمارش قرار گرفت.

غلظت مالون‌دی‌آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در نمونه‌های منی است که با استفاده از واکنش تیوباربیتوریتیک اسید اندازه‌گیری شد (۲۳). معمولاً در دمای ۹۵°C و شرایط اسیدی، یک مولکول MDA با دو مولکول تیوباربیتوریتیک اسید واکنش داده و کمپلکس صورتی‌رنگی را به وجود می‌آورد. برای اندازه‌گیری غلظت MDA، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند (ده هزار دور در دقیقه). در ادامه مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از مایع رویی به یک میلی‌لیتر محلول حاوی‌تری کلرواستیک اسید (۲۰٪) و تیوباربیتوریتیک اسید (۰/۵٪) اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵°C حرارت داده شد. در مرحله بعد نمونه‌ها بعد از سرد شدن در داخل یخ، عدد جذب هر یک از نمونه‌ها در طول‌موج ۵۳۲ به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

آنالیز آماری

نتایج حاصل از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی بوسیله نرم‌افزار SAS و با استفاده از Proc GLM آنالیز و سطح معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته خواهد شد. این آزمایش در پنج تکرار انجام شد.

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

Y_{ij}: مشاهدات

μ: میانگین

T_i: اثر اثر iامین آنتی‌اکسیدان

e_{ij}: اثرات باقیمانده

نتایج و بحث

نتایج حاصل از اثر استفاده از رزوراترول، رزوراترول لود شده در لیپوزوم و رزوراترول لود شده در NLC بر جنبایی اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C در جدول ۳ آورده شده است. نتایج گویای آن است که استفاده از تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر جنبای اسپرم در زمان صفر ندارد. همچنین نتایج نشان‌دهنده آن است که در زمان ۲۴ ساعت، تیمارهای ۴۰ میکرومولار رزوراترول، رزوراترول لود شده در لیپوزوم و رزوراترول لود شده در NLC باعث بهبود جنبایی اسپرم در مقایسه با تیمار شاهد شد. در زمان ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۴°C، تیمارهای ۲۰ و ۴۰ میکرومولار رزوراترول لود شده در لیپوزوم و رزوراترول لود شده در NLC باعث بهبود جنبایی اسپرم در مقایسه با تیمار شاهد گردید.

جدول ۳- اثر رزوراترول، رزوراترول لود شده در لیپوزوم و رزوراترول لود شده در NLC بر جنبایی کل اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C

Table 3. The effect of resveratrol, resveratrol loaded in liposome and resveratrol loaded in NLC on sperm total motility during storage at 4 ° C

تیمارها	µM	۰	۲۴	۴۸
کنترل	۰	۸۶/۰۵	۴۹/۶۶^{c}	۲۳/۱۵^{d}
رزوراترول	۲۰	۹۰/۴۳	۵۵/۰۲^{bc}	۲۷/۷۳^{bcd}
	۴۰	۹۲/۰۷	۶۴/۹۱^{ab}	۳۰/۳۸^{ab}
	۶۰	۸۶/۶۶	۵۳/۷۱^{bc}	۲۴/۰۶^{cd}
رزوراترول لود شده در لیپوزوم	۲۰	۹۰/۴۶	۵۷/۷۹^{abc}	۲۸/۲۶^{abc}
	۴۰	۹۲/۵۵	۶۶/۹۹^{a}	۳۱/۹۲^{ab}
	۶۰	۸۹/۶۱	۵۲/۵۷^{c}	۲۷/۵^{abcd}
رزوراترول لود شده در NLC	۲۰	۹۰/۸۷	۵۸/۹۹^{abc}	۲۹/۳۷^{ab}
	۴۰	۹۲/۹۹	۶۸/۴۷^{a}	۳۲/۷۳^{a}
	۶۰	۸۹/۵۲	۵۴/۱۴^{bc}	۲۷/۷۷^{bcd}
SEM		۲/۷۲	۲/۴۶	۱/۰

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

اثر استفاده از رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم، رزوراترول لودشده در NLC بر جنبایی پیش‌رونده اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C در جدول ۳۴ آورده شده است. در زمان صفر نتایج نشان دهنده آن است که استفاده از تیماری‌های آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر جنبایی پیش‌رونده ندارد. نتایج در زمان ۲۴ ساعت نگهداری در دمایی ۴°C نشان‌دهنده آن است که استفاده از ۴۰ میکرومولار رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم و رزوراترول لودشده در NLC باعث بهبود جنبایی پیش‌رونده اسپرم در مقایسه با تیمار شاهد می‌شوند. همچنین نتایج گویای آن است که در ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۴°C تیمارهای ۲۰ و ۴۰ میکرومولار رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم و رزوراترول لودشده در NLC باعث بهبود جنبایی پیش‌رونده اسپرم در مقایسه با تیمار شاهد می‌شوند.

جدول ۴- اثر رزوراترول، رزوراترول لود شده در لیپوزوم، رزوراترول لود شده در NLC بر جنبایی پیش‌رونده اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C

Table 4. The effect of resveratrol, resveratrol loaded in liposome and resveratrol loaded in NLC on sperm progressive motility during storage at 4 ° C

تیمارها	µM	۰	۲۴	۴۸
کنترل	۰	۵۹/۹۲	۱۹/۱۵^{a}	۸/۵۹^{c}
رزوراترول	۲۰	۶۰/۰۴	۲۳/۱۸^{abcd}	۱۳/۹۴^{ab}
	۴۰	۶۲/۲۸	۲۷/۶۴^{abc}	۱۵/۱۴^{ab}
	۶۰	۵۸/۸۷	۱۹/۹۱^{cd}	۱۱/۰۴^{bc}
رزوراترول لودشده در لیپوزوم	۲۰	۶۰/۴۹	۲۲/۳۳^{bcd}	۱۳/۳۳^{abc}
	۴۰	۶۲/۹۹	۲۹/۱۴^{ab}	۱۶/۱۵^{ab}
	۶۰	۵۹/۱۵	۲۱/۶۰^{bcd}	۱۱/۰۹^{bc}
رزوراترول لودشده در NLC	۲۰	۶۰/۳۲	۲۳/۶۵^{abcd}	۱۳/۲۴^{abc}
	۴۰	۶۳/۸۴	۳۱/۵۹^{a}	۱۷/۶۱^{a}
	۶۰	۶۰/۰۷	۲۲/۹۵^{bcd}	۱۲/۷۱^{abc}
SEM		۱/۹۳	۱/۷۷	۱/۰۹

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

اثر استفاده از رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم، رزوراترول لودشده در NLC بر زنده‌مانی اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C در جدول ۵ آورده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که در زمان صفر تیمارهای آزمایشی تاثیری بر زنده‌مانی اسپرم خروس ندارند. نتایج ما نشان دهنده آن است که در ۲۴ ساعت نگهدری از اسپرم در دمای ۴°C تیمارهای ۴۰ میکرومولار رزوراترول، ۴۰ میکرومولار رزوراترول لودشده در لیپوزوم و ۲۰، ۴۰ میکرومولار رزوراترول لودشده در NLC باعث بهبود زنده‌مانی پیش‌رونده اسپرم در مقایسه با تیمار شاهد می‌شوند. در ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۴°C تیمارهای ۴۰ میکرومولار رزوراترول، ۴۰ میکرومولار رزوراترول لودشده در لیپوزوم و ۴۰ میکرومولار رزوراترول لودشده در NLC باعث بهبود زنده‌مانی اسپرم در مقایسه با تیمار شاهد شدند.

جدول ۵- اثر رزوراترول، رزوراترول لود شده در لیپوزوم، رزوراترول لود شده در NLC بر زنده‌مانی اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C
Table 5. The effect of resveratrol, resveratrol loaded in liposome and resveratrol loaded in NLC on sperm viability during storage at 4 ° C

تیمارها	µM	۰	۲۴	۴۸
کنترل	۰	۸۹/۱۲	۵۲/۶۲^{d}	۲۶/۵۹^{d}
رزوراترول	۲۰	۹۰/۷۱	۵۸/۳۶^{cd}	۳۰/۱۶^{bcd}
	۴۰	۹۲/۹۶	۶۷/۹۴^{ab}	۳۵/۷۸^{abc}
	۶۰	۸۹/۲۵	۵۵/۵۰^{cd}	۲۸/۰۱^{d}
رزوراترول لودشده در لیپوزوم	۲۰	۹۰/۵۸	۶۱/۰۱^{bcd}	۳۲/۲۲^{abcd}
	۴۰	۹۲/۳۰	۷۳/۳۲^{a}	۳۶/۴۱^{ab}
	۶۰	۸۹/۳۹	۵۵/۴۸^{cd}	۲۹/۵۰^{cd}
رزوراترول لودشده در NLC	۲۰	۹۱/۵۳	۶۲/۶۳^{bc}	۳۲/۴۶^{abcd}
	۴۰	۹۲/۶۱	۷۵/۷۶^{a}	۳۸/۱۸^{a}
	۶۰	۹۰/۰۶	۵۵/۷۶^{cd}	۲۹/۱۶^{cd}
SEM		۲/۱۸	۱/۹۹	۱/۴۵

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

اثر استفاده از رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم، رزوراترول لودشده در NLC بر یکپارچگی غشا اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C در جدول ۶ آورده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که تیمارهای آزمایشی در زمان صفر تأثیر معنی‌داری در یکپارچگی غشا اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C نداشته‌اند. همچنین در زمان ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۴°C تیمارهای ۴۰ میکرومولار رزوراترول، ۴۰ میکرومولار رزوراترول لودشده در لیپوزوم و ۴۰ میکرومولار رزوراترول لودشده در NLC باعث بهبود یکپارچگی غشا اسپرم در مقایسه با تیمار شاهد می‌شوند. در زمان ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۴°C تیمارهای ۴۰ میکرومولار رزوراترول، ۴۰ میکرومولار رزوراترول لودشده در لیپوزوم و ۴۰ میکرومولار رزوراترول لودشده در NLC باعث بهبود یکپارچگی غشا اسپرم در مقایسه با تیمار شاهد می‌شوند.

جدول ۶- اثر رزوراترول، رزوراترول لود شده در لیپوزوم، رزوراترول لود شده در NLC بر یکپارچگی غشا اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C
Table 6. The effect of resveratrol, resveratrol loaded in liposome and resveratrol loaded in NLC on membrane integrity during storage at 4 ° C

تیمارها	µM	۰	۲۴	۴۸
کنترل	۰	۸۳/۸۲	۴۴/۱۵^{b}	۲۰/۶۵^{d}
رزوراترول	۲۰	۸۵/۳۹	۴۸/۵۷^{b}	۲۵/۷۲^{bc}
	۴۰	۸۲/۷۰	۶۲/۶۵^{a}	۳۰/۲۳^{ab}
	۶۰	۸۴/۹۱	۴۶/۵۴^{b}	۲۰/۶۶^{d}
رزوراترول لودشده در لیپوزوم	۲۰	۸۶/۵۵	۴۸/۵۱^{b}	۲۳/۲۸^{cd}
	۴۰	۸۱/۰۸	۶۴/۶۶^{a}	۲۹/۷۵^{ab}
	۶۰	۸۳/۰۴	۴۸/۷۱^{b}	۲۴/۵۰^{cd}
رزوراترول لودشده در NLC	۲۰	۸۷/۴۳	۵۰/۳۵^{b}	۲۵/۴۶^{bcd}
	۴۰	۸۲/۰۰	۶۷/۵۶^{a}	۳۲/۵۶^{a}
	۶۰	۸۰/۳۴	۴۹/۹۲^{b}	۲۲/۶۹^{cd}
SEM		۲/۶۴	۲/۰۸	۱/۰۳

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

اثر استفاده از رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم، رزوراترول لودشده در NLC بر درصد ناهنجاری اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C در جدول ۷ آورده شده است. نتایج نشان‌دهنده آن است که تیمارهای آزمایشی تاثیری روی درصد ناهنجاری اسپرم خروس طی نگهداری در دمای 4°C در سه زمان ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با تیمار شاهد نداشته است.

جدول ۷- اثر رزوراترول، رزوراترول لود شده در لیپوزوم، رزوراترول لود شده در NLC بر درصد ناهنجاری اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C

Table 7. The effect of resveratrol, resveratrol loaded in liposome and resveratrol loaded in NLC on abnormal forms during storage at 4 ° C

تیمارها	µM	۰	۲۴	۴۸
کنترل	۰	۸/۹۹	۱۶/۲۶	۲۱/۲۶
رزوراترول	۲۰	۸/۴۴	۱۴/۷۵	۱۸/۸۰
	۴۰	۷/۸۵	۱۳/۱۹	۱۵/۴۰
	۶۰	۸/۷۰	۱۴/۷۴	۲۱/۱۱
رزوراترول لودشده در لیپوزوم	۲۰	۸/۳۳	۱۴/۰۶	۲۰/۷۶
	۴۰	۷/۲۹	۱۲/۹۴	۱۴/۷۹
	۶۰	۸/۱۰	۱۴/۷۰	۲۱/۹۷
رزوراترول لودشده در NLC	۲۰	۸/۰۳	۱۳/۵۱	۱۷/۲۳
	۴۰	۷/۰۶	۱۲/۱۵	۱۴/۳۲
	۶۰	۸/۰۸	۱۴/۰۵	۱۹/۵۸
SEM		۰/۷۸	۱/۱۶	۱/۹۷

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

اثر استفاده از رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم، رزوراترول لودشده در NLC بر میزان MDA اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C در جدول ۸ آورده شده است. نتایج، نشان دهنده آن است که تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری در میزان MDA در زمان صفر نداشته‌اند. همچنین در زمان ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۴°C، تیمارهای ۴۰ میکرومولار رزوراترول، ۴۰ میکرومولار رزوراترول لودشده در لیپوزوم و ۲۰ و ۴۰ میکرومولار رزوراترول لودشده در NLC باعث کاهش میزان MDA در مقایسه با تیمار شاهد گردید. در زمان ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۴°C تیمارهای ۴۰ میکرومولار رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم و رزوراترول لودشده در NLC باعث کاهش میزان MDA در مقایسه با تیمار شاهد می‌شوند.

جدول ۸- اثر رزوراترول، رزوراترول لود شده در لیپوزوم، رزوراترول لود شده در NLC بر میزان MDA اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴°C

Table 8. The effect of resveratrol, resveratrol loaded in liposome and resveratrol loaded in NLC on MDA levels during storage at 4 ° C

تیمارها	µM	۰	۲۴	۴۸
کنترل	۰	۱/۶۸	۴/۰۱^{a}	۴/۴۵^{a}
رزوراترول	۲۰	۱/۵۶	۳/۳۵^{ab}	۳/۲۹^{abc}
	۴۰	۱/۵۱	۱/۸۱^{c}	۲/۳۳^{bc}
	۶۰	۱/۶۳	۴/۰^{a}	۴/۴۶^{a}
رزوراترول لودشده در لیپوزوم	۲۰	۱/۵۵	۲/۷۲^{abc}	۳/۴۶^{ab}
	۴۰	۱/۵۰	۱/۸۲^{c}	۲/۶۴^{bc}
	۶۰	۱/۶۰	۳/۶۵^{ab}	۴/۶۳^{a}
رزوراترول لودشده در NLC	۲۰	۱/۵۳	۲/۵۸^{bc}	۲/۹۳^{bc}
	۴۰	۱/۴۵	۱/۷۳^{c}	۱/۹۸^{c}
	۶۰	۱/۶۲	۳/۸۸^{ab}	۴/۴۴^{a}
SEM		۰/۱۵	۰/۲۷	۰/۲۸

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

نتایج این آزمایش نشان‌دهنده آن است که اضافه کردن ۴۰ میکرومول رزوراترول در محیط اسپرم طی نگهداری در دمای ۴°C باعث بهبود کیفیت اسپرم در طی انکوباسیون سرد اسپرم خروس می‌شود. در واقع نتایج نشان‌دهنده آن است که پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۴°C تأثیر تیمارهای آزمایشی افزایش یافته و از کاهش کیفیت اسپرم جلوگیری می‌کنند. از سوی دیگر، بهترین عملکرد در تیمارهای ۴۰ میکرومولار رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم و رزوراترول لودشده در NLC مشاهده شد.

در سال‌های اخیر، کاربرد نانو ذرات جهت محافظت و انتقال ترکیبات فعال زیستی به خصوص مواد کم‌محلول در آب از جمله کاروتنوئیدها، فیتواسترول‌ها، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. با پوشش‌دهی ترکیبات حساس و مواد ناپایدار مانند ویتامین‌های محلول در چربی در نانو ذرات، می‌توان از آنها محافظت کرده و همچنین این ترکیبات تا رسیدن به مناطق هدف، به صورت غیرفعال باقی خواهند ماند (۴۱). بنابراین به منظور انتقال مواد حساس باید از فرمولاسیون‌ها و ساز و کارهای خاصی بهره برد. بهبود قابلیت پخش‌پذیری و پایداری آنتی‌اکسیدان‌ها توسط وارد کردن آن‌ها در مقیاس نانو در ساختار حامل‌ها، روشی مؤثر در بهبود کارایی بیولوژیکی، بهبود ماندگاری و کنترل تحویل آن‌ها در مقدار تعیین شده به

مکان‌های مورد نظر بوده و از ایجاد اثرات جانبی احتمالی توسط آنتی‌اکسیدان‌ها جلوگیری می‌نماید. به علت حلالیت پایین بعضی آنتی‌اکسیدان‌ها در آب، عموماً توانایی محبوس شدن آن‌ها در ساختارهای نانوکپسولی بالا است که البته این امر خود به عوامل مختلفی از قبیل نوع نانو بستگی دارد. همچنین می‌توان گفت که اندازه ذرات نانو، نقش مهمی در فعالیت زیستی آنها دارد. به طورکلی، ذرات کوچک‌تر نانو، فعال‌تر از ذرات بزرگ نانو هستند (۷،۲۵). مطالعه حاضر نشان داد که رزوراترول توانایی جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو پس از سردسازی را دارد و می‌تواند در سالم نگهداشتن اسپرم خروس حین سرد سازی اسپرم خروس نیز مورد توجه قرار گیرد. فرض ما این بود که با توجه به خاصیت NLC که می‌تواند آنتی اکسیدان ها را بصورت هدفمند انتقال دهد، لود کردن رزوراترول بر روی NLC می‌توانست باعث افزایش اثرات آنتی‌اکسیدانی رزوراترول توسط این نانو ذرات، بدلیل افزایش ثبات آن شود. در پژوهش حاضر اگر چه استفاده فناوری نانو تاحدودی در بعضی از پارامترها عملکرد بهتری داشته داشته است ولی از نظر آماری استفاده از فناوری نانو تفاوت معنی‌داری با استفاده از آنتی اکسیدان نانو نشده نداشت.

به طور کلی افزایش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در مایع منی موجب پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب غشایی و در نتیجه کاهش حرکت اسپرم، غیرفعال‌سازی آنزیم‌های گلیکولیز، آسیب به غشای آکروزوم و اکسیداسیون DNA می‌شود. به همین دلیل اسپرم قادر به بارور کردن تخمک نبوده و ناباروری رخ می‌دهد. بارزترین اثر پراکسیداسیون لیپیدی در سلول‌ها، ایجاد اختلال در نظم و کار غشای سلول است، به طوری که روند انتقال یون‌ها دست‌خوش تغییر شده و در کار سلول اختلال ایجاد می‌شود. غشای اسپرم به دلیل داشتن مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع، مستعد پراکسیداسیون لیپیدی است (۲۰). هرچند اکسیژن برای بقای موجودات لازم است، ولی در فرآیندهای احیا و تبدیل اکسیژن به آب، چندین ماده سمی از جمله یون سوپر اکسید، پراکسیدهیدروژن و رادیکال هیدروکسیل در بدن تولید می‌شود. این ترکیب‌ها سازه‌های اکسیدکننده نیرومندی بوده و تهدیدی برای سلول‌های زنده به شمار می‌روند، زیرا می‌توانند سبب تخریب بخش‌های پروتئینی و لیپیدی سلول‌ها شوند. در واقع، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می‌تواند سبب پراکسیداسیون پروتئین‌های غشایی شود (۱۰). رادیکال‌های آزاد اکسیژن آثار مخربی بر فرآیندهای متابولیکی می‌گذارند و می‌توانند سبب آغاز پراکسیداسیون لیپید و تخریب ساختار DNA اسپرم و در پایان مرگ سلولی شوند (۱۵). در مطالعه حاضر، بیشترین جنبایی اسپرم در تیمارهای ۴۰ میکرومولار رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم و رزوراترول لودشده در NLC مشاهده شد.

تنها اسپرم‌های زنده و با غشای سالم هستند که می‌توانند واکنش آکروزومی را طی کرده و با نفوذ به لایه زوناپلوسیدا منجر به باروری تخمک شوند. از طرفی در طی نگهداری سرمایی منی در شرایط مایع و منجمد، میزان زنده‌مانی نمونه‌های اسپرم کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تأثیر رادیکال‌های آزاد بر ساختار غشای اسپرم باشد. یکی از علل اصلی آسیب‌پذیرتر بودن اسپرم‌های نگهداری شده در مقایسه با اسپرم‌های تازه به تنش‌های اکسیداتیو، کاهش سطوح داخل سلولی مواد آنتی‌اکسیدانی است (۲۸). بنابراین با افزایش زمان ذخیره‌سازی اسپرم‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد که در نتیجه منجر به پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد که این نتیجه با تحقیق حاضر مطابقت دارد. تورک و همکاران گزارش کردند در شرایط تنش اکسیداتیو، کانال کلسیمی موجود در لایه داخلی میتوکندری بسته می‌شود و در پی آن غلظت یون کلسیم درون‌سلولی افزایش یافته و زنجیره‌ای انتقال الکترون دستخوش تغییر می‌شود و این سبب تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول و افزایش پراکسیداسیون و افزایش غلظت MDA در سلول می‌شود (۳۹). در پژوهش حاضر اثرات مثبت و معنی‌دار ۴۰ رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم، رزوراترول لودشده در NLC بر زنده‌مانی اسپرم خروس، در عدم انطباق با مشاهدات گزارش شده توسط گدنی و همکاران بود. گدنی و همکاران (۱۹) تأثیر غلظت‌های مختلف رزوراترول (۰/۵، ۱ یا ۲ mM) بر اسپرم خوک را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که اضافه کردن دوزهای مختلف رزوراترول به محیط انجماد هیچ تأثیری بر زنده ماندن اسپرم و سلامت آکروزوم نداشت. این تفاوت می‌تواند بدلیل تفاوت بین گونه و رقیق‌کننده باشد.

در مطالعه حاضر، بیشترین یکپارچگی غشای پلاسمای با استفاده از ۴۰ میکرومولار رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم، رزوراترول لودشده در NLC به دست آمد. سیلوا و همکاران (۳۶) گزارش کردند که اضافه کردن رزوراترول قبل از انجماد، تأثیر معنی‌داری بر تحرک پیش‌رونده اسپرم، یکپارچگی غشا و یکپارچگی آکروزوم نداشت. اسپرم گونه‌های مختلف از نظر اندازه، شکل و ترکیبات لیپیدی متفاوت هستند و همه این سازه‌ها بر موفقیت انجماد تأثیر مهمی دارند. بنابراین یک روش موفق برای یک‌گونه خاص ممکن است برای گونه‌های دیگر مناسب نباشد. ترکیبات فسفولیپیدی، ترکیب اسیدهای چرب و میزان کلسترول موجود در غشای اسپرمی گونه‌های مختلف بر یخ زدن اسپرم اثر دارند (۲). انجماد اسپرم باعث ایجاد تغییرات بیوشیمیایی و آسیب‌های فیزیکی به اسپرم شده و جنبایی و زنده‌مانی اسپرم را کاهش می‌دهد (۱۶). به همین علت نرخ باروری با منی یخ‌زده به طور معنی‌داری نسبت به منی تازه پایین است. اسپرم نسبت به تغییرات فشار اسمزی حساس بوده که باعث عبور قسمت عمده‌ی آب به داخل سلول و در نتیجه آسیب غشای سلول می‌شود. اسپرم پرندگانی مثل خروس و بوقلمون حاوی مقدار زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در غشای پلاسما می‌باشد. همین امر دلیل اصلی و عمده حساس‌تر بودن اسپرم طیور نسبت به آسیب‌های ایجادشده توسط پراکسیداسیون لیپیدی است (۴۰). گزارش شده است که پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی احتمالاً با ایجاد تغییرات در سیالیت و یکپارچگی غشای پلاسمایی، منجر به کاهش جنبایی و باروری اسپرم ذخیره‌شده برای دوره‌های طولانی در

شرایط مایع و منجمد می‌شود. به نظر می‌رسد که استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بتوانند در کاهش نقص‌های آکروزومی و بهبود کیفیت اسپرم طی نگهداری مؤثر واقع شوند (۵،۶،۳۱). به منظور جلوگیری از این آسیب‌ها، سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی در مایع منی وجود دارند. سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی در پستانداران و پرندگان اهلی از سه سطح عمده دفاعی به نام‌های گلوتاتیون‌پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز تشکیل شده است؛ اما سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در پلاسمای منی پرندگان اهلی در تولیدمثل طبیعی، تنها برای مدت کوتاهی مؤثر است. پژوهش‌های گوناگون نشان داده‌اند که افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای منی می‌شود (۲۲،۳۵).

در این پژوهش اثر افزودن تیمارهای ۴۰ میکرومولار رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم و رزوراترول لودشده در NLC، سبب کاهش چشمگیری در غلظت MDA شد. بنابراین، به نظر می‌رسد که اثر آنتی‌اکسیدانی رزوراترول سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای منی و کاهش غلظت MDA منی شده باشد. لانگ گوباردی و همکاران (۲۱) تأثیر استفاده از رزوراترول بر پارامترهای باروری اسپرم بوفالو منجمد شده را مورد بررسی قرار دادند. پس از ارزیابی اولیه اسپرم، تیمارهای ۰/۵، ۱، ۱۰ و ۵۰ میکرومول رزوراترول را مورد آزمایش قرار دادند. بر اساس نتایج آزمایش، غلظت ۵۰ میکرومول برای ارزیابی‌های بیشتر، مانند یکپارچگی غشا، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، و سطوح پراکسیداسیون لیپید (LPO) انتخاب کردند. علاوه بر این، توانایی لقاح آزمایشگاهی با IVF ارزیابی قرار دادند. اختلاف بین گروه‌ها در میزان حرکت و زنده ماندن اسپرم ثبت نشد. با این حال، داده‌ها نشان داد که اثر وابسته به دوز رزوراترول بر وضعیت ظرفیت پذیری اسپرم، با افزایش دوز میزان ظرفیت پذیری ناشی از انجماد کاهش می‌یابد. بویژه، غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومول باعث کاهش میزان ظرفیت‌پذیری اسپرم می‌شود. جالب توجه است که رزوراترول باعث افزایش یکپارچگی غشاء می‌شود. علاوه بر این، هنگامی‌که IVF با استفاده از اسپرم تحت تیمار با ۵۰ میکرومول رزوراترول انجام شد، میزان لقاح طبیعی بطور قابل توجهی بهبود یافت. این محققین نتیجه گرفتند که استفاده از ۵۰ میکرومول رزوراترول باعث کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش میزان باروری می‌شود (۲۱). بوکاک و همکاران (۱۱) اثر رزوراترول بر پارامترهای اسپرم پس از انجماد اسپرم گاو را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، رزوراترول (۱ میلی مول) و کنترل مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این آزمایش نشان‌دهنده آن است که استفاده از رزوراترول باعث کاهش درصد اسپرم با DNA آسیب‌دیده نسبت به شاهد می‌شود. همچنین رزوراترول بر ویژگی‌های حرکت اسپرم بجز ALH، یکپارچگی آکروزوم، زنده ماندن اسپرم و پارامترهای استرس اکسیداتیو تأثیر نمی‌گذارد.

نتایج ما نشان‌دهنده آن است که استفاده از فناوری نانو باعث حفظ کیفیت اسپرم حین نگهداری در دمای ۴°C می‌شود. ۴۰ میکرومولار رزوراترول، رزوراترول لودشده در لیپوزوم و رزوراترول لودشده در NLC در حین نگهداری در دمای ۴°C اسپرم در زمان صفر، تاثیری رو پارامترهای اسپرم نداشت، ولی بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت باعث بهبود جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشا و کاهش پراکسیداسیون می‌شود.

منابع

1. Agarwal, A., S.A. Prabakaran, and T.M. Said. 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm. Journal of Andrology, 26: 654.
2. Aitken, R.J. and M.A. Baker. 2006. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. Molecular and cellular endocrinology, 250: 66-9.
3. Almeida, H., P. Lobao, C. Frigerio, J. Fonseca, R. Silva, A. Palmeira-de-Oliveira, J.M. Lobo, and M.H. Amaral. 2016. New thermoresponsive eyedrop formulation containing Ibuprofen loaded-nanostructured lipid carriers (NLC): development, characterization and biocompatibility studies. Current drug delivery, 13: 953-70.
4. Andrade, L.M., K.A. Rocha, F.A. De Sa, R.N. Marreto, E.M. Lima, T. Gratieri and S.F. Taveira. 2016. Voriconazole-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Ocular Drug Delivery. Cornea, 35: 866-71.
5. Askarianzadeh, Z., M. Sharafi and M.A.K. Torshizi. 2018. Sperm quality characteristics and fertilization capacity after cryopreservation of rooster semen in extender exposed to a magnetic field. Animal Reproduction Science, 198: 37-46.
6. Asl, R.S., F. Shariatmadari, M. Sharafi, M.A.K. Torshizi and A. Shahverdi. 2018. Dietary fish oil supplemented with vitamin E improves quality indicators of rooster cold-stored semen through reducing lipid peroxidation. Cryobiology, 84: 15-19.
7. Beloqui, A., M.Á. Solinís, A. Rodríguez-Gascón, A.J. Almeida, and V. Préat. 2016. Nanostructured lipid carriers: promising drug delivery systems for future clinics. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 12: 143-161.
8. Blesbois, E., I. Grasseau, and J. Blum. 1993. Effects of vitamin E on fowl semen storage at 4 C. Theriogenology, 39: 771-779.

9. Blokhina, O., E. Virolainen and K.V. Fagerstedt. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany, 91: 179-194.
10. Breininger, E., N.B. Beorlegui, C.M. O'Flaherty, and M.T. Beconi. 2005. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. Theriogenology, 63: 2126-2135.
11. Bucak, M.N., M.B. Ataman, N. Baspinar, O. Uysal, M. Taspinar, A. Bilgili, C. Ozturk, S. Gungor, M.E. Inanc and E. Akal. 2015. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. Andrologia, 47: 545-52.
12. Cecil, H., and M. Bakst. 1993. In vitro lipid peroxidation of turkey spermatozoa. Poultry science, 72: 1370-1378.
13. Daghigh Kia, H., Z. Blooki, H. Vaseghi Dodran and M. Mahdipour. 2017. Effect of Adding Coenzyme Q10 and Ellagic Acid during Cryopreservation on Post-Thaw Quality of Ram Semen. Iranian Journal of Applied Animal Science, 7: 445-451.
14. Donoghue, A.M. and G.J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. Animal Reproduction Science, 62: 213-232.
15. Donoghue, A.M. and D.J. Donoghue. 1997. Effects of water-and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. Poultry Science, 76: 1440-1445.
16. Fattah, A., M. Sharafi, R. Masoudi, A. Shahverdi, V. Esmaeili and A. Najafi. 2017. l-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. Cryobiology, 74: 148-153.
17. Fujihara, N. and B. Howarth Jr. 1978. Lipid peroxidation in fowl spermatozoa. Poultry science, 57: 1766-1768.
18. Fujihara, N. and O. Koga. 1984. Prevention of the production of lipid peroxide in rooster spermatozoa. Animal Reproduction Science, 7: 385-390.
19. Gadani, B., D. Bucci, M. Spinaci, C. Tamanini and G. Galeati. 2017. Resveratrol and Epigallocatechin-3-gallate addition to thawed boar sperm improves in vitro fertilization. Theriogenology, 90: 88-93.
20. Kothari, S., A. Thompson, A. Agarwal and S.S. du Plessis. 2010. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. Indian Journal of Experimental Biology, 48: 425-35.
21. Longobardi, V., G. Zullo, A. Salzano, C. De Canditiis, A. Cammarano, L. De Luise, M.V. Puzio, G. Neglia and B. Gasparrini. 2017. Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. Theriogenology, 88: 1-8.
22. Masoudi, R., M. Sharafi, A.Z. Shahneh and M. Khodaei-Motlagh. 2019. Effects of reduced glutathione on the quality of rooster sperm during cryopreservation. Theriogenology, 128: 149-155.
23. Mehdipour, M., H.D. Kia, M. Nazari and A. Najafi. 2017. Effect of lecithin nanoliposome or soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw flow cytometric, microscopic and oxidative parameters in ram semen. Cryobiology, 78: 34-40.
24. Mehdipour, M., H. Daghigh Kia, G. Moghaddam and H. Hamishehkar. 2018. Effect of egg yolk plasma and soybean lecithin on rooster frozen-thawed sperm quality and fertility. Theriogenology, 116: 89-94.
25. Müller, R., R. Petersen, A. Hommoss and J. Pardeike. 2007. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. Advanced Drug Delivery Reviews, 59: 522-530.
26. Müller, R.H., M. Radtke and S.A. Wissing. 2002. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. Advanced Drug Delivery Reviews, 54: S131-S155.
27. Najafi, A., H.D. Kia, H. Mohammadi, M.H. Najafi, Z. Zanganeh, M. Sharafi, F. Martinez-Pastor and H. Adeldust. 2014. Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. Cryobiology, 69: 68-73.
28. Najafi, A., H. Daghigh Kia, M. Mehdipour, M. Shamsollahi and D.J. Miller. 2019. Does fennel extract ameliorate oxidative stress frozen-thawed ram sperm? Cryobiology, 87: 47-51.

29. Najafi, A., R.A. Taheri, M. Mehdipour, F. Martínez-Pastor, A.A. Rouhollahi and M.R. Nourani. 2019. Improvement of post-thawed sperm quality in broiler breeder roosters by ellagic acid-loaded liposomes. Poultry Science, 98: 440-446.
30. Najafi, A., H.D. Kia, M. Mehdipour, H. Hamishehkar and M. Álvarez-Rodríguez. 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
31. Najafi, A., R.A. Taheri, M. Mehdipour, G. Farnoosh and F. Martinez-Pastor. 2018. Lycopene-loaded nanoliposomes improve the performance of a modified Beltsville extender broiler breeder roosters. Animal Reproduction Science, 195: 168-175.
32. Najafi, D., R.A. Taheri, A. Najafi, M. Shamsollahi and M. Alvarez-Rodriguez. 2020. Effect of astaxanthin nanoparticles in protecting the post-thawing quality of rooster sperm challenged by cadmium administration. Poultry science, 99: 1678-1686.
33. Röpke, T., H. Oldenhof, C. Leiding, H. Sieme, H. Bollwein and W. Wolkers. 2011. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. Theriogenology, 76: 1465-1472.
34. Safa, S., G. Moghaddam, R.J. Jozani, H.D. Kia and H. Janmohammadi. 2016. Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. Animal Reproduction Science, 174: 100-106.
35. Sharideh, H., M. Zhandi, S. Zenioaldini, M. Zaghari and M. Sadeghi. 2019. The effect of coenzyme Q10 on rooster semen preservation in cooling condition. Theriogenology, 129: 103-109.
36. Silva, E.C., J.F. Cajueiro, S.V. Silva, P.C. Soares and M.M. Guerra. 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. Theriogenology, 77: 1722-6.
37. Song, J., X. Fan, and Q. Shen. 2016. Daidzein-loaded nanostructured lipid carriers-PLGA nanofibers for transdermal delivery. International journal of pharmaceutics, 501: 245-252.
38. Surai, P., I. Kostjuk, G. Wishart, A. Macpherson, B. Speake, R. Noble, I. Ionov and E. Kutz. 1998. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. Biological trace element research, 64: 119-132.
39. Türk, G., A. Ateşşahin, M. Sönmez, A. Yüce and A.O. Çeribaşi. 2007. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. Theriogenology, 67: 778-785.
40. Zhandi, M., A. Talebnia, A. Towhidi, M. Sharafi, A.R. Yousefi, and S.M.H. Hussaini. 2019. The effect of zinc oxide on rooster semen cryopreservation. British Poultry Science, 61: 188-194.
41. Zhao, S., V. Minh le, N. Li, V.M. Garamus, U.A. Handge, J. Liu, R. Zhang, R. Willumeit-Romer and A. Zou. 2016. Doxorubicin hydrochloride-oleic acid conjugate loaded nanostructured lipid carriers for tumor specific drug release. Colloids Surf B Biointerfaces, 145: 95-103.

The Effect of Resveratrol Antioxidant in Nano Liposome and NLC Forms in Rooster Semen Extender During Storage at 4˚C

Abouzar Najafi[1], Hossein Daghigh Kia[2] and Mahdiyeh Mehdipour[3]

1- Assistant ProfeesorDepartment of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, (Corresponding Author: daghighkia@tabrizu.ac.ir)
3- Graduated PhD in Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
Received: January 7, 2021 Accepted: June 12, 2021

Abstract

The purpose of this study was to investgate resveratrol nano-protected antioxidant on rooster sperm. In this study, resveratrol was used in the forms of nano-protected (liposome and NLC) and plain in the semen extender. Immediately after the semen collection and for primary evaluations, for eliminating of individual effects the semen collected from 15 roosterswere pooled and added to the extender. Extending was done at 37 °C at a dilution ratio of 1:20. Different concentarions of resveratrol (20, 40 or 60 μM) were added to the extender in three forms of plain, NLC, and liposome. After diluting the semen, gradual cooling was carried out for 3 h at 4 °C. After the cooling process, the kinetic parameters (CASA), membrane integrity (HOST), viability, lipid peroxidation (MDA), abnormal sperm, were evaluated. The results at 24 and 48 hours at a temperature of 4°C indicate that the use of 40 μM resveratrol, resveratrol loaded in the liposome, and resveratrol loaded in the NLC improved the motility, progressive sperm motility, viability, and membrane integrity compared to the control group. The results of this experiment indicated that 40 μM resveratrol, resveratrol loaded in liposome and resveratrol loaded in NLC improved most of the evaluated parameters.

Keywords: Cryopreservation, Nano, Resveratrol, Rooster sperm