Iranian Journal of Animal Science
Vol 51, No 2, Summer 2020 (91-101)
DOI: 10.22059/ijas.2020.285074.653720

علوم دامی ایران
دورۀ ۵۱، شمارۀ ۲، تابستان ۱۳۹۹ (ص ۱۰۱-۹۱)

اثر سطوح مختلف گلوتاتیون درون‌پوشانی‌شده بر کیفیت انجماد اسپرم گاو

طوبی ندری[۱]، سعید زین‌الدینی[۲*]، آرمین توحیدی[۳]، غلامحسین ریاضی[٤]، مهدی ژندی[۲] و محسن شرفی[۵]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری فیزیولوژی دام، دانشیار و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
٤. استاد، گروه بیوشیمی، دانشگاه تهران
۵. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/٤/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۰)

چکیده

هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر سطوح مختلف گلوتاتیون احیا در رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم گاو پس از فرایند انجماد و ذوب بود. در پژوهش حاضر، رقیق‌کننده حاوی نانولیپوزوم‌های غنی‌شده با چهار سطح صفر، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار آنتی اکسیدان گلوتاتیون بود. لیپوزوم‌های حاوی گلوتاتیون با استفاده از روش فیلم نازک تهیه شد. اندازه ذرات با استفاده از دستگاه سونیکاتور به ابعاد نانو کاهش یافت. چهل انزال طی شش هفته از شش راس گاو نر هلشتاین جمع‌آوری و مورد انجماد قرار گرفت. صفات مورد ارزیابی پس از انجماد و ذوب شامل، فراسنجه‌های جنبایی، فعالیت غشا و یکپارچگی غشا و ریخت‌شناختی اسپرم بود. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از ۱ میلی‌مولار گلوتاتیون جنبایی کل و جنبایی پیشرونده را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (۱/۷±٤۷/۵ و ۲±۳۲/۷ درصد)، اگرچه، تفاوت معنی‌داری با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار نداشت (۱/۷±٤۵/۰ و ۲±۲٦/۲ درصد). همچنین، غلظت ۲/۵ میلی‌مولار بالاترین میزان یکپارچگی و سلامت غشا را نشان داد، اما تفاوت معنی‌داری با غلظت ۱ میلی‌مولار نشان نداد. با این‌حال، ۵ میلی‌مولار گلوتاتیون درون پوشانی شده سبب کاهش فراسنجه‌های کیفی اسپرم شد. بنابراین، استفاده از سطح ۱ میلی‌مولار گلوتاتیون به شکل درون‌پوشانی شده در رقیق‌کننده می‌تواند حفاظت بهتری از اسپرم گاو نسبت به سایر سطوح به عمل آورد.

واژه‌های کلیدی: انجماد، درون‌پوشانی، گلوتاتیون، منی گاو، نانو ذرات.

Effect of different levels of encapsulated glutathione on cryopreservation of bull sperm

Touba Nadri[1], Saeed Zeinoaldini[2]*, Armin Towhidi[3], Gholam Hossein Riazi[4], Mahdi Zhandi[2] and Mohsen Sharafi[5]
1, 2, 3. Ph.D. Candidate of Animal Physiology, Associate Professor and Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. Professor, IBB Center, University of Tehran, Tehran, Iran
5. Assistant Professor of Animal Physiology, Department of Animal Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
(Received: Jul. 21, 2019 - Accepted: Feb. 9, 2020)

ABSTRACT

This study was designed to evaluate the effects of encapsulated reduced glutathione added to extender on the quality of bull sperm after freezing and thawing process. Extender contains lecithin nanoliposomes supplemented with different concentrations of glutathione (0, 1, 2.5 and 5 Mm concentration). The supplemented nanoliposomes with glutathione were prepared by thin-film preparation method. The particle size decreased to nanometer by sonication. 40 ejaculations were collected from 6 Holstein bulls and frozen for 6 weeks. Evaluated characteristics after freezing and thawing process were kinetic parameters (CASA), membrane activity (HOST), membrane integrity (eosin-nigrosin) and morphology of sperm (Hancock's solution). Results showed that level 1 mM significantly increased the total and progressive motility (47.5±1.7, 32.7±2 %). Although, there was no significant difference with level 2.5 mM glutathione (45.0±1.7, 26.2±2 %). Also, the concentration of 2.5 mM showed the highest value of cell membrane integrity and cell membrane functionality but did not differ with the concentration of 1mM. However, supplementation of nanoliposomes with 5 mM glutathione reduced the quality of post-thaw sperm. Thus, level 1 M encapsulated glutathione can provide better protection compare to the other level of that for bull sperm.

Keywords: Bull semen, encapsulation, freezing, glutathione, nanoparticels.

* Corresponding author E-mail: Zeinoaldini@ut.ac.ir

مقدمه

انجماد اسپرم روشی است که به‌طور گسترده در تکنیک‌های کمک‌باروری، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Said *et al*., 2010). انجماد اسپرم گاو به‌عنوان یک ابزار حیاتی در صنعت دام، به‌خصوص در رابطه با انتشار مواد ژنتیکی با ارزش استفاده می‌شود (Said *et al*., 2010; Bucak *et al*., 2010). همچنین انجماد اسپرم به‌عنوان ابزار مفیدی برای مطالعات لقاح آزمایشگاهی، جنین‌شناسی و تلقیح مصنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این‌حال، حفظ انجمادی اسپرم آسیب‌های غیر قابل برگشت و فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی را در غشای اسپرم و همچنین غشای میتوکندری و هسته به وجود می‌آورد که در نتیجه آن زنده‌مانی اسپرم بعد از انجماد-ذوب تحت تأثیر قرار می‌گیرد. این آسیب‌ها شامل آسیب به غشاهای اسپرم (غشای پلاسمایی، آکروزومی و غشای میتوکندری)، اسکلت سلولی و هسته، قطعه قطعه شدن و آسیب به DNA است. غشاهای پلاسمایی، آکروزومی و میتوکندریایی در طی فرآیند انجماد- ذوب آسیب‌پذیری بیشتری از خود نشان می‌دهند. طی انجماد اسپرم، کاهش جنبایی، تغییر در الگوی حرکت اسپرم، کاهش نرخ متابولیکی اسپرم، کاهش یا افزایش ترکیبات درون سلولی و کاهش سرعت انتقال اسپرم به جایگاه لقاح دیده می‌شود (Thomson *et al*., 2010)، در چنین شرایطی نرخ آبستنی کاهش می‌یابد (Sakkas & Alvaresz, 2010). در واقع در اثر آسیب ساختار غشای پلاسمایی اسپرم، باروری پایین‌تری در تلقیح مصنوعی در اکثر گونه‌ها در مقایسه با منی تازه وجود دارد. علاوه بر این، یک اسپرم با ریخت‌شناختی طبیعی لزوماً داری ژنوم با کیفیت نیست و ممکن است نرخ آبستنی را کاهش داده و منجر به مرگ زودرس رویان گردد (Sakkas & Alvaresz, 2010). در چنین مواردی، پس از یک تلقیح مصنوعی، به علت عدم رشد و تکامل رویان و با شکست آبستنی، علاوه بر هزینه و نیروی کار برای سرویس مجدد، خسارت ناشی از مدت زمانی که تا فحلی مجدد باید طی شود تا گاو را تلقیح کرد را به دنبال خواهد داشت. که این امر تنها با استفاده از تعداد بیشتر اسپرم در هر بار و افزایش دفعات تلقیح مصنوعی قابل جبران است (Salamon & Maxwell, 2000). لذا، جهت افزایش زنده‌مانی و سلامت اسپرم لازم است که از راه‌کارهای جدیدی جهت تحقق این امر استفاده شود.

گلوتاتیون (GSH) مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان تنظیم‌کننده رادیکال‌های آزاد از نوع گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS)[1] است (Meister, 1994). طی فرایند انجماد، سطح گلوتاتیون داخل سلولی کاهش و سطح ROS افزایش می‌یابد که منجر به کاهش زنده مانی سلول می‌شود (Gadea *et al*., 2011). رادیکال‌های آزاد می‌توانند با اکسیدکردن گلوتاتیون و یا انتقال آن به خارج سلول، سبب کاهش گلوتاتیون در داخل سلول و در نتیجه شروع آبشارهای آپوپتوز شوند (Circu & Aw, 2012). بنابراین، تعادلی بین تولید ROS و خنثی‌سازی آن طی فرایند انجماد برای عملکرد و زنده‌مانی اسپرم نیاز است. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که افزودن گلوتاتیون به رقیق‌کننده انجمادی اسپرم اسب (de Oliveira *et al*., 2013)، گاو (Triwulanningsih *et al*., 2010)، بز (Gardón *et al*., 2006)، خوک (Estrada *et al*., 2017)، و اسپرم سگ (Ogata *et al*., 2015) باعث بهبود کیفیت اسپرم پس از فرایند انجماد و ذوب شده است. برای به حداکثر رساندن این اثر محافظتی وجود GSH در دو طرف غشای سلول ضروری می‌باشد. بنابراین، داشتن حاملی همانند لیپوزوم که بدون سمیت برای سلول بتواند به غشای اسپرم متصل شود و محتویات انکپسوله‌شده در خود را وارد سلول نماید ضروری می‌باشد.

مطالعاتی نشان داده‌اند که نانو ذرات لسیتین سویا در اندازه ذرات نانویی (۹۴ نانومتر) در مقایسه با زرده تخم مرغ عملکرد خوبی در حفاظت از اسپرم بز طی فرآیند انجماد و ذوب داشتند و می‌توانند جایگزین مناسبی برای زرده تخم مرغ در انجماد اسپرم بز باشند (Nadri *et al*., 2019). لیپوزوم‌ها از دو لایه‌ی فسفولیپیدی منظم، مشابه با فسفولیپیدهای غشای سلول ساخته شده‌اند که در محلول‌های آبی به دلیل خاصیت آب‌گریز بودن به‌صورت ساختارهای دو لایه شکل گرفته و تمایل دارند به شکل وزیکول درآیند از

1. Reactive oxygen species

لیپوزوم‌ها می‌توان به‌عنوان الگوهای ساده برای ارزیابی عملکردهای غشای زیستی از جمله نفوذپذیری، ثبات و یکپارچگی غشای سلول استفاده کرد (Belala *et al*., 2016). افزودن لیپوزوم‌ها به رقیق‌کننده می‌تواند راه‌کار سازنده‌ای در بهبود اثر رقیق‌کننده‌های انجماد اسپرم باشد. لیپوزوم‌ها می‌توانند به‌صورت مصنوعی در اندازه و با ترکیب‌های فسفولیپیدی مختلف ساخته شوند. بنابراین، لیپوزوم‌ها می‌توانند جایگزین مناسبی برای رقیق‌کننده‌های انجمادی باشند. از طرفی، پایداری و نیمه عمر آنتی اکسیدان‌ها عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها را طی فرایند انجماد و ذوب تحت تأثیر قرار می‌دهد (Niki, 2014). لیپوزوم‌ها می‌توانند داروها و آنتی‌اکسیدان‌های آب‌دوست و آب گریز را در خود کپسوله کنند و علاوه بر آزادسازی آهسته این مواد، سبب افزایش قابلیت دسترسی و پایداری آنها شوند (Chapman *et al*., 1995).

مطالعات مختلف اثر لیپوزوم‌ها را بر انجمادپذیری اسپرم گونه‌های مختلف بررسی کرده‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که لیپوزوم‌ها می‌توانند طی فرآیند سردسازی از اسپرم محافظت نمایند (Belala *et al*., 2016). تاکنون پژوهشی به‌منظور بررسی اثر نانولیپوزوم‌های حاوی سطوح مختلف گلوتاتیون بر انجمادپذیری اسپرم گاو صورت نگرفته است بنابراین، هدف از این پژوهش ساخت نانولیپوزوم‌های حاوی سطوح مختلف گلوتاتیون و بررسی اثر آن‌ها بر انجمادپذیری و کیفیت اسپرم گاو پس از فرایند انجماد و ذوب بود.

مواد و روش‌ها

لسیتین سویا و گلوتاتیون احیا از شرکت سیگما آلدریچ (St. Louis, MO, USA) و دیگر مواد شیمیایی از مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شد.

جمع‌آوری منی

در این پژوهش، از شش رأس گاو نر هلشتاین (شرایط نگهداری و تغذیه‌ایی یکسان) که در مرکز تولید اسپرم گاو شرکت نهاده‌های دامی جاهد کرج نگهداری می‌شدند استفاده شد. شش انزال از هر دام طی شش نوبت با استفاده از واژن مصنوعی، جمع‌آوری شد. این آزمایش به‌صورت دو بار در هفته و به‌مدت سه هفته تکرار شد. نمونه‌های منی اولیه از نظر رنگ، حجم، غلظت، جنبایی و ریخت‌شناختی ارزیابی شدند. نمونه‌های با جنبایی ≥۷۰٪، غلظت ≥۹۰۰×۱۰^{۶} اسپرم در هر میلی‌لیتر و ریخت شناختی غیر طبیعی ≤ ۱۵ درصد استفاده شد. به‌منظور حذف اثرات فردی، نمونه‌ها با هم مخلوط و به چهار قسمت مساوی تقسیم و تیمارهای آزمایشی روی آنها اعمال شد. در این آزمایش تیمار های آزمایشی شامل: لیپوزوم‌های بدون گلوتاتیون (Blankliposome)، لیپوزوم‌های حاوی ۱ میلی‌مولار گلوتاتیون (EG-1)، لیپوزوم‌های حاوی ۲/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون (EG-2.5) و لیپوزوم‌های حاوی ۵ میلی‌مولار گلوتاتیون (EG-5) بودند. غلظت نهایی اسپرم در هر پایوت ۲۳×۱۰^{۶} سلول اسپرم بود.

آماده‌سازی رقیق‌کننده‌ها

بافر پایه حاوی ۲۴۹/۲۹mM تریس، ۶۹/۳۸ mM فروکتوز و ۸۸/۴۸ mM اسیدسیتریک بود. اسمولاریته و pH به‌ترتیب ۳۰۰ mOsm/kg و ۷/۲ تنظیم و گلیسرول به مقدار ۵٪ (v/v) به بافر پایه اضافه شد. به‌منظور ساخت رقیق‌کننده پایه، لسیتین سویا به مقدار ۳ درصد (w/v) به بافر در دمای ۱۵ °C اضافه شد. سوسپانسیون به آرامی و به‌مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از شیکر مخلوط شد. سپس به‌منظور تهیه نانومیسل در محدوده اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ nm، نمونه‌ها داخل ظرف حاوی آب یخ قرار داده شد و به‌مدت ۴۵ دقیقه سونیکیت[۱] شدند (Nadri *et al*., 2019).

برای تهیه نانولیپوزوم از روش تهیه فیلم نازک استفاده شد (Belala *et al*., 2016). برای ساخت لیپوزوم لسیتین سویا به مقدار ۳ درصد (w/v) در حلال آلی مناسب (کلروفرم) حل شد. در اثر تبخیر حلال در دستگاه روتاری فیلم نازک تشکیل و با افزودن بافر به تدریج وزیکول‌های لیپیدی تشکیل شد. برای کوچک‌تر و یکنواخت‌شدن اندازه لیپوزوم‌ها از پروب سونیکاتور به‌مدت ۴۵ دقیقه استفاده و لیپوزوم‌هایی با اندازه کوچک و منظم (کمتر ۱۰۰

۱. سونیکاتور پروب‌دار مکانیکی تاپسونیک، ایران

نانومتر) ساخته شد. اندازه ذرات با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS)[1] ارزیابی شد. رقیق‌کننده حاوی نانولیپوزوم تهیه شد. ساختار نانولیپوزوم‌های ساخته‌شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی[2] و به روش رنگ‌آمیزی منفی بررسی شد.

منی در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به هریک از تیمارهای آزمایش اضافه شد و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس نمونه‌ها به آرامی و به‌مدت ۴ ساعت از دمای ۳۷ تا ۴ درجه سانتی‌گراد سرد شدند. سپس نمونه‌های سرد شده به داخل پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتر (Biovet, L'Agile France) کشیده و با فاصله ۴سانتی‌متر بالای بخار ازت به‌مدت ۱۲ دقیقه قرار داده شد. سپس پایوت‌ها داخل ازت غوطه ور شدند. پس از مدت دو ماه، پایوت های منجمد شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه ذوب و مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی الگوهای حرکتی سرعت اسپرم پس از انجماد و ذوب

به‌منظور ارزیابی جنبایی کل، جنبایی پیشرونده و الگوهای حرکتی اسپرم، از هر تیمار آزمایشی تعداد سه پایوت در آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه ذوب و با هم مخلوط شدند. سپس مقدار ۵ µl از هر نمونه مخلوط شده را روی لام از پیش گرم شده گذاشته و با استفاده از نرم‌افزار کاسا (سامانه رایانه‌ای ارزیابی اسپرم[3]) ارزیابی شد. تنظیمات مورد استفاده برای این نرم‌افزار در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. تنظیمات ارزیابی کامپیوتری اسپرم (نرم‌افزار CASA)

Table 1. Setup for computer-assisted analysis (CASA) of bovine sperm

Parameters	Set value
Calibration	20 x
Frame Rate	50
Chamber Depth	20 µm
Magnification	200 X
Minimum contrast	60 Pixels
Minimum VCl mean	15 µm/s
Minimum STR mean	0.7 µm/s
Minimum ALH mean	0.3 µm/s

1. Dynamic Light Scattering
2. TEM; Zeiss Em10C, Oberkochen, Germany
3. CASA, Video Test-Sperm 2.1, St. Petersburg, Russia

ارزیابی زنده‌مانی اسپرم

زنده‌مانی اسپرم با روش رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین ارزیابی شد. ترکیب رنگ شامل: ۱/۶۷ گرم ائوزین-Y، ۱۰ گرم نیگروزین و ۲/۹ گرم سدیم سیترات در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. مقدار ۵ µl از هر نمونه را با ۱۰ µl از رنگ ائوزین-نیگروزین مخلوط و از آن یک گسترش تهیه شد. یکپارچگی اسپرم با شمارش ۲۰۰ سلول با استفاده میکروسکوپ فاز کنتراست[4] بررسی شد. اسپرم‌هایی که کاملاً رنگ گرفته باشند را به‌عنوان اسپرم با عدم یکپارچگی در غشا و اسپرم‌هایی که رنگ نگرفته باشند به‌عنوان اسپرم با غشای یکپارچه شمارش شدند (Bucak *et al*., 2007).

ارزیابی فعالیت غشای اسپرم

به‌منظور بررسی فعالیت غشای اسپرم از تست هاست استفاده شد. این تست بر اساس وجود اسپرم‌های با دم گره خورده در محلول هایپواسموتیک است. این روش با انکوبه کردن ۱۰µl از نمونه منی با ۱ ml از محلول هایپواسموتیک با اسمولاریته ۱۰۰mOsm/L (۵۷/۶ mM فروکتوز و ۱۹/۲mM سدیم سیترات) در دمای ۳۷ و به‌مدت ۶۰ دقیقه در انکوبه شد (Schäfer & Holzmann, 2000). مخلوط را هموژن و با استفاده میکروسکوپ نوری ارزیابی شد. حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوا به‌صورت تصادفی شمارش شد و درصد اسپرم‌های با دم پیچ خورده و اسپرم‌های سالم ثبت شدند.

ارزیابی ریخت‌شناختی اسپرم

به‌منظور بررسی ریخت‌شناختی اسپرم پس از انجماد و ذوب، مقدار ۱۰ µl از نمونه منی را درون میکروتیوب ۱/۵ mL حاوی ۱ mL محلول هانکوک (حاوی ۶۲/۵ mL فرمالین(۳۷۵فرمالدهید)، ۱۵۰ mL محلول سدیم سالین، ۱۵۰ mL محلول بافر و ۱۵۰mL آب مقطر) پیپت شد (Najafi *et al*., 2013). درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناختی غیر طبیعی را با شمارش ۲۰۰ اسپرماتوزوا و با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست[5] شمارش شد.

4. CKX41; Olympus, Tokyo, Japan

Japan [5] CKX41; Olympus, Tokyo,

ارزیابی واکنش آکروزومی اسپرم

برای انجام تست واکنش آکروزوم اسپرم، ۵ میکروگرم از نمونه منی با ۱۰۰ میکرولیتر اتانول (خلوص ۹۶ درصد) مخلوط شد. پس از ۱۵ دقیقه، ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم با ۳۰ میکرولیتر از PSA بر روی یک لام گذاشته شد و ۲۰۰ اسپرم با میکروسکوپ فلورسنت با بزرگنمایی ۴۰۰ و فیلتر FITC (excitation at 455-500 nm and emission at 560-570 nm) شمارش شد. در این روش، اسپرم‌های با سر سبزرنگ به‌عنوان اسپرم با آکروزوم سالم شمارش شدند و اسپرم‌هایی که رنگ فلورسنت نگرفته بودند به‌عنوان اسپرم آسیب‌دیده یا آکروزوم ناقص شمارش شدند (Sharafi *et al*., 2015).

آنالیز آماری

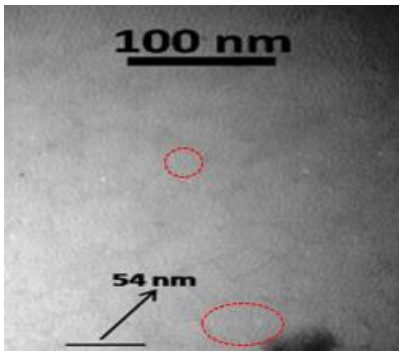
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 9.1, 2002, Cary, NC, USA) آنالیز شد. این آزمایش در قالب شش تکرار انجام و آزمون نرمالیتی داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk انجام گردید. تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی بررسی و داده‌ها به صورت میانگین± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده‌اند. مدل آماری برای تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌صورت $Yij= \mu + Ti + eij$ بود، که در آن Yij: مقدار هر مشاهده، μ: اثر میانگین، Ti: اثر تیمارهای آزمایشی، eij: آثار باقیمانده هستند.

نتایج آزمایش

در این پژوهش، نانولیپوزوم‌ها با موفقیت ساخته شدند و در رقیق‌کننده انجماد اسپرم استفاده شدند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از ساختار نانولیپوزوم‌ها و پوشش اسپرم پس از فرآیند انجماد و ذوب نشان داده شده است (شکل‌های ۱ و ۲).

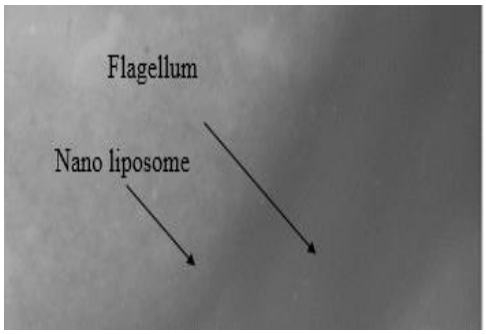
ارزیابی جنبایی و فراسنجه‌های حرکتی اسپرم پس از انجماد و ذوب

نتایج این پژوهش نشان داد سطح ۱ میلی‌مولار گلوتاتیون جنبایی کل و جنبایی پیشرونده را به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش داد (به‌ترتیب ۱/۷±۴۵/۵ و ۲/۰±۳۲/۷ درصد) اگرچه، با تیمار حاوی ۲/۵ میلی‌مولار (به‌ترتیب ۱/۷±۴۵/۰ و ۲/۰±۲۶/۲ درصد) تفاوت معنی‌داری نداشت. در این آزمایش، VSL (سرعت اسپرم در خط مستقیم) در سطح ۵ میلی‌مولار گوتاتیون پایین‌ترین درصد (۱/۵±۲۰/۲ درصد) را نشان داد. سایر فراسنجه‌های جنبایی در این پژوهش تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند (جدول۲).



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانولیپوزوم‌های ساخته‌شده قبل از فرایند انجماد و ذوب.

Figure 1. TEM imaging of prepared nanoparticles before freezing and thawing process



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی از تعامل و پوشش دم اسپرم با نانولیپوزوم‌ها پس از فرایند انجماد و ذوب

Figure 2. TEM imaging of interaction and coating between sperm flagellum with nanoliposomes after freezing and thawing process

در این آزمایش فراسنجه‌های جنبایی اسپرم شامل VSL= سرعت اسپرم در خط مستقیم، VCL= سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی‌شده، VAP= میانگین سرعت در مسیر مستقیم، LIN= معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد، STR= معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد، ALH= بیشترین دامنه حرکت‌های جانبی بر حسب میکرومتر بود.

جدول ۲. نتایج ویژگی‌های حرکتی و فراسنجه‌های جنبایی اسپرم گاو در تیمارهای مختلف پس از فرآیند انجماد و ذوب نتایج به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است (P<۰/۰۵). Blankliposome: لیپوزوم‌های بدون گلوتاتیون، EG-1(encapsulated glutathione -1)7: لیپوزوم‌های حاوی ۱ میلی‌مولار گلوتاتیون، EG-2.5: لیپوزوم‌های حاوی ۲/۵ میلی مولار گلوتاتیون و EG-5: لیپوزوم‌های حاوی ۵ میلی مولار گلوتاتیون.

Table 2. Results of motility properties and speed parameters of bull sperm in different treatments after freezing and thawing. Results are shown as SEM ± mean (P<0.05). Blank liposome: Liposomes without glutathione, EG-1 (encapsulation glutathione-1): Liposome supplement 1 mM glutathione, EG-2.5: Liposome supplement 2.5 mM glutathione, EG-5: Liposome supplement 5 mM glutathione.

Variable (unit)	Blank liposome	Extenders			
		EG-1	EG-2.5	EG-5	SEM
Total motility (%)	38.5[b]	47.5[a]	45.0 [ab]	38.7[b]	1.7
Progressive Motility (%)	22.2[b]	32.7[a]	26. 2[ab]	20.7[b]	2.0
VSL (µm/s)	23.0[ab]	27.0[a]	22.2[ab]	20.2 [b]	1.5
VCL (µm/s)	86.0	88.0	85.7	92.5	3.7
VAP (µm/s)	39.2	31.0	29.7	35.5	3.1
STR (%)	53.5	49.0	49.0	45.0	4.0
LIN (%)	20.5	23.7	20.2	19.7	1.2
ALH (µm)	2.9	2.6	2.2	2.1	0.3
BCF (Hz)	16.2	16	16	15.7	1.2

حروف کوچک (a و b) در ردیف‌ها نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در تیمارهای مختلف است.

The small letters (a and b) in the rows indicate a significant difference in different treatments.

ارزیابی فعالیت غشا پس از انجماد و ذوب

همان‌طورکه در جدول ۳ نشان داده شده است نتایج حاصل از آزمون هاست نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر سلامت و فعالیت غشای سلول بین تیمارهای آزمایشی وجود نداشت اگرچه، تیمارهای آزمایشی حاوی لیپوزوم‌های غنی شده با گلوتاتیون میانگین بالاتری نسبت به تیمار شاهد داشتند.

ارزیابی زنده‌مانی پس از انجماد و ذوب

نتاج حاصل از رنگ‌آمیزی اِئوزین- نیگروزین در جدول۳ آورده شده است. نتایج این ارزیابی نشان داد که سطوح ۱ و ۲/۵ میلی‌مولار بالاترین درصد زنده مانی را داشتند (به‌ترتیب ۴۴/۵±۵/۷ و ۴۶/۵±۵/۷ درصد) و با سطح صفر میلی‌مولار اختلاف معنی‌داری نشان دادند (۳۶/۰±۵/۷ درصد) اگرچه، تفاوت معنی‌داری بین این دو تیمار مشاهده نشد.

ارزیابی ریخت‌شناختی اسپرم پس از انجماد و ذوب

نتایج به‌دست‌آمده از این ارزیابی ریخت‌شناختی اسپرم نشان داد که ریخت‌شناختی اسپرم تحت تأثیر تیمارهای مختلف قرار نگرفت، اگرچه تیمار EG-2.5 بیشترین درصد اسپرم با ریخت‌شناختی طبیعی را داشت (۷۰/۵±۱/۵درصد).

ارزیابی واکنش آکروزومی اسپرم پس از انجماد و ذوب

نتایج حاصل از ارزیابی واکنش آکروزومی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج این ارزیابی نشان داد که، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود نداشت.

بحث

وجود محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع در غشای سلولی اسپرم پستانداران، آن‌ها را مستعد افزیش سطح رادیکال‌های آزاد (Bucak *et al*., 2007) در سلول و وارد آمدن آسیب‌هایی به سلول طی فرآیند انجماد و ذوب می‌کند. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که فرآیند انجماد سبب کاهش میزان آنتی‌اکسیدان‌های داخل سلولی از جمله سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون احیا می‌شود (Bilodeau *et al*., 2000). مطالعات اخیر بر روی اسپرم گاو و انسان نشان داده‌اند که فرآیند انجماد سبب کاهش سطح گلوتاتیون داخل سلولی به‌ترتیب به میزان ۷۸ و ۶۴ درصد شده است (Bilodeau *et al*., 2000; Ansari *et al*., 2010; Gadea *et al*., 2011). با این‌حال، می‌توان این کاهش آنتی‌اکسیدان داخل سلول را با افزودن گلوتاتیون به رقیق‌کننده‌های انجمادی تعدیل و سبب بهبود زنده‌مانی اسپرم طی فرآیند انجماد و ذوب شد.

جدول ۳. نتایج سلامت غشا (HOST)، زنده‌مانی (eosin-nigrosin) و ریخت‌شناختی اسپرم (Hancock's solution) گاو در تیمارهای مختلف پس از فرایند انجماد و ذوب. نتایج به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است (P<۰/۰۵). Blankliposome: لیپوزوم‌های بدون گلوتاتیون، EG-1 (encapsulated glutathione -1): لیپوزوم‌های حاوی ۱ میلی‌مولار گلوتاتیون، EG-2.5: لیپوزوم‌های حاوی ۲/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون و EG-5: لیپوزوم‌های حاوی ۵ میلی‌مولار گلوتاتیون.

Table 3. Results of plasmalemma functionality (HOST), membrane integrity (eosin-nigrosin) and morphology (Hancock's solution) of bull sperm in different treatments after freezing and thawing. Results are shown as SEM ± mean (P<0.05). Blank liposome: Liposomes without glutathione, EG-1 (encapsulation glutathione-1): Liposomes supplement 1 mM glutathione, EG-2.5: Liposomes supplement 2.5 mM glutathione, EG-5: Liposome supplements 5 mM glutathione.

Variable (unit)	Blank liposome	Extenders				P-value
		EG-1	EG-2.5	EG-5	SEM	Linear
Membrane functionality (%)	33.7	39.0	39.7	38.0	2.0	0.7
Viability (%)	36.0 [b]	44.5 [a]	46.0 [a]	38.2 [b]	5.7	0.001
Normal morphology (%)	67.0	68.2	70.5	69.5	1.5	0.1
Acrosome reaction (%)	52.3	55.1	55.3	54.5	2.1	0.09

حروف کوچک (a و b) در ردیف‌ها نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در تیمارهای مختلف است.

The small letters (a and b) in the rows indicate a significant difference in different treatments.

مرگ اسپرم‌ها طی فرایند انجماد و ذوب ممکن است به دلیل اختلال در غشای اسپرم باشد (Graham & Foote, 1987). گزارش شده است که، افزودن گلوتاتیون به رقیق‌کننده، آسیب‌های وارد آمده به غشای سلول را کاهش می‌دهد و از اکسیداسیون لیپیدهای غشای سلول جلوگیری می‌نماید (Stradaioli *et al*., 2007).

از طرفی، طی فرایند انجماد و ذوب غشای سلول فسفولیپیدها را به محیط اطراف آزاد می‌کند (Darin-Bennett *et al*., 1973). علاوه بر این، فسفولیپیدهای با زنجیر کوتاه می‌توانند به‌صورت خود به خود بین لیپوزوم‌ها و غشای سلول انتقال یابند (Darin-Bennett *et al*., 1973). به نظر می‌رسد، لسیتین و رقیق‌کننده‌های حاوی میسل‌های لسیتین (Nadri *et al*., 2019) و لیپوزوم از طریق جایگزینی و انتقال فسفولیپیدها از غشای اسپرم حفاظت کنند و در نتیجه، سبب افزایش زنده‌مانی و یکپارچگی غشای سلول شوند (Quinn *et al*., 1980). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که لیپوزوم‌ها الگوهای مناسبی برای مطالعه غشای سلول هستند (Garrett *et al*., 1999) و می‌توانند به‌عنوان حاملی برای انتقال دارو به داخل سلول استفاده شوند. سازوکارهایی که از طریق آن‌ها لیپوزوم‌ها می‌توانند با غشای سلول تعامل داشته باشند شامل، اندوسیتوز، فیوژن و انتقال فسفولیپیدها می‌باشد (Lev, 2010).

تصاویر میکروسکوپ الکترونی حاصل از این پژوهش نشان داد که نانولیپوزوها به‌خوبی اطراف غشای اسپرم را پوشانده‌اند. بنابراین، این نتایج نشان می‌دهند که یکی از سازوکارهای حفاظت سلولی لیپوزوم‌ها طی فرایند انجماد و ذوب، می‌تواند پوشش غشای اسپرم و محافظت از آن طی این فرآیند باشد. طی فرایند فیوژن، لیپیدها از یک لایه لیپیدی خارج شده و از طریق محلول آبی به لایه‌های دیگر اضافه می‌شوند (Lev, 2010). همچنین، لیپوزوم‌ها می‌توانند مواد انکپسوله‌شده در خود را به آرامی آزاد نمایند و در دسترس سلول قرار دهند. رهایش آهسته گلوتاتیون طی فرایند سردسازی اسپرم می‌تواند به حفظ سطح بهینه گلوتاتیون در دو طرف غشای اسپرم کمک کند. چرا که حفظ سطح بهینه گلوتاتیون، یک راه‌کار مهم در جلوگیری از اختلالات ناشی از تنش اکسیداتیو می‌باشد (Sinha *et al*., 2018).

اگرچه، جهت مشخص‌شدن اثر ذارت لسیتین در شکل معمول (مسیل) و شکل نانو آن‌ها (نانومیسل‌ها) بر کیفیت اسپرم بهتر است یکی از تیمارهای آزمایشی حاوی میسل معمولی باشد اما، احتمالا بخش عمده اختلاف بین تیمارهای آزمایشی مربوط به گلوتاتیون باشد. چرا که با افزایش سطوح گلوتاتیون فراسنجه‌های سرعت اسپرم به‌طور معنی‌داری دست‌خوش تغییر شده‌اند. به نظر می‌رسد، اثرات محافظت‌کنندگی گلوتاتیون به دلیل ظرفیت گلوتاتیون در کاهش هجوم رادیکال‌های آزاد به فسفولیپیدهای غشا باشد (Stradaioli *et al*., 2007). نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت‌های پایین گلوتاتیون (۱ و ۲/۵ میلی‌مولار) اثر

مفیدی بر فراسنجه‌های حرکتی و زنده‌مانی اسپرم گاو نشان داد.

در پژوهش حاضر، نانولیپوزوم‌های حاوی ۱ و ۲/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون توانستند جنبایی کل و جنبایی پیشرونده و یکپارچگی غشای اسپرم گاو را پس از فرآیند انجماد و ذوب افزایش دهند. و مکمل‌کردن نانولیپوزوم‌ها با ۱ میلی‌مولار گلوتاتیون توانست فراسنجه جنبایی در مسیر مستقیم (VSL)[1] اسپرم را بهبود ببخشد. نتایج این پژوهش با دیگر مطالعات که گزارش کردند افزودن گلوتاتیون به رقیق‌کننده سبب بهبود ویژگی‌های حرکتی اسپرم می‌شود مطابقت دارد (Sinha *et al*., 1996; Bilodeau *et al*., 2000; Munsi *et al*., 2007). با این‌حال، پژوهش حاضر نشان داد که انکپسوله‌کردن لیپوزوم با ۵ میلی‌مولار گلوتاتیون، اثر معکوسی بر کیفیت اسپرم پس از انجماد و ذوب داشت. این نتایج، با نتایج مطالعه Ansari *et al*. (2010) و Câmara *et al*. (2011) مطابقت دارد. این محققین گزارش کردند که غلظت‌های بالای گلوتاتیون (۳، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) اثر مثبتی بر کیفیت اسپرم نداشت. اگرچه، بوکاک و همکاران گزارش کردند که افزودن ۵ یا ۱۰ میلی‌مولار گلوتاتیون سبب بهبود زنده‌مانی اسپرم قوچ طی فرایند سردسازی شد (Bucak & Tekin, 2007). این نتایج متفاوت ممکن است به دلیل تفاوت در رقیق‌کننده‌ها (زرده تخم مرغ در مقایسه با لسیتین سویا) و همچنین تفاوت گونه‌ای باشد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که سطح گلوتاتیون اسپرم با تنش اکسیداتیو در ارتباط است. همچنین Salmani *et al*. (2013) گزارش کردند که افزودن ۵ و ۱۰ میلی‌مولار گلوتاتیون به‌صورت معنی‌داری سبب کاهش زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم بز شد. نتایج این مطالعه، با نتایج مطالعات دیگر که گزارش کردند افزودن ۵ میلی‌مولار گلوتاتیون به رقیق‌کننده، تنش اکسیداتیو در اسپرم را کاهش می‌دهد مطابقت نداشت (Rawash *et al*., 2018). همچنین، گزارش شده است که بین سطح گلوتاتیون منی و جنبایی اسپرم ارتباط مستقیم وجود دارد. به‌طوری‌که، گلوتاتیون از کاهش جنبایی پس از انجماد اسپرم ممانعت می‌کند (Irvine, 1996). مطالعات دیگر نشان داده‌اند که افزودن تیول‌ها از جمله گلوتاتیون به رقیق‌کننده سبب بهبود جنبایی اسپرم و جلوگیری از تغییرات سولفیدریل غشای اسپرم می‌گردد و اسپرم را از آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند (Stradaioli *et al*., 2007).

گلوتاتیون عملکرد ضد آپوپتوز دارد و ماکرو مولکول‌های داخل سلول از جمله DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها را در مقابل اکسیداسیون و عوامل سمی و محیطی محافظت می‌کند. از طرفی، رادیکال‌های آزاد می‌توانند گلوتاتیون داخل سلولی را اکسید کنند، اکسید شدن گلوتاتیون منجر به تشکیل گلوتاتیون دی‌سولفات (GSSG) می‌شود. همچنین رادیکال‌های آزاد سبب خارج شدن گلوتاتیون از سلول می‌شوند و در نتیجه این تغییرات، تعادل داخل سلولی گلوتاتیون بهم می‌خورد و منجر به فعال‌شدن آبشارهای سیگنالی آپوپتوز در داخل سلول می‌شود (Circu & Aw, 2012).

همچنین، در شرایط تنش سرمایی میزان گلوتاتیون پراکسیداز منی کم می‌شود که این خود آسیب‌های ناشی از تنش سرمایی بر اسپرم را افزایش می‌دهد. تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و سمیت زدایی آن‌ها ممکن است مهم‌ترین فاکتور در زنده‌مانی و عملکرد اسپرم قبل، حین و بعد از حفظ انجمادی آن باشد. گزارش شده است که، اصلی‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دخیل در سمیت‌زدایی رایکاهای آزاد در منی گاو کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) هستند. همچنین مولکول‌های کوچک مثل گلوتاتیون آنتی‌اکسیدان مهم و کوفاکتوری برای متابولیسم ROS هستند (Meister, 1994). مطالعات اخیر، نقش تنظیمی تغییرات محیط داخل سلولی را در فعالسازی مؤثر سازوکارهای مرگ سلولی برجسته ساخته است. به‌طور خاص، کاهش گلوتاتیون یکی از مشخصه‌های معمول راه‌اندازی مرگ سلولی توسط طیف وسیعی از محرک‌ها از جمله فعال‌سازی گیرنده‌های مرگ، استرس، عوامل زیست محیطی و داروهای سمی است. اگرچه مطالعات اخیر

1. Straight-line velocity

نشان می‌دهد که کاهش گلوتاتیون و تغییرات پس ترجمه پروتئین‌ها از طریق گلوتاتیونه‌شدن مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های آپوپتوز هستند. رادیکاهای آزاد تولید شده در فرآیند انجماد- ذوب با حمله به گروه‌های bis-allylic methylene در اسیدهای چرب غیر اشباع غشای اسپرم، سبب کاهش محتویات داخل سلول و افزایش رادیکال‌های آزاد داخل سلول و به‌دنبال آن پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می‌شوند (Gadea *et al*., 2004). کاهش سطح GSH داخل سلولی و افزایش تولید ROS طی فرآیند انجماد و ذوب می‌تواند یکی از علل کاهش زنده‌مانی اسپرم‌های ذوب‌شده باشد (Gadea *et al*., 2011). ازآنجایی‌که غشای اسپرم گاو حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع می‌باشد. بنابراین، تحت فرآیند انجماد و قرار گرفتن اسپرم در معرض تنش سرمایی، فسفولیپیدهای غشای اسپرم مستعد پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش جنبایی اسپرم می‌شوند. تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد طی تنش سرمایی، سبب کاهش تحرک، افزایش شکست DNA و کاهش زنده‌مانی اسپرم می‌شود. همچنین، تحت تأثیر اکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای سلول، یکپارچگی غشای اسپرم کاهش می‌یابد (Ugur *et al*., 2019). همچنین گزارش شده است که ROS سبب آسیب به DNA می‌شوند که از جمله دلایل جدی عدم رشد و گسترش پس از لقاح به شمار می‌رود (Aitken *et al*., 1998).

بنابراین، بهینه‌کردن تکنیک‌های آماده‌سازی اسپرم از جمله افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به شکل محافظت‌شده توسط لیپوزوم‌ها، مقدار محافظ‌های انجمادی و پروتوکل‌های انجماد- ذوب می‌تواند تأثیر به‌سزایی در بهبود کیفیت اسپرم پس از فرایند انجماد داشته باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از ارزیابی‌ها در پژوهش حاضر، نشان داد که درون‌پوشانی‌کردن ۱ میلی‌مولار گلوتاتیون در نانولیپوزوم توانست کیفیت اسپرم پس از فرایند انجماد و ذوب را افزایش دهد اگرچه، تفاوت معنی‌داری بین این سطح با سطح ۲/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون وجود نداشت. ارزیابی‌ها نشان داد که نانولیپوزوم‌های حاوی آنتی‌اکسیدان علاوه بر دارا بودن نقش محافظتی اسپرم حین فرایند انجماد و ذوب، می‌توانند با انکپسوله کردن گلوتاتیون سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاو پس از فرآیند انجماد و ذوب شوند.

سپاسگزاری

از مساعدت‌های مادی و معنوی پارک علم و فناوری دانشگاه تهران و پژوهشکده فناوری‌های همگرای دانشگاه تهران (NBIC)، همچنین از شرکت نهاده‌های دامی جاهد به‌خصوص جناب آقای مهندس خوش‌نیت مدیر محترم مرکز تولید اسپرم گاو به‌دلیل تأمین اسپرم مورد نیاز و جناب آقای دکتر علیرضا پرتوآذر و دکتر حمید اکبری اعضای محترم هیأت علمی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران به‌خاطر راهنمایی‌های ارزنده‌شان و همچنین از کمک‌های آقای مهندس محمدحسین موذنی زاده، تشکر و قدردانی می‌گردد. آزمایش حاضر در قالب طرح نوع ششم به شماره ۷۱۰۸۰۱۷/۶/۳۹ مورد حمایت دانشگاه تهران قرار گرفته است.

REFERENCES

1. Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z. & Irvine, D.S. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* 59, 1037-1046.
2. Ansari, M. S., Rakha, B. A., Ullah, N., Andrabi, S. M. H., Iqbal, S., Khalid, M. & Akhter, S. (2010). Effect of exogenous glutathione in extender on the freezability of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Animal Science*, 28, 235-244.
3. Belala, R., Delay, J., Amirat, L., Ropers, M.-H., Le Guillou, J., Anton, M. & Kaidi, R. (2016). The benefits of liposomes for chilling canine sperm for 4 days at 4 C. *Animal Reproduction Science*, 168, 100-109.
4. Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A. & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Molecular Reproduction and Development: *Incorporating Gamete Research*, 55, 282-288.

5. Bucak, M.N. & Tekin, N. (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research* 73, 103-108.
6. Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sarıözkan, S., Başpınar, N., Taşpınar, M., Çoyan, K., Bilgili, A., Akalın, P.P., Büyükleblebici, S. & Aydos, S. (2010). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, 61, 248-253.
7. Câmara, D., Silva, S., Almeida, F., Nunes, J. & Guerra, M. (2011). Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 76, 342-350.
8. Chapman, D., Jones, M. N. & Jones, M. N. (1995). Micelles, monolayers, and biomembranes. Wiley-Liss.
9. Circu, M. L. & Aw, T. Y. (2012). Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823, 1767-1777.
10. Darin-Bennett, A., Poulos, A. & White, I. (1973). The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull, and boar spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*, 26, 1409-1420.
11. de Oliveira, R. A., Wolf, C. A., de Oliveira Viu, M. A. & Gambarini, M. L. (2013). Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33, 1148-1152.
12. Estrada, E., del Álamo, M. M. R., Rodríguez-Gil, J. E. & Yeste, M. (2017). The addition of reduced glutathione to cryopreservation media induces changes in the structure of motile subpopulations of frozen-thawed boar sperm. *Cryobiology*, 78, 56-64.
13. Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M., Garcia-Vazquez, F. & Gardon, J. (2011). Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*, 62, 40-46.
14. Gadea, J., Sellés, E., Marco, M.A., Coy, P., Matás, C., Romar, R., Ruiz, S. (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, 62, 690-701.
15. Gardón, J., Rodriquez, J. & Gadea, J. (2006). Addition of reduced glutathione to thawing medium improved the sperm motility and reduced ros generation in frozen ovine and caprine spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 18, 155-155.
16. Garrett, F. E., Goel, S., Yasul, J. & Koch, R. A. (1999). Liposomes fuse with sperm cells and induce activation by delivery of impermeant agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1417, 77-88.
17. Graham, J., Foote, R. (1987). Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24, *42-52.*
18. Irvine, D.S. (1996). Glutathione as a treatment for male infertility. *Reviews of Reproduction*, 1, 6-12.
19. Lev, S. (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 11, 739.
20. Meister, A. (1994). Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Research*, 54(7 Supplement), 1969s-1975s.
21. Munsi, M., Bhuiyan, M., Majumder, S. & Alam, M. (2007). Effects of exogenous glutathione on the quality of chilled bull semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 358-362.
22. Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Martínez-Pastor, F., Mousavi, M., Noei, R. & Sangcheshmeh, A. M. (2019). Lecithin nanoparticles enhance the cryosurvival of caprine sperm. *Theriogenology*, 133, 38-44.
23. Najafi, A., Zhandi, M., Towhidi, A., Sharafi, M., Sharif, A. A., Motlagh, M. K. & Martinez-Pastor, F. (2013). Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, 66(3), 275-282.
24. Ogata, K., Sasaki, A., Kato, Y., Takeda, A., Wakabayashi, M., Sarentonglaga, B. & Nagao, Y. (2015). Glutathione supplementation to semen extender improves the quality of frozen-thawed canine spermatozoa for transcervical insemination. *Journal of Reproduction and Development*, 2014-2130.
25. Quinn, P., Chow, P. & White, I. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Reproduction*, 60, 403-407.
26. Rawash, Z. M., Ibrahim, E. A. & El-Raey, M. (2018). Effects of reduced glutathione on Boer goat semen freezability. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 7, 33.
27. Said, T. M., Gaglani, A. & Agarwal, A. (2010). Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive Biomedicine Online*, 21, 456-462.
28. Sakkas, D. & Alvarez, J. G. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility* 93, 1027-1036.
29. Salamon, S. & Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 77-111.
30. Schäfer, S. & Holzmann, A. (2000). The use of transmigration and Spermac™ stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 59, 201-211.

31. Salmani, H., Nabi, M. M., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, M. B., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M. & Zhandi, M. (2013). Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Research*, 112, 123-127.
32. Sinha, M., Sinha, A., Singh, B. & Prasad, R. (1996). The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal Reproduction Science*, 41, 237-243.
33. Sinha, R., Sinha, I., Calcagnotto, A., Trushin, N., Haley, J. S., Schell, T. D. & Richie Jr, J. P. (2018). Oral supplementation with liposomal glutathione elevates body stores of glutathione and markers of immune function. *European Journal of Clinical Nutrition*, 72, 105-111.
34. Sharafi, M., Zhandi, M., Shahverdi, A., Shakeri, M., 2015. Beneficial effects of nitric oxide induced mild oxidative stress on post-thawed bull semen quality. *International Journal of Fertility & Sterility*, 9, 230.
35. Stradaioli, G., Noro, T., Sylla, L. & Monaci, M. (2007). Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*, 67, 1249-1255.
36. Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. L., Purwantara, B., Kaya, A. & Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 268.
37. Thomson, L. K., Fleming, S. D., Barone, K., Zieschang, J.-A. & Clark, A. M. (2010). The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility*, 93(4), 1147-1156.
38. Triwulanningsih, E., Situmorang, P., Sugiarti, T., Sianturi, R. & Kusumaningrum, D. (2010). Effect of glutatione addition to the sperm diluent medium on quality of bovine chilled semen. *Indonesian Journal of Agriculture*, 3, 60-65.