DOI: 10.22092/VJ.2023.360964.2039
شماره ۱۴۱ زمستان ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

تاثیر افزودن آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی میتوتمپو به رقیق‌کننده گیاهی اسپرم بر کیفیت اسپرم سردشده قوچ

• هدی جواهری بارفروشی
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• نادر اسدزاده(نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• مختار مهاجر
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۱۰-۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱-۱۰-۱۱
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱-۱۰-۰۴ تاریخ انتشار: ۱۴۰۲-۱۰-۱
Email: naderasadzadeh4@gmail.com

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی حفظ کیفیت اسپرم در گوسفند با استفاده از آنتی اکسیدان هدفمند میتوکندریایی میتوتمپو طی فرآیند سردسازی در رقیق کننده حاوی لسیتین سویا بوده است. در این آزمایش اسپرم از ۵ رأس قوچ نژاد زندی جمع آوری به رقیق‌کننده های حاوی صفر، ۰/۵، ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار میتوتمپو اضافه و سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت ذخیره شدند. کیفیت اسپرم در زمانهای ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی مورد ارزیابی آزمایشگاهی قرار گرفتند و فراسنجه های جنبایی کل، جنبایی پیشرونده، زنده‌مانی، سلامت غشا، فعالیت میتوکندری و میزان لیپید پراکسیداسیون مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد در زمان ۰ اختلافی بین تیمارها مشاهده نشد. در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی، استفاده از تیمارهای ۵ و ۵۰ میکرو مولار میتوتمپو منجر به حفظ جنبایی کل، جنبایی پیشرونده، زنده مانی، سلامت غشا و همچنین کاهش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در اسپرم سردشده قوچ شد. نتیجه گیری کلی اینکه استفاده از تیمارهای ۵ و ۵۰ میکرومولار آنتی اکسیدان میتوتمپو میتواند راهکاری مناسب در جهت حفظ کیفیت اسپرم قوچ در هنگام فرآیند سردسازی در رقیق کننده گیاهی اسپرم باشد.

کلمات کلیدی: اسپرم، سردسازی، قوچ، میتوتمپو، لسیتین سویا

Veterinary Researches & Biological Products No 141 pp: 14-19

Effect of mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO addition to the sperm herbal extender on ram chilled sperm quality

By: Javaheri Barfourooshi, H., Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Asadzadeh, N., (Corresponding Author) Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Mohajer, M., Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Email: naderasadzadeh4@gmail.com

Received: 2022-12-25 **Accepted: 2023-01-01**

Revised: 2023-01-01 **Published: 2023-12-22**

The aim of this study was to evaluate the sperm quality preservation in sheep using mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO during chilling process. In this experiment, semen samples were collected from five Zandi rams and added to the extender containing 0, 0.5, 1, 5, 50 and 500 µM Mito-TEMPO and stored at 4 ˚C until 48 hours. Sperm quality was evaluated at 0, 24 and 48 hours after chilling and total motility, progressive motility, viability, membrane integrity, mitochondrial activity and lipid peroxidation were assessed. No difference was observed between treatments at time 0 of cooling. During 24 and 48 hours cooling periods, using 5 and 50 µM Mito-TEMPO increased total motility, progressive motility, viability, membrane integrity, mitochondrial activity and decreased lipid peroxidation in ram chilled sperm. In conclusion, using 5 and 50 µM Mito-TEMPO in chilling herbal extender could be a suitable method to conserve ram sperm quality during chilling process.

Key words: Sperm, Chilling, Ram, Mito-TEMPO, Soybean lecithin

مقدمه

پرورش گوسفند در ایران دارای قدمت تاریخی بسیار طولانی می‌باشد. اما محدودیت مراتع و شرایط آب و هوایی در ایران از یک سو و بازده پایین تولیدمثلی و عدم استفاده بهینه از تلقیح مصنوعی در صنعت پرورش گوسفند از سوی دیگر، موجب عدم صرفه اقتصادی پرورش گوسفند شده است. بهبود بازده تولیدمثل توسط بکارگیری فناوري‌هاي توليدمثلی یکی از موثرترین راه‌کارهای افزایش بهره‌وری در پرورش دام است (۱). یکی از مهم‌ترین فناوري‌ها جهت افزایش کارایی تولیدمثل، تلقیح مصنوعی می‌باشد. از جمله مزایای تلقیح مصنوعی می‌توان به بهداشت بهتر گله، بهبود ایمنی در گله، کاهش هزینه‌هاي نگهداري حیوانات نر، آسان‌تر شدن ورود ژنوم جدید، افزایش امکان دورگ‌گیري براي تغییر نوع تولید حیوانات، افزایش سرعت پیشرفت ژنتیکی در گله و افزایش تولید حیواناتی با توان تولیدي بالاتر اشاره کرد (۱). اما تلقیح مصنوعی با اسپرم تازه با محدودیت‌هایی از قبیل کمبود قوچ با ویژگی‌های خاص در گله، اسپرم‌گیری و تلقیح به طور هم‌زمان در گله، عدم امکان استفاده مفید از قوچ‌های برتر در سطح وسیع‌تر و محدودیت در حمل و نقل اسپرم مواجه است. بنابراین برای غلبه بر این مشکلات باید از اسپرم سردشده و یا منجمد استفاده نمود (۱۳).

امروزه تلاش‌های قابل ملاحظه‌ای بر روی تکوین تکنیک‌های سردسازی و انجماد اسپرم در حال انجام است. فراوری سرمایی اسپرم با مشکلاتی از جمله کاهش زنده‌مانی و تحرک اسپرم‌ها بعد از فراوری مواجه است. عوامل متعددی از قبیل کیفیت منی، نوع و غلظت اجزای موجود در رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم فراوری شده تاثیر می‌گذارند (۹). بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان در رقیق‌کننده مناسب منی که بتواند از اسپرم‌ها در برابر آسیب‌های سرمایی محافظت کند و زنده‌مانی و جنبایی اسپرم را حفظ کند، گام مهمی در جهت استفاده از تلقیح مصنوعی است. همچنین استفاده از منبع آنتی‌اکسیدانی در رقیق‌کننده از راهکارهای موثر در بهبود کیفیت اسپرم می باشد (۱).

میتوتمپو یک آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی است که به دلیل داشتن بار مثبت می‌تواند به راحتی از لایه‌های لیپید غشاء عبور کرده و تا ۱۰۰۰ برابر در ماتریکس میتوکندری تجمع یابد (۲)، و با از بین بردن یا مهار تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن میتوکندریایی و پراکسیداسیون لیپید، اثر آنتی‌اکسیدانی هدفمند را اعمال می‌کند (۱۰).

هدف از این مطالعه حفظ کیفیت اسپرم سردشده قوچ در زمان ذخیره

سرمایی در رقیق‌کننده حاوی لسیتین سویا با استفاده از افزودن منبع آنتی‌اکسیدانی میتوتمپو می‌باشد تا بدین طریق بتوان کارایی اسپرم قوچ را در ارزیابی های آزمایشگاهی حفظ نمود.

مواد و روش‌ها

پنج رأس قوچ نژاد زندی سه تا چهار ساله برای این مطالعه انتخاب شدند. اسپرم از قوچها جمع‌آوری و به رقیق‌کننده حاوی صفر، ۰/۵، ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار میتوتمپو اضافه و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. رقیق‌کننده پایه شامل ۲/۷ گرم تریس، ۱ گرم فروکتوز و ۱/۴ گرم سیتریک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر بود. سپس به رقیق کننده ۱ درصد (وزن/حجم) لسیتین سویا اضافه شد.

نمونه‌های منی دوبار در هفته با استفاده از واژن مصنوعی جمع‌آوری شد. بلافاصله پس از جمع‌آوری منی، نمونه‌ها داخل بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌های منی گرفته شده در هر نوبت با هدف از میان برداشتن اثرات فردی با یکدیگر آمیخته شدند. قبل از مخلوط شدن نمونه‌های اسپرم، ارزیابی‌های اولیه روی آن‌ها صورت گرفت و فقط از نمونه‌هایی برای ادامه استفاده شد که دارای اسپرم‌های با جنبایی بیش از ۷۰ درصد بودند. رقیق‌سازی به نسبت یک حجم منی و ۱۰ حجم رقیق کننده در دمای اتاق انجام شد طوری که غلظت نهایی اسپرم ۴۰۰ میلیون در هر میلی‌لیتر باشد تعداد اسپرم در انزال با استفاده از لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری شمارش شد.

فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل جنبایی کل، جنبایی پیشرونده، زنده مانی، سلامت غشا، فعالیت میتوکندری و میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم در زمان‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ذخیره سازی سرمایی ارزیابی شدند.

به منظور بررسی ویژگی‌های حرکتی اسپرم در گروه‌های مختلف، نرم افزار کامپیوتری آنالیز جنبایی اسپرم مورد استفاده قرار گرفت (۸) و فراسنجه‌های جنبایی کل (TM) و جنبایی پیش‌رونده (PM) ثبت و گزارش شدند.

برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد (۱۳) و از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ به خود نگرفته بودند و یا تنها بخشی از گردن آن‌ها رنگ گرفته بود به عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شد.

براي بررسي فعاليت و يكپارچگی غشا از تست تورم هيپواسموتيک استفاده شد. تست هاست بر اساس اسمولاريتي محيطي كه اسپرم در آن قرار مي‌گيرد عمل مي‌كند (۹). تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش‌شده و سپس درصد اسپرم‌های با غشا سالم و آسیب‌دیده محاسبه شد.

در این تحقیق فعالیت میتوکندریایی به وسیله رودامین-۱۲۳ به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد (۶) در نمودار دستگاه فلوسایتومتر نمونه رودامین مثبت و PI منفی (R۱۲۳+/ PI-) باشد، به عنوان نمونه دارای میتوکندری فعال و نمونه رودامین مثبت و PI مثبت(R۱۲۳+/PI+) باشد به عنوان میتوکندری غیر فعال در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری غلظت MDA با تیوباربیوتوریک اسید (TBA) یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدها است (۷). یک مولکول MDA با دو مولکول TBA واکنش می‌دهد و فرآورده این واکنش، مولکولی صورتی رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد.

آنالیز آماری در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به جنبایی کل و پیشرونده اسپرم قوچ پس از ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی در رقیق‌کننده حاوی دوزهای مختلف آنتی‌اکسیدان

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف میتوتمپو برفراسنجه‌های حرکتی اسپرم پس از فرایند سردسازی.

فراسنجه	جنبایی اسپرم (٪)			جنبایی پیشرونده اسپرم (٪)		
تیمار (میکرومولار)	۰ h	۲۴ h	۴۸ h	۰ h	۲۴ h	۴۸ h
۰	۹۰/۰	۵۲/۲ ^{b}	۳۴/۴ ^{b}	۶۹/۲	۳۰/۵ ^{b}	۱۶/۱ ^{b}
۰/۵	۹۰/۵	۵۳/۷ ^{b}	۳۵/۲ ^{b}	۶۸/۵	۳۱/۵ ^{b}	۱۶/۹ ^{b}
۵	۸۸/۹	۵۷/۷ ^{a}	۴۰/۰ ^{a}	۶۹/۵	۳۷/۲ ^{a}	۲۱/۵ ^{a}
۵۰	۹۰/۰	۵۸/۵ ^{a}	۴۰/۲ ^{a}	۷۰/۱	۳۶/۸ ^{a}	۲۱/۲ ^{a}
۵۰۰	۹۰/۶	۵۱/۹ ^{b}	۳۳/۶ ^{b}	۶۹/۴	۳۰/۳ ^{b}	۱۵/۵ ^{b}
SEM	۰/۸	۱/۰	۱/۰	۰/۹	۱/۳	۱/۰

حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ستون است (P≤۰/۰۵).

هدفمند میتوکندریایی میتوتمپو در جدول یک نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد، به طور کلی با افزایش زمان ذخیره‌سازی اسپرم، میزان توانایی جنبایی کل و پیشرونده اسپرم نسبت به زمان استحصال منی کاهش می‌یابد، اما استفاده از تیمارهای ۵ و ۵۰ میکرومولار آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی میتوتمپو بالاترین درصد جنبایی کل و پیشرونده را در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از سردسازی به همراه داشت که این اختلاف در مقایسه با سایر گروه‌ها معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵) ولی در زمان ۰ تیمارها تاثیر معنی‌داری از خود نشان ندادند. در این مطالعه استفاده از آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی میتوتمپو منجر به بهبود جنبایی کل و جنبایی پیشرونده شد که نتایج حاصل با نتایج مطالعات انجام شده در خروس (۶) و قوچ (۱۳) هم‌خوانی داشت.

نتایج مربوط به زنده‌مانی و سلامت غشا اسپرم قوچ پس از سردسازی در جدول دو نشان داده شده است. در زمان ۰ هیچکدام از تیمارها تاثیری بر زنده‌مانی و یا سلامت غشا اسپرم نداشتند. در زمان‌ها ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از سردسازی، نتایج تست هاست و ائوزین-نیگروزین نشان داد که در مورد سلامت غشا و زنده‌مانی اسپرم بیشترین درصد اسپرم زنده و با غشا سالم مربوط به گروه‌های دریافت‌کننده ۵ و ۵۰ میکرومولار آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی میتوتمپو بوده که اختلاف آن با گروه‌های کنترل و سایر تیمارها معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). نتایج این قسمت با نتایج مطالعات انجام شده در قوچ (۱۳) و خروس (۶) همخوانی داشت.

نتایج مربوط به پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و فعالیت میتوکندری اسپرم قوچ پس از ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی در رقیق‌کننده حاوی دوزهای مختلف آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی میتوتمپو در جدول سه نشان داده شده است. مشابه با تست‌های قبلی در زمان ۰ اختلافی بین تیمارها مشاهده نشد. نتایج نشان می‌دهد استفاده از آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی میتوتمپو در رقیق‌کننده اسپرم در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت سردسازی موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی می‌شود به طوری که کمترین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی مربوط به گروه‌های دریافت‌کننده ۵ و ۵۰ میکرومولار آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی میتوتمپو بوده است که اختلاف آن با گروه کنترل و سایر تیمارها معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

بیشترین درصد فعالیت میتوکندری مربوط به گروه‌های دریافت‌کننده ۵ و ۵۰ میکرومولار آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی میتوتمپو بوده که اختلاف آن با گروه‌های کنترل و سایر تیمارها معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). نتایج این قسمت با نتایج مطالعات انجام شده در قوچ (۱۳) و خروس (۶) همخوانی داشت

مکانیسم احتمالی میتوتمپو در کاهش صدمات ناشی از فرایند سردسازی اسپرم، احتمالا مربوط به اثر آن در جلوگیری از تولید بیش از حد و سرریز رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از سردسازی از طریق ساختار هیدروکسیلامینی خود است. میتوتمپو به عنوان تقلیدکننده سوپراکسید دیسموتاز برای حفظ پایداری زنجیره انتقال الکترون و غشا دو لایه فسفولیپیدی عمل می‌کند که با مطالعات قبلی در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی میتوتمپو در سایر سیستم‌ها سازگار است (۱۱) و از آنجا که نیتروکسیدها به عنوان مقلد سوپراکسیددیسموتاز (SOD) شناخته می‌شوند، میتوتمپو به عنوان یک سوپراکسید دیسموتاز میتوکندریایی و جاروب کننده رادیکال آزاد به طور مستقیم در خنثی‌سازی رادیکال‌های اکسیژن میتوکندریایی عمل می‌کند (۳).

علاوه بر این تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب تخریب پروتئین‌های غشا و کروماتین اسپرم و سرانجام کاهش تحرک و توان باروری اسپرم می‌شود (۱۲). در این آزمایش دو سطح ۵ و ۵۰ میکرومولار میتوتمپو موجب بهبود فاکتورهای کیفی اسپرم در زمان‌های بعد از رقیق‌سازی منی شد. این نتایج به طور مستقیم ناشی از دیسموت شدن رادیکال اکسیژن و جمع‌آوری آن توسط میتوتمپو بوده است که با مطالعات قبلی بر روی اسپرم مطابقت دارد. لو و همکاران (۲۰۱۸) اثرات غلظت‌های

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف میتوتمپو بر زنده‌مانی و سلامت غشا اسپرم پس از فرایند سردسازی.

فراسنجه	زنده‌مانی اسپرم (٪)			سلامت غشا اسپرم (٪)		
تیمار (میکرومولار)	۰ h	۲۴ h	۴۸h	۰h	۲۴h	۴۸h
۰	۸۹/۵	۶۴/۷ ^{b}	۳۴/۲ ^{b}	۹۰/۱	۶۸/۵ ^{b}	۳۸/۸ ^{b}
۰/۵	۹۰/۰	۶۵/۲ ^{b}	۳۵/۷ ^{b}	۹۰/۲	۶۹/۴ ^{b}	۴۰/۳ ^{b}
۵	۹۰/۵	۶۹/۴ ^{a}	۴۰/۰ ^{a}	۹۱/۰	۷۳/۶ ^{a}	۴۵/۰ ^{a}
۵۰	۹۰/۰	۷۰/۰ ^{a}	۴۰/۲ ^{a}	۹۱/۵	۷۲/۵ ^{a}	۴۴/۴ ^{a}
۵۰۰	۹۰/۶	۶۴/۲ ^{b}	۳۲/۸ ^{b}	۹۱/۰	۶۷/۶ ^{b}	۳۷/۵ ^{b}
SEM	۰/۷	۰/۹	۱/۵	۰/۸	۱/۲	۱/۷

حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ستون است(P≤۰/۰۵).

مختلف از میتوتمپو را بر روی کیفیت اسپرم‌های انسانی پس ازفرایند انجماد یخ‌گشایی مورد بررسی قرار دادند و پیشنهاد کردند که افزودن میتوتمپو به طور قابل توجهی باعث بهبود تحرک اسپرم، زنده ماندن، یکپارچگی غشایی و پتانسیل غشا میتوکندری بعد از یخ‌گشایی می‌شود (۵). در همین حال، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته و مقدار مالون‌دی‌آلدهید در گروه میتوتمپو کاهش یافته است. ۵ و ۵۰ میکرومولار میتوتمپو به طور موثری کیفیت اسپرم، زنده‌مانی، تحرک و یکپارچگی غشا پلاسمایی را بهبود بخشیده است. در این مطالعه پتانسیل غشا میتوکندری اسپرم پس از سردسازی کاهش یافته و افزودن میتوتمپو (۵-۵۰ میکرومولار) به طور قابل توجهی روند کاهشی را متوقف کرده، که با نتایج حاصل از آزمایش میتوتمپو در سیستم‌های دیگر مطابقت دارد (۴) که احتمالا علت اصلی اثرات حفاظت‌کنندگی میتوتمپو بر اسپرم است. علاوه بر این ژنگ و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه خود بر روی بیماران استنوزواسپرمي دریافتند افزودن غلظت‌هاي مختلف میتوتمپو به محیط انجماد باعث بهبود قابل توجهي در زنده‌مانی، تحرك، تمامیت غشا پلاسمایی، پتانسیل غشا میتوکندریایي، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش تشکیل محصولات اکسیداسیون می‌شود (۱۱).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی میتوتمپو دارای اثرات محافظتی مناسبی برای حفظ کیفیت اسپرم می‌باشد. این ترکیب در سطوح مناسب دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هدفمند است و موجب حفظ فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از سردسازی می‌شود و در نتیجه می‌توان با استفاده از خواص محافظتی این آنتی‌اکسیدان، بازده باروری اسپرم را پس فرایند سردسازی حفظ نمود.

منابع مورد استفاده

1-Bucak, M.N. and N. Tekin. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*. 73: 103–108.

2-Dikalova, A.E., Bikineyeva, A.T., Budzyn, K., Nazarewicz, R.R., McCann, L., Lewis, W., Harrison, D.G. and Dikalov, S.I., 2010. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circulation Research*. 107: 106-116.

3-Dikalov, S., 2011. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radical Biology and Medicine*. 51: 1289-1301.

4- Hu, H. and Li, M., 2016. Mitochondria-targeted antioxidant mitotempo protects mitochondrial function against amyloid beta toxicity in primary cultured mouse neurons. *Biochemical and biophysical research communications*. 478:174-180.

5-Lu, X., Zhang, Y., Bai, H., Liu, J., Li, J. and Wu, B., 2018. Mitochondria-targeted antioxidant MitoTEMPO improves the post-thaw sperm quality. *Cryobiology*. 80:26-29.

6- Masoudi, R., Asadzadeh, N. and Sharafi, M. 2020. The mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO conserves rooster's cooled semen quality and fertility potential. *Theriogenology*. 156: 236-241.

7- Masoudi, R., Asadzadeh, N. and Sharafi, M. 2021. Effects of freezing extender supplementation with mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO on frozen-thawed rooster semen quality and reproductive performance. *Animal Reproduction Science*. 225:106671.

8- Salmani, H., M.M. Nabi, H. Vaseghi-Dodaran, M.B. Rahman and et al. 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Research*. 112: 123–127.

9- Sharafi, M., M. Forouzanfar, S.M. Hosseini, M. Hajian and et

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف میتوتمپو بر غلظت MDA تولیدی و فعالیت میتوکندری اسپرم پس از فرایند سردسازی.

فراسنجه	غلظت MDA (nmol/ml)			فعالیت میتوکندریایی اسپرم (٪)		
تیمار (میکرومولار)	۰h	۲۴h	۴۸ h	۰h	۲۴h	۴۸h
۰	۲/۴۵	۵/۳۳ ^{b}	۷/۰۰ ^{b}	۹۰/۰	۶۸/۴ ^{b}	۳۵/۲ ^{b}
۰/۵	۲/۴۰	۵/۱۵ ^{b}	۶/۷۵ ^{b}	۸۹/۲	۶۹/۵ ^{b}	۳۶/۳ ^{b}
۵	۲/۵۰	۴/۴۵ ^{b}	۶/۱۰ ^{b}	۹۱/۳	۷۵/۰ ^{a}	۴۱/۲ ^{a}
۵۰	۲/۴۵	۴/۴۰ ^{a}	۶/۰۰ ^{a}	۹۰/۵	۷۵/۷ ^{a}	۴۰/۰ ^{a}
۵۰۰	۲/۴۰	۵/۵۵ ^{b}	۷/۱۵ ^{b}	۸۹/۴	۶۸/۵ ^{b}	۳۵/۷ ^{b}
SEM	۰/۲۰	۰/۲۵	۰/۲۵	۱/۳	۱/۰	۱/۱

حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ستون است($P\leq ۰/۰۵$).

al. 2009. In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation. *International Journal of Fertility and Sterility*. 3: 149–152.

10- Trnka, J., Blaikie, F.H., Smith, R.A. and Murphy, M.P., 2008. A mitochondria-targeted nitroxide is reduced to its hydroxylamine by ubiquinol in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*. 44: 1406-1419.

11-Yang, S.G., Park, H.J., Kim, J.W., Jung, J.M., Kim, M.J., Jegal, H.G., Kim, I.S., Kang, M.J., Wee, G., Yang, H.Y. and Lee, Y.H., 2018. Mito-TEMPO improves development competence by reducing superoxide in preimplantation porcine embryos. *Scientific Reports*. 8: 1-10.

12-Zaniboni, L. and Cerolini, S., 2009. Liquid storage of turkey semen: Changes in quality parameters, lipid composition and susceptibility to induced in vitro peroxidation in control, n-3 fatty acids and alpha-tocopherol rich spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 112:51-65.

13- Zarei, F., Kia, H.D., Masoudi, R., Moghaddam, G. and Ebrahimi, M. 2021. Supplementation of ram's semen extender with Mito-TEMPO I: Improvement in quality parameters and reproductive performance of cooled-stored semen. *Cryobiology*. 98:215-218.

14-Zhang, X., Lu, X., Li, J., Xia, Q., Gao, J. and Wu, B., 2019. Mito-Tempo alleviates cryodamage by regulating intracellular oxidative metabolism in spermatozoa from asthenozoospermic patients. *Cryobiology*. 91:18-22.