تولیدات دامی
دوره ۲۲ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۹
صفحه‌های ۴۷۷-۴۷۱
DOI: 10.22059/jap.2020.287470.623434

اثر افزودن گلوتاتیون احیا به رقیق‌کننده بر پایه نانوذره لسیتین بر انجمادپذیری اسپرم گاو

طوبی ندری[۱]، سعید زین الدینی[۲*]، آرمین توحیدی[۳]، غلامحسین ریاضی[۴]، مهدی ژندی[۲]، محسن شرفی[۵]
۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۲. دانشیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۳. استاد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۴. استاد، گروه بیوشیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۵. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، کرج، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۷/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۲۱

چکیده

هدف از این پژوهش ، بررسی اثر افزودن گلوتاتیون احیا به رقیق‌کننده بر پایه نانوذره لسیتین بر کیفیت اسپرم گاو پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی بود به همین منظور چهار سطح آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون (صفر، یک، ۲/۵ و پنج میلی‌مولار) در رقیق‌کننده بر پایه نانوذرات لسیتین ارزیابی شد. اندازه ذرات لیستین تهیه شده با استفاده از دستگاه سونیکاتور به ابعاد نانو کاهش یافت. ۴۸ انزال طی سه هفته از شش رأس گاو نر هلشتاین با میانگین سنی سه تا چهار سال جمع‌آوری و منجمد شد. صفات مورد ارزیابی پس از انجماد و یخ‌گشایی شامل، فراسنجه‌های جنبایی با CASA، فعالیت غشای سلول (هاست) و یکپارچگی غشا (ائوزین-نگروزین) ریخت‌شناختی اسپرم (محلول هانکوک) بود. نتایج نشان داد که استفاده از ۲/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون در رقیق‌کننده جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده را افزایش داد (به‌ترتیب ۱/۵±۶۳/۳۸ و ۱/۱±۴۳/۱) (P<۰/۰۵). درصد زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم در تیمار حاوی ۲/۵ میلی‌مولار بیش‌تر از سایر تیمارها بود. به‌نظر می‌رسد، غلظت ۲/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون می‌تواند غلظت بهینه رقیق‌کننده انجمادی گاو بر پایه نانوذره لسیتین باشد.

کلیدواژه‌ها: انجماد- یخ‌گشایی، آنتی‌اکسیدان، گاو، منی، نانومیسل.

Effect of supplementation of lecithin nanoparticles-based extender with reduced glutathione on freezability of bull sperm

Touba Nadri[1], Saeed Zeinoaldini[2]*, Armin Towhidi[3], Gholam Hossein Riazi[4], Mehdi Zhandi[2], Mohsen Sharafi[5]
1. Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Associate Professor, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
4. Professor, IBB Center, University of Tehran, Tehran, Iran.
5. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Karaj, Iran.
Received: October 14, 2019 Accepted: January 11, 2020

Abstract

This study was designed to add the reduced glutathione to a lecithin nanoparticle-based extender and evaluate the quality of bull sperm after freezing and thawing. In the present study, the effect of four different levels of glutathione (0, 1, 2.5 and 5 mM) in extender-based on lecithin nanoparticles was evaluated. The lecithin nanoparticles were prepared and the particle size was reduced by using a sonicator device. During three weeks, 48 ejaculates from six Holstein bulls were collected and frozen. Properties evaluated after freezing and thawing were kinetic parameters (CASA), membrane activity (HOST), membrane integrity (eosin-nigrosine) and morphology (Hancock solution). The results showed that using 2.5 mM glutathione in the extender significantly increased total and progressive motility (63.38±1.5 and 43.1±1.1 respectively, P <0.05). The results of eosin-nigrosine staining and Host test showed that the highest viability and cell membrane functionality were related to 2.5 mM treatment (64.8±1.5 and 58.1±1.1 respectively) (P<0.05). In general, 2.5 mM glutathione could improve the quality of bull sperm compared with other concentrations after freezing and thawing process. It seems that the 2.5 mM glutathione is optimum concentration for bull extender based on the lecithin nanoparticles.

Keywords: Antioxidants, Bull, Freeze-thaw, Semen, Nanomicelle

* نویسنده مسئول
Email: zeinoaldini@ut.ac.ir

مقدمه

انجماد اسپرم و شوک سرمایی سبب آسیب به سلول، کاهش توان سامانه دفاعی اسپرم (کاهش سطح آنزیم‌های سیستم ایمنی از جمله سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز) و افزایش سطح رادیکال‌های آزاد در سلول می‌شود که منجر به کاهش زنده‌مانی سلول می‌شود [۸]. غشاهای پلاسمایی، آکروزومی و میتوکندریایی طی فرایند انجماد– یخ‌گشایی آسیب‌پذیری بیش‌تری از خود نشان می‌دهند [۲]. علاوه بر این، رادیکال‌های آزاد حاصل از فرایند انجماد و یخ‌گشایی، از طریق پراکسیداسیون لیپیدها موجب آسیب به غشای سلول می‌شوند. گلوتاتیون یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های تنظیم‌کننده سطح رادیکال‌های آزاد در سلول است [۱۵]. رادیکال‌های آزاد با اکسیدکردن گلوتاتیون و یا انتقال آن به خارج سلول، سبب کاهش گلوتاتیون در داخل سلول و عدم تعادل آنتی‌اکسیدانی سلول می‌شوند و در نتیجه سبب شروع سیگنال‌های آپوپتوز می‌شوند [۱٤].

میسل‌ها غشاهای تک‌لایه لیپیدی هستند که به اشکال مختلف کره، استوانه‌ای و صفحه‌ای وجود دارند. مطالعات نشان داده‌اند که نانومیسل‌های لسیتین سویا عملکرد خوبی در حفاظت از اسپرم بز طی فرایند انجماد و یخ‌گشایی اسپرم بز دارند [۱٦]. بنابراین، به‌کاربردن روش‌های مختلف از جمله افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده‌های انجمادی می‌تواند راه‌کاری مفید جهت مقابله با افزایش رادیکال‌های آزاد باشد. مطالعات مختلفی نیز نشان داده‌اند که افزودن گلوتاتیون به رقیق‌کننده انجمادی اسپرم اسب [۵]، گاو [۱۸]، بز [۱۰]، خوک [۷] و اسپرم سگ [۲۰] باعث بهبود کیفیت اسپرم پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی شده است. هم‌چنین، در مطالعه‌ای اثر افزودن گلوتاتیون به رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ بر فرایند سردسازی اسپرم گاو از دمای ۳۵ تا پنج درجه سانتی‌گراد بررسی شده است [۱۸].

تاکنون به‌منظور اثر سطوح گلوتاتیون در رقیق‌کننده بر پایه نانوذره لسیتین بر انجمادپذیری اسپرم گاو بررسی نشده است. هدف از این پژوهش، بررسی اثر سطوح گلوتاتیون در رقیق‌کننده برپایه نانوذره لسیتین بر انجمادپذیری اسپرم گاو و بررسی کیفیت آن پس از فرایند انجماد– یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها

لسیتین سویا و گلوتاتیون احیا از شرکت سیگما آلدریچ (St. Louis, MO, USA) و دیگر مواد شیمیایی موجود در بافر از مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شد. در این پژوهش، از شش رأس گاو نر هلشتاین با میانگین سنی سه تا چهار سال (شرایط نگهداری و تغذیه‌ای یکسان) که در مرکز تولید اسپرم گاو شرکت نهاده‌های دامی جاهد کرج نگهداری می‌شدند استفاده شد. اسپرم گیری به‌صورت دو بار در هفته و به‌مدت سه هفته تکرار شد. نمونه‌های منی با جنبایی بیش از ۷۰ درصد، غلظت بیش از ۹۰۰×۱۰^{٦} اسپرم بر میلی‌لیتر و ریخت‌شناختی غیرطبیعی کم‌تر از ۱۵درصد استفاده شد. غلظت نهایی اسپرم ۲۳×۱۰^{٦} اسپرم در هر پایوت محاسبه شد.

به‌منظور ساخت نانوذرات لسیتین، لسیتین سویا به مقدار سه درصد (وزنی– حجمی) به بافر بر پایه تریس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اضافه شد. سپس به‌منظور تهیه نانومیسل در محدوده اندازه ذرات کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر، به‌مدت ٤۵ دقیقه تحت امواج الکترومغناطیسی دستگاه سونیکاتور (مدل پروب دار، ایران) قرار گرفتند [٦]. پس از تهیه رقیق‌کننده بر پایه نانوذرات لیستین، به چهار گروه مختلف تقسیم و گلوتاتیون در چهار سطح مختلف صفر، یک، ۲/۵ و پنج میلی‌مولار به آن اضافه

شد. ساختار نانوذرات لسیتین سویا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده و الگوهای حرکتی اسپرم با استفاده از سامانه کامپیوتری ارزیابی اسپرم (CASA,Video TesT Sperm 2.1 Russia) ارزیابی شد. زنده‌مانی اسپرم با روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین ارزیابی شد [۱٦]. فعالیت غشای اسپرم از آزمون‌هاست بررسی شد. این آزمون بر اساس وجود اسپرم‌های با دم گره‌خورده پس از درمان با محلول هایپواسموتیک است [۵]. به‌منظور بررسی ریخت‌شناختی اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد [۱۷].

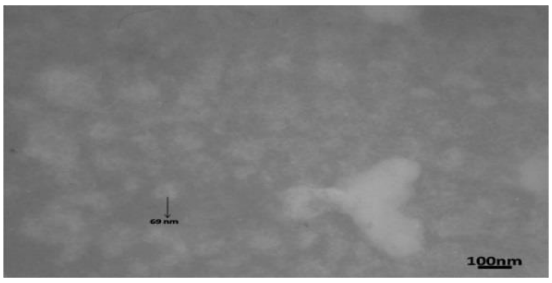
داده‌ها با نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) در قالب طرح کاملاً تصادفی برای مدل (۱) تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی مقایسه و داده‌ها به‌صورت میانگین خطای استاندارد میانگین گزارش شدند. نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد.

رابطه (۱) $Y^{ij}= \mu + T_i + e_{ij}$

که در این رابطه Y_{ij}، مقدار هر مشاهده؛ μ، میانگین صفت؛ T_i، اثر تیمار آزمایشی و e_{ij}، اثرات باقی‌مانده است.

نتایج و بحث

ساختار نانوذرات لسیتین موجود در رقیق‌کننده و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذارت لسیتین به‌ترتیب در شکل (۱) و جدول (۱) آورده شده است.



شکل ۱. ساختار نانوذرات لسیتین سویا موجود در رقیق‌کننده

جدول ۱. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات لسیتین (میانگین ± SE؛ تعداد=۳)

ویژگی‌های نانوذرات لسیتین	اندازه ذرات	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)
	۷۳/۷ ±۲/۳	-۱۹

نتایج فراسنجه‌های تحرک اسپرم در جدول (۲) آمده است. نتایج این پژوهش نشان داد که رقیق‌کننده حاوی ۲/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون جنبایی کل بیش‌تری (۳۸/ ٦۳ درصد) نسبت به سایر تیمارها داشت و تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد و رقیق‌کننده حاوی یک میلی‌مولار گلوتاتیون داشت (P<۰/۰۵). هم‌چنین نتایج آزمایش حاضر نشان داد که تیمار حاوی ۲/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون بالاترین جنبایی پیش‌رونده (٤۳/۱٦ درصد) را نیز به‌خود اختصاص داد (P<۰/۰۵). شاخص‌های حرکتی اسپرم تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. در مطالعه‌ای روی اسپرم بز، اثر افزودن گلوتاتیون در دو سطح پنج و ۱۰ میلی‌مولار در رقیق‌کننده بر پایه لسیتین با ذرات به اندازه میکرومتر ارزیابی شد که در آن تحقیق افزودن گلوتاتیون به رقیق‌کننده اسپرم بز نتوانست کیفیت اسپرم را پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی بهبود بخشد [۲۱]. این نتایج، احتمالاً به‌دلیل تفاوت گونه‌ای، استفاده از غلظت‌های بالای گلوتاتیون و شرایط آزمایشگاهی مختلف باشد. مطالعه دیگری نشان داد که افزودن ۰/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون توانست کیفیت اسپرم سردسازی‌شده در محیط زرده تخم‌مرغ را بهبود بخشد [۱۸]. نتایج این مطالعات با نتایج پژوهش حاضر موافق است و نشان می‌دهد، افزودن آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون به رقیق‌کننده، سبب بهبود کیفیت اسپرم منجمد می‌شود. اگرچه، مطالعه دیگری گزارش کرده است که افزودن گلوتاتیون به رقیق‌کننده اسپرم انسان اثر قابل‌توجهی بر جنبایی پیشرونده ندارد [۲۲].

جدول ۲. اثر سطوح مختلف گلوتاتیون در رقیق‌کننده بر پایه نانوذره لسیتین بر فراسنجه‌های تحرک اسپرم گاو پس از فرایند انجماد و ذوب

	رقیق‌کننده				
	نانوذره لسیتین بدون گلوتاتیون	نانوذره لسیتین حاوی ۱ میلی‌مول گلوتاتیون	نانوذره لسیتین حاوی۲/۵ میلی‌مول گلوتاتیون	نانوذره لسیتین حاوی ۵ میلی‌مول گلوتاتیون	SEM
تحرک کل	۵۱/۰۵[c]	۵٤/۱٤[bc]	٦۳/۳۸[a]	٦۰/۱۹[ab]	۱/۵٦
جنبایی پیشرونده	۳۱/۳[b]	۳۳/۲۱[b]	٤۳/۱٦[a]	۳۵/۵[b]	۱/۱۳
VSL (میکرومتر بر ثانیه)	۲۲/۵[ab]	۲٦/۰[a]	۲۲/۲ [ab]	۲۳/۲[b]	۱/۵
VCL (میکرومتر بر ثانیه)	۸۵/۹	۸۷/۸	۸۹/۵	۹۱/۰	۳/۲
VAP (میکرومتر بر ثانیه)	۳۸/۳	۳۲/۰	۲۸/۹	۳٦/۵	۳/۳
STR (درصد)	۵٤/٦	٤۸/۰	٤۸/۰	٤۵/۰	٤/۲
LIN (درصد)	۲۱/۵	۲۲/۲۳	۲۰/۲۱	۱۹/۷۵	۲/۲
ALH (میکرومتر)	۲/۹	۲/۷	۲/۳	۲/۱	۰/٤

a-b: تفاوت ارقام در هر ردیف با حروف نامشابه معنی‌دار است (P <۰/۰۵).

VSL: سرعت اسپرم در خط مستقیم، :VCL سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده، 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.

احتمالاً، وجود نتایج متناقض به‌دلیل تفاوت گونه باشد. طی فرایند انجماد- یخ‌گشایی، تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش سرمایی می‌تواند موجب تغییر در عملکرد و یکپارچگی غشای سلول شود [۳، ۲۳].

نتایج حاصل از آزمون زنده‌مانی سلول در جدول (۳) آورده شده است. درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها در رقیق‌کننده حاوی ۲/۵ درصد گلوتاتیون از سایر تیمارها بالاتر بود (P<۰/۰۵). نتایج ارزیابی فعالیت غشای اسپرم نشان داد که تیمار حاوی ۲/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون از سایر تیمارها بالاتر بود (P<۰/۰۵). نتایج آزمون ریخت‌شناختی اسپرم نیز نشان داد که تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۳).

به‌نظر می‌رسد، غلظت بهینه گلوتاتیون در رقیق‌کننده‌های مختلف اسپرم گاو متفاوت باشد. مطالعه‌ای نشان داده است که مکمل‌سازی رقیق‌کننده انجمادی با دو میلی‌مولار گلوتاتیون جنبایی و یکپارچگی غشای اسپرم خوک را بهبود بخشد [۲۰]. تنش اکسیداتیو محرک شروع فرایندهای مرگ سلولی است [۱۲]. هم‌چنین، گزارش شده است که رادیکال-های آزاد طی انجماد و یخ‌گشایی منی موجب مهار قدرت جنبایی، آسیب به DNA و نیز تغییر در شکل ظاهری سلول‌های اسپرم می‌شوند [۱۲]. گزارش‌هایی وجود دارد که نشان داده‌اند، افزودن گلوتاتیون به رقیق‌کننده انجماد اسپرم انسان سبب بهبود جنبایی اسپرم می‌شود [۸].

در مطالعه‌ای دیگر روی اسپرم خوک، نشان داده شد که افزودن گلوتاتیون به رقیق‌کننده انجمادی کیفیت اسپرم را نسبت به گروه شاهد افزایش داد [۷]. مطالعه دیگری گزارش کرده است که افزودن دو میلی‌مولار گلوتاتیون به رقیق‌کننده برپایه زرده تخم‌مرغ زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم گاو را بهبود بخشید [۱۸]. احتمالاً گلوتاتیون از طریق خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و به‌دنبال آن کاهش اکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای اسپرم به حفظ یکپارچگی آن کمک نماید [۱].

جدول ۳. اثر سطوح مختلف گلوتاتیون در رقیق‌کننده بر پایه نانوذره لسیتین بر فراسنجه‌های زنده‌مانی، سلامت غشا و ریخت‌شناختی اسپرم گاو پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی

	رقیق کننده				
	نانوذره لسیتین بدون گلوتاتیون	نانوذره لسیتین حاوی ۱ میلی‌مول گلوتاتیون	نانوذره لسیتین حاوی۲/۵ میلی‌مول گلوتاتیون	نانوذره لسیتین حاوی ۵ میلی‌مول گلوتاتیون	SEM
زنده‌مانی سلول	b۵۰/۵۳	b۵۲/۲۳	a٦٤/۸.	b۵۵/۱۹	۱/۵۷
سلامت غشا	c٤۷/۳	b۵۳/٤	a۵۸/۱۰	c٤۹/۲۰	۱/۱۳
ریخت‌شناختی	٦۹/۷۰	٦۹/۱٦	۷۱/۲۳	۷۱/۷	۲/۵۸

a-b: تفاوت ارقام در هر ردیف با حروف نامشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

چرا که اکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای اسپرم سبب کاهش یکپارچگی غشا و مرگ سلول می‌شوند [۱۹]. هم‌چنین، مطالعه‌ای وجود دارد که نشان داده است نانوذرات لسیتین سویا می‌توانند محافظت مناسبی از اسپرم بز طی فرایند انجماد و یخ‌گشایی به‌عمل آورند [۱٦]. ممکن است این امر به‌دلیل، انتقال و جایگزینی فسفولیپیدهای نانوذرات با غشای اسپرم باشد [٤].

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که غلظت پنج میلی‌مولار در مقایسه با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار اثر کم‌تری بر کیفیت اسپرم داشت. احتمالاً این سطح از گلوتاتیون برای سلول اثر سمی داشته است. در این راستا، مطالعه دیگری گزارش کرده است که افزودن پنج میلی‌مولار گلوتاتیون به رقیق‌کننده، نتوانست جنبایی را افزایش دهد [٦]. در مطالعه دیگری گزارش شد که افزودن GSH به مقدار پنج میلی‌مولار به رقیق‌کننده اثر معنی‌داری بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم و توانایی لقاح اسپرم پس از یخ‌گشایی نداشت [۲۰]. بین غلظت ROS و آنتی‌اکسیدان‌ها در شرایط طبیعی، تعادل وجود دارد [۱۱]. احتمالاً، این سطح گلوتاتیون سبب بهم خوردن تعادل بین ROSها و رادیکال‌های آزاد داخل اسپرم می‌شود و اثر سوئی بر سازوکارهای داخل سلول می‌گذارد. اگرچه، مطالعاتی وجود دارد که نتایج آن با نتایج مطالعه حاضر موافق نیست و گزارش کرده‌اند که غلظت پنج میلی‌مولار گلوتاتیون در رقیق‌کننده INRA82 کیفیت اسپرم اسبچه خزر را طی فرایند سردسازی در دمای پنج درجه سانتی‌گراد بهبود بخشید [۲٤]. وجود نتایج متناقض، احتمالاً به‌دلیل تفاوت گونه‌ای، نوع رقیق‌کننده مورداستفاده و روش اجرایی سردسازی و انجماد باشد. به‌نظر می‌رسد، ۲/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون سطح بهینه‌ای برای انجماد اسپرم گاو در رقیق‌کننده بر پایه نانوذره لسیتین باشد.

براساس نتایج حاصل، افزودن ۲/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون به رقیق‌کننده برپایه نانوذرات لسیتین می‌تواند کیفیت اسپرم گاو را پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی بهبود بخشد. به‌نظر می‌رسد، غلظت ۲/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون غلظت بهینه در رقیق‌کننده انجمادی گاو بر پایه نانوذرات لسیتین باشد.

تشکر و قدردانی

از مساعدت‌های مادی و معنوی پارک علم و فناوری دانشگاه تهران، و پژوهشکده فناوری‌های همگرای دانشگاه تهران (NBIC)، تشکر و قدردانی می‌گرددآزمایش حاضر در قالب طرح نوع ششم به شماره ۷۱۰۸۰۱۷/٦/۳۹ مورد حمایت دانشگاه تهران قرار گرفته است.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

1. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM (2004) Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reproductive Biomedicine Online 1; 8(6): 616-27.
2. Bhosrekar MR, Purohit JR, Mangurkar BR (1990) Studies on the effect of additives to semen diluent. Indian Journal of Animal Reproduction 11(2): 85-8.
3. Chatterjee S, and Gagnon C (2001) Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research 59(4): 451-458.
4. Cohen R, Mukai C, Travis AJ, (2016) Lipid regulation of acrosome exocytosis. InSperm acrosome biogenesis and function during fertilization 107-127.
5. de Oliveira RA, Wolf CA, de Oliveira Viu MA, Gambarini ML (2013) Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. Journal of Equine Veterinary Science 1; 33(12): 1148-52.
6. Donnelly ET, McClure N, and Lewis SE (2000) Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. Mutagenesis 15(1): 61-68.
7. Estrada E, del Álamo MM, Rodríguez-Gil JE, and 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 1; 78: 56-64.
8. Gadea J, Molla M, Selles E, Marco MA, Garcia-Vazquez FA, Gardon JC (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 1; 62(1): 40-6.
9. Gadea J, Sellés E, Marco MA, 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 1; 62(3-4): 690-701.
10. Gardón J, Rodriquez J, and 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(2): 155-155.
11. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS (2010) Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. 201.
12. Kvist U, Björndahl L, and Kjellberg S (1987) Sperm nuclear zinc, chromatin stability, and male fertility. Scanning Microscopy 1(3): 1241-1247.
13. Li Z, Lin Q, Liu R, Xiao W, and Liu W (2010) Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. Journal of Andrology 10; 31(5): 437-44.
14. Mari M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, (2009) Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. Antioxidants & Redox Signaling 1; 11(11): 2685-700.
15. Meister A (1994) Glutathione, ascorbate, and cellular protection. Cancer research 1; 54(7 Supplement):1969s-75s.
16. Nadri T, Towhidi A, Zeinoaldini S, Martínez-Pastor F, Mousavi M, Noei R, Tar M, and Sangcheshmeh AM (2019) Lecithin nanoparticles enhance the cryosurvival of caprine sperm. Theriogenology 15; 133: 38-44.
17. Najafi A, Zhandi M, Towhidi A, Sharafi M, Sharif AA, Motlagh MK, and 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 1; 66(3):275-82.
18. Triwulanningsih E, Situmorang P, Sugiarti T, Sianturi RG, Kusumaningrum DA, (2010) Effect of glutatione addition to the sperm diluent medium on quality of bovine chilled semen. Indonesian Journal of Agriculture 3(1): 60-5.
19. Niki E (2014) Antioxidants: basic principles, emerging concepts, and problems. Biomed Journal 37(3): 106-111.
20. Ogata K, Sasaki A, Kato Y, Takeda A, Wakabayashi M, Sarentonglaga B, Yamaguchi M, Hara A, Fukumori R, and Nagao Y (2015) Glutathione supplementation to semen extender improves the quality of frozen-thawed canine spermatozoa for transcervical insemination. Journal of Reproduction and Development 2014-130.

21. Salmani H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Towhidi A, Shahneh AZ, and Zhandi M (2013) Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. Small Ruminant Research 1; 112(1-3): 123-7.
22. Varghese AC, Das S, Bhattacharya AK, Bhattacharya SM, Mandal M, Agarwal A (2005) Effect of cryoprotective additives-reduced glutathione, acetyl-L-carnitine on sperm membrane lipid peroxidation, DNA integrity and recovery of motile human sperm. Fertility and Sterility. Sep 1; 84: S410-1.
23. Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR (1997) Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. Urology 1; 49(6): 921-5.
24. Zhandi M, and Ghadimi V (2014) Effect of glutathione-supplemented INRA82 extender on miniature Caspian stallion sperm quality during storage at 5 C. Journal of Equine Veterinary Science 34(5): 606-610.