[DOI: 10.29252/rap.10.25.61]
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 2:59 +0330 on Wednesday October 21st 2020

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

بهبود کیفیت اسپرم خروس با افزودن غلظت‌های مختلف نارینژنین بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی

مهدیه مهدی‌پور[1] و حسین دقیق‌کیا[2]

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز
۲- استاد گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز، (نویسنده مسوول: Daghighkia@tabrizu.ac.ir)
تاریخ ارسال: ۹۷/۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۲۹
صفحه: ۶۱ تا ۶۸

چکیده

تلقیح مصنوعی یک تکنولوژی تولیدمثلی است که در آن از بهترین نرهای پرورشی استفاده مؤثر می‌شود. تلقیح مصنوعی موفق، متأثر از عوامل متعددی می‌باشد که یکی از اصلی‌ترین و کلیدی‌ترین آن‌ها دسترسی به اسپرم‌های بارور بعد از فرآیند انجماد- ذوب می‌باشد. هدف از این پژوهش بررسی اثر غلظت‌های مختلف نارینژنین پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی می‌باشد. اسپرم‌گیری به‌صورت هفته‌ای دو بار و به روش مالش شکمی انجام شد. پس از افزودن رقیق‌کننده به نمونه‌های منی، نمونه‌ها برای تعادل دمایی در داخل یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس در تانک حاوی ازت مایع ذخیره شدند. غلظت‌های مختلف نارینژنین شامل ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار بودند. پس از یخ‌گشایی، پارامترهای جنبایی، زنده‌مانی، میزان ناهنجاری‌ها، یکپارچگی غشاء، میزان تولید MDA، فعالیت آندژنوسی آنزیم‌های SOD و گلوتاتیون پراکسیداز و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی، ارزیابی شد. نتایج نشان داد که جنبایی کل و پیش‌رونده در تیمار ۱۰۰ میکرومولار نارینژنین به‌طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار کنترل افزایش‌یافت. زنده‌مانی و یکپارچگی غشای سلول‌های اسپرم در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (p<۰/۰۵). تیمار ۱۰۰ میکرومولار نارینژنین باعث افزایش گلوتاتیون پراکسیداز و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و کاهش میزان MDA در مقایسه با تیمار کنترل شد (p<۰/۰۵). بر اساس نتایج تحقیق حاضر، نارینژنین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در محیط رقیق‌کننده، کیفیت اسپرم خروس را پس از یخ‌گشایی بهبود می‌بخشد.

واژه‌های کلیدی: نارینژنین، اسپرم خروس، انجماد، استرس اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدان

مقدمه

توسعه پرورش طیور در سال‌های اخیر و تبدیل آن به صنعتی عظیم و فعال از نظر تهیه گوشت سفید و تخم‌مرغ، در رفع نسبی بحران کمبود پروتئین حیوانی، بسیار مؤثر و مفید بوده و توانسته است از نظر تأمین مواد غذایی نقش ارزنده‌ای داشته باشد. برای پیشرفت هر چه بیشتر این صنعت نیاز به راهکارهایی برای کم شدن هزینه‌ها، انتخاب بهترین نژادها و افزایش بهره‌وری می‌باشد. در این زمینه با توجه به سهم بسیار بارز خروس‌ها در تعیین هزینه‌ها و مشکلات مربوط به مدیریت هم‌زمان مرغ و خروس در گله‌های مادر، بحث جداسازی خروس‌ها و استفاده از روش تلقیح مصنوعی مطرح است (۲۹). در روش تلقیح مصنوعی، می‌توان از یک انزال خروس برای بارور کردن ۲۰ مرغ استفاده کرد (۱۵) و هزینه‌های تولید را کاهش داد. در این روش می‌توان از اسپرم تازه و یا منجمد، استفاده کرد. اما محدودیت‌های زمانی ذخیره‌سازی به‌صورت مایع موجب گرایش به‌سوی انجماد اسپرم شده است (۱۰). انجماد اسپرم پرندگان در حدود ۵۰ سال است که مورد توجه می‌باشد و روش‌های گوناگونی در این راستا مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۸). نگهداری طولانی مدت و حمل و نقل آسان و عدم نیاز به نگهداری پرنده نر در واحدهای پرورش طیور از اهداف اصلی انجماد اسپرم طیور بوده است. افزون بر این، استفاده از اسپرم منجمد باعث کاهش انتقال بیماری‌ها در گله نیز خواهد شد و از آن برای حفظ و ایجاد بانک ژنومی گله‌های لاین و نژادهای برتر استفاده می‌شود (۹). اما در حال حاضر روند استفاده تجاری از اسپرم منجمد و تلقیح مصنوعی در صنعت مرغداری بسیار اندک بوده و یا در بسیاری از موارد انجام نمی‌گیرد؛ که از دلایل قابل‌ذکر آن، قابلیت انجمادپذیری پایین اسپرم (۱۴) و باروری کم در گله نسبت به تنش‌های اسمزی، شیمیایی و مکانیکی، طی فرآیندهای انجماد-ذوب مهم‌ترین دلایلی هستند که تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی را در اسپرم به وجود می‌آورد که در نتیجه آن، اسپرم تحت تأثیر این فرآیند قرارگرفته و منجر به کاهش باروری اسپرم خواهد شد. غشای پلاسمایی اسپرم دارای اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) زیادی است و بنابراین برای جلوگیری از آسیب پراکسیداسیون، به‌ویژه هنگام محافظت انجمادی، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها لازم است (۱۷).

نارینژنین یک فلاونویید طبیعی است که در مرکبات، گوجه‌فرنگی و کاکائو وجود دارد که دارای اثرات ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و حفاظت از سیستم عصبی می‌باشد (۱۵). نارینژنین ترکیبی با سه گروه هیدروکسیل بوده و بنابراین نسبت به سایر فلاوانون‌ها توانایی و قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی داشته و قادر است آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها را تحریک کند (۲۲). در یک تحقیق، توانایی نارینژنین باعث تغییرات مطلوبی از جمله هیپرگلایسمی در موش‌های دیابتی شد (۱۲). در تحقیقی دیگر، نارینژنین بلوغ آزمایشگاهی اووسیت را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرارداد، بدین‌صورت که توسعه کومولوس را کاهش داد (۲۶).

استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی مناسب می‌تواند در پیشبرد برنامه‌های انجماد اسپرم مؤثر باشد. این امر به‌ویژه در کشور ما می‌تواند مورد توجه واقع شود. استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی مناسب باعث افزایش کیفیت تلقیح مصنوعی می‌گردد. هدف

[DOI: 10.29252/rap.10.25.61]
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 2:59 +0330 on Wednesday October 21st 2020

از این پژوهش، بررسی اثر غلظت‌های مختلف نارینژنین پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش، از ۱۰ خروس بالغ سویه تجاری رأس (۳۰ هفته) که به‌طور تصادفی از گله مورد نظر انتخاب‌شده بودند، استفاده شد. تمامی خروس‌ها برای یک دوره سه هفته‌ای، به اسپرم‌گیری با روش مالش شکمی، عادت داده شدند. مایع منی به‌وسیله ماساژ شکمی به‌صورت هفته‌ای دو بار جمع‌آوری شد. برای پردازش مایع منی، غلظت بیشتر از ۳×۱۰^{۹} اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک بیش از ۸۰ درصد و مورفولوژی کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیرطبیعی، در هر انزال به‌عنوان مایع منی نرمال در نظر گرفته شد، در غیر این صورت مایع منی‌های جمع‌آوری‌شده حذف شدند. رقیق‌سازی به نسبت ۱ حجم منی و ۲۰ حجم محیط انجماد در دمای ۳۷ درجه انجام شد. از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای بر اثر نارینژنین روی اسپرم خروس انجام نشده بود غلظت‌های مورد مطالعه در این پژوهش براساس دوز یابی تعیین گردید. نارینژنین در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار به رقیق‌کننده اضافه شد. برای تعادل دمایی، نمونه‌ها به مدت سه ساعت در داخل یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۲۰). سپس نمونه‌های حاوی منی به داخل پایوت‌های انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و هفت دقیقه در معرض بخار ازت قرار گرفتند، سپس به تانک حاوی ازت مایع (۱۹۶- سانتی‌گراد) منتقل و به مدت حداقل ۴۸ ساعت نگهداری شدند. برای یخ گشایی مایع منی، پایوت ها از ازت مایع خارج و به مدت ۳۰ ثانیه در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس محتوای آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی تحرک اسپرم (CASA): برای ارزیابی تحرک اسپرم، پس از یخ‌گشایی نمونه‌های منی، پارامترهای تحرک‌کلی[۱] (TM)، تحرک پیش‌رونده[۲] (PM)، سرعت در مسیر میانگین[۳] (VAP)، سرعت در مسیر منحنی[۴] (VCL)، سرعت در مسیر مستقیم[۵] (VSL)، جنبایی‌عرضی سر[۶] (ALH)، خطی بودن جنبایی[۷] (LIN) ارزیابی گردیدند. برای بررسی پارامترهای تحرک، ابتدا نمونه‌های منی یخ‌گشایی شدند و پس از رقیق‌سازی اولیه، پنج میکرولیتر از نمونه را روی لام از قبل گرم شده (۳۷C°) قرار داده و با قرار دادن روی صفحه گرم میکروسکوپ، از هر نمونه حداقل ۵ زمینه به‌صورت کاملاً تصادفی انتخاب و به تعداد ۲۰۰ اسپرم به‌وسیله سیستم CASA; CEROS version 12.3 آنالیز شدند.

زنده‌مانی اسپرم: بررسی اسپرم‌های زنده و مرده با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین انجام گرفت (۱۸). ابتدا ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی را روی لام قرار داده و ۲۰ میکرولیتر رنگ ائوزین-نیگروزین به آن افزوده و مخلوط گردیده و سپس گسترش تهیه شد. بعد از خشک‌کردن، میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها با شمارش ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ×۴۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند. اسپرم‌هایی که رنگ را به خود جذب کرده بودند، اسپرم مرده و اسپرم‌هایی که رنگ نگرفته بودند به‌عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شدند.

ارزیابی یکپارچگی غشاء پلاسمایی (HOST): برای ارزیابی سلامت غشاء اسپرم، از محیط‌هاست (فروکتوز ۹ گرم در لیتر، سیترات سدیم ۴/۹ گرم در لیتر، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) استفاده شد. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از مایع منی رقیق‌شده با ۱۰۰ میکرولیتر محلول هایپواسموتیک ۱۰۰ mOsm/L مخلوط شد (۲۱). مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه مخلوط شده روی لام قرار داده شد و با لامل پوشانده و بلافاصله با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست، مورد بررسی قرار گرفت (۴۰۰× بزرگنمایی). در نهایت، ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. اسپرم‌های با دم متورم و تاب خورده به‌عنوان اسپرم با غشاء پلاسمایی سالم در نظر گرفته شدند .

ارزیابی مورفولوژی اسپرم (تست هانکوک): برای ارزیابی اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی، حداقل سه قطره از هر نمونه ذوب شده به میکروتیوب‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول هانکوک افزوده شد (۱۸). سپس یک قطره از این محلول را بر روی لام قرار داده و توسط یک لامل پوشانده شد. با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست (بزرگنمایی ۴۰۰×) درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه شد.

اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید: میزان MDA تولید شده توسط تست TBARS تعیین شد. یک میلی‌لیتر از نمونه اسپرم درون لوله فالکون ریخته شده، سپس به ترتیب یک میلی‌لیتر BHT، یک میلی‌لیتر EDTA و دو میلی‌لیتر TCA به نمونه اضافه شد. سپس نمونه‌ها بمدت ۱۵ دقیقه در g 1200 سانتریفیوژ شدند. یک میلی‌لیتر از مایع رویی که فاقد هرگونه مواد درشت موجود در محیط باشد، برداشته شده و به درون یک میکروتیوب ریخته شد. سپس یک میلی‌لیتر TBA به آن افزوده شد. سپس در میکروتیوب‌ها کاملاً بسته شده و نمونه‌ها بمدت ۱۵ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه گذاشته شدند و به‌مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگه‌داشته شدند تا سرد شوند. سپس، یک میلی‌لیتر از نمونه حاصل، درون کوت ریخته شد. غلظت MDA موجود در نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد.

اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی: اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی اسپرم با استفاده از کیت Randox صورت گرفت (۱۹). نمونه اسپرم به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و سپس پلاسما جدا شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه با ۱ میلی‌لیتر از کروموژن، در کووت نمونه مخلوط شدند و در کووت بلانک ۲۰ میکرولیتر از DDH2O با ۱ میلی‌لیتر از کروموژن مخلوط شدند. همچنین در کووت استاندارد ۲۰ میکرولیتر از استاندارد با ۱ میلی‌لیتر از کروموژن مخلوط شدند. در این روش ABTS با پراکسیداز و H2O2 برای تولید کاتیون ABTS انکوبه شده و رنگ پایدار

1- Total motility
2- Progressive motility
3- Average path velocity
4- Curvlinear velocity
5- Straight line velocity
6- Lateral head amplitude
7- linearit

[DOI: 10.29252/rap.10.25.61]
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 2:59 +0330 on Wednesday October 21st 2020

آبی- سبز که حداکثر جذب نوری آن ۶۰۰ نانومتر است، تولید می‌کند که به‌وسیله اسپکتروفتومتری قابل اندازه‌گیری است (۱۹).

ارزیابی میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px): میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) با توجه به روش ارائه شده توسط مهدی پور و همکاران (۱۹) تعیین شد. بدین منظور ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه مایع منی به ۰/۸ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش اضافه شده و به مدت پنج دقیقه قبل از شروع واکنش در ۲۵°C انکوبه شد. علاوه بر این از ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول H_2O_2 استفاده شد. میزان جذب نوری در ۴۱۲ نانومتر و به مدت پنج دقیقه با استفاده از اسپکتروفتومتر (T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) ثبت شد.

ارزیابی میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز: میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز نمونه‌های منی با استفاده از کیت Ransod شرکت رندوکس (RANDOX Laboratories Ltd., UK) مورد سنجش قرار گرفت (۱۹). نمونه‌های منی یخ‌گشایی شده به نسبت یک به پنج در PBS (۵۰ میلی‌مول و pH=۰/۷) رقیق شدند. روش سنجش شامل بافر سدیم کربنات (۵۰ میلی‌مول،pH=۱۰/۰)، ۰/۱ میلی‌مول گزانتین، میلی‌مول ۰/۰۲۵ نیترو تترازولیوم آبی، ۰/۱ میلی‌مول EDTA، گزانتین اکسیداز و در نهایت نمونه‌ها در یک کووت کوچک مخلوط شدند. به‌طورکلی، در صورت وجود آنزیم SOD در نمونه، رادیکال‌های سوپراکسید هیدروژن و O_2 تولید شده و از ایجاد رنگ قرمز فورمازان ممانعت می‌شود و میزان فعالیت آنزیم SOD به‌وسیله درجه ممانعت از این واکنش تعیین می‌شود. یک واحد SOD باعث مهار ۵۰ درصد سرعت احیاء Int و یا مهار ۵۰ درصد از اکسیداسیون NADPH تحت غلظت‌های اندازه‌گیری می‌شود.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی و بر اساس مدل‌های آماری زیر به کمک Proc GLM نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. این آزمایش در پنج تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون توکی انجام شد.

مدل آماری طرح به شرح زیر بود:

$$Yij=\mu+Ti+ eij$$

Yij: مشاهدات

μ: میانگین

Ti: اثر i امین تیمار

eij: اثرات باقیمانده

نتایج و بحث

اثر نارینژنین بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم

اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان نارینژنین بر فراسنجه‌های جنبایی بعد از فرایند انجماد-یخ‌گشایی در جدول ۱ نشان داده‌شده است. جنبایی کل در تیمار ۱۰۰ میکرومول به‌طور معنی‌داری از تیمار کنترل بالاتر بود (p<۰/۰۵). همچنین جنبایی پیش‌رونده بعد از یخ‌گشایی در تیمار ۱۰۰ میکرومول نسبت به تیمار کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود. در فراسنجه‌های VAP، VSL، VCL، ALH، LIN، STR و BCF تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد.

جدول۱ – تاثیر غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان نارینژنین بر ویژگی‌های جنبایی اسپرم پس از فرآیند انجماد یخ گشایی

Table 1. Comparison of sperm motility parameters after the process of freezing / thawing at different levels of naringenin

آنتی‌اکسیدان	میکرو مولار	TM (%)	PM (%)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	VCL (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
کنترل		۶۱/۰۶^{b}	۲۲/۰۳^{b}	۱۶/۳۷	۲۹/۹۴	۵۲/۴۷	۳۲/۸۸	۵۴/۶۵	۵/۲۵	۱۵/۳۳
نارینژنین	۵۰	۶۴/۱۳^{ab}	۲۴/۵۸^{ab}	۱۷/۳۰	۳۱/۲۴	۵۳/۲۳	۳۲/۱۴	۵۶/۵۱	۵/۲۸	۱۵/۵۹
	۱۰۰	۷۱/۲۱^{a}	۲۸/۴۶^{a}	۱۸/۶۸	۳۲/۰۱	۵۷/۱۳	۳۳/۰۲	۵۹/۲۵	۴/۷۸	۱۶/۰۶
	۱۵۰	۶۰/۹۴^{b}	۲۱/۶۱^{b}	۱۶/۵۴	۳۰/۳۳	۵۱/۰۸	۳۱/۲۶	۵۵/۵۹	۵/۰۴	۱۵/۴۹
SEM		۱/۸۰	۱/۵۹	۱/۷۶	۲/۰۵	۲/۸۶	۳/۸۷	۶/۲۷	۰/۲۴	۱/۱۳

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

TM: درصد جنبایی کل، PM: درصد جنبایی پیش‌رونده، LIN: درصد خطی بودن جنبایی STR: راستی مسیر طی شده (درصد) VCL: سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر بر ثانیه)، ALH: جنبایی عرضی سر (میکرومتر)، VAP: میانگین سرعت در مسیر (میکرومتر بر ثانیه)، VSL: سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر بر ثانیه)، BCF: تناوب عرضی زنش (هرتز)

اثر نارینژنین بر یکپارچگی غشاء، زنده‌مانی و ناهنجاری‌های اسپرم زنده‌مانی سلول‌های اسپرم در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد اما غلظت بالاتر از ۱۰۰ اثر بر غشای اسپرم‌ها نداشت (جدول ۲). یکپارچگی غشاء اسپرم‌ها در غلظت ۱۰۰ میکرومولار نارینژنین بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۲). درصد اسپرم‌های دارای ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در غلظت‌های مختلف نارینژنین تفاوت معنی‌داری باهم نداشت.

[DOI: 10.29252/rap.10.25.61]

Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 2:59 +0330 on Wednesday October 21st 2020

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف نارینژنین بر زنده‌مانی، مورفولوژی، یکپارچگی غشا و میزان مالون دی‌آلدهید پس از فرآیند انجماد-یخ گشایی

Table 2. Effects of different levels of naringenin on viability, morphology, and plasma membrane integrity after the process of freezing / thawing

آنتی‌اکسیدان	میکرو مولار	زنده‌مانی (%)	یکپارچگی غشای اسپرم (%)	اسپرم‌های غیرطبیعی (%)
کنترل		۶۴/۶۶[b]	۵۵/۹۳[b]	۱۴/۳۴
نارینژنین	۵۰	۶۶/۶۴[ab]	۶۱/۰۹[b]	۱۳/۸۱
	۱۰۰	۷۴/۹۹[a]	۶۸/۶۸[a]	۱۲/۹۳
	۱۵۰	۶۳/۳۶[b]	۵۷/۳۱[b]	۱۴/۰۷
SEM		۲/۳۲	۱/۷۰	۱/۰۰

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

اثر نارینژنین بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام

نتایج حاصل از بررسی اثرات غلظت‌های مختلف نارینژنین بر روی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز اسپرم‌ها در جدول ۳ نمایش داده شده است. استفاده از غلظت‌های مختلف نارینژنین نتوانست فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را افزایش دهد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان‌دهنده آن است که تیمار ۱۰۰ میکرومولار نارینژنین باعث افزایش گلوتاتیون پراکسیداز در مقایسه با تیمار کنترل‌شده است. میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰۰ میکرومولار نارینژنین در مقایسه با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). نتایج نشان داد که میزان تولید MDA در تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نارینژنین در مقایسه با سایر غلظت‌ها پایین‌تر بود (p<۰/۰۵).

جدول ۳- اثر نارینژنین بر فعایت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز ،ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و میزان تولید مانون‌دی آلدئید بعد از فرآیند انجماد -یخ‌گشایی

Table 3. The effect of naringenin on SOD, glutathione peroxidase and total antioxidant capacity after the freezing- thawing process

آنتی‌اکسیدان	میکرومولار	میزان تولید مانون‌دی آلدئید (nmol/mL)	گلوتاتیون پراکسیداز (U/mg)	سوپراکسید دیسموتاز (U/mg)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (mmol/l)
کنترل		۴/۲۶[a]	۵۴/۰۰[b]	۱۰۷/۷۰	۱/۱۳[b]
نارینژنین	۵۰	۳/۱۲[b]	۵۷/۸۵[ab]	۱۱۷/۸۷	۱/۶۶[ab]
	۱۰۰	۱/۹۰[c]	۶۲/۷۱[a]	۱۲۳/۹۲	۱/۸۸[a]
	۱۵۰	۴/۰۱[a]	۵۳/۶۱[b]	۱۰۸/۳۷	۱/۱۱[b]
SEM		۰/۱۶	۱/۹	۵/۵۶	۰/۱۶

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

این آزمایش اولین مطالعه درباره تأثیر غلظت‌های مختلف نارینژنین بر روی پارامترهای اسپرم یخ‌گشایی شده خروس همراه با ارزیابی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. تنش اکسیداتیو در غشای اسپرم باعث خسارات و تغییرات جبران‌ناپذیر در سیالیت غشاء و فعالیت آنزیمی اسپرم، همراه با کاهش در جنبایی، زنده‌مانی و توانایی لقاح‌پذیری اسپرم می‌شود (۸،۱). علاوه بر این، کاهش دما طی روند انجماد منی می‌تواند سبب تولید معنی‌دار ROS به‌وسیله اسپرم شود که باعث آسیب به عملکرد اسپرم همچون جنبایی اسپرم، یکپارچگی غشاء و باروری از طریق تنش اکسیداتیو عملکردی می‌شود (۱، ۲، ۳، ۸). مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با نارینژنین به‌طور مؤثری جنبایی کل و پیش‌رونده را در غلظت ۱۰۰ میکرومولار بهبود می‌بخشد. بلانکو و همکاران و بلسبویس و همکاران ثابت کردند که در اثر انجماد اسپرم، فاکتورهای غشایی از جمله سیالیت، نفوذپذیری و ترکیبات لیپیدی تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۴، ۵)، به‌طوری‌که پس از یخ‌گشایی، میزان سیالیت غشاء و مقدار ترکیبات لیپیدی اسپرم کاهش می‌یابد و این خود سبب کاهش قدرت جنبایی، باروری و زنده‌مانی اسپرم می‌شود (۵،۴). افزون بر این، لانگ در سال ۲۰۰۶ بیان کرد که محتوای ATP اسپرم در اثر انجماد تحت تأثیر قرار می‌گیرد و کاهش می‌یابد و این موضوع موجب کاهش جنبایی می‌شود (۱۶). این نتایج در راستای پژوهش‌های فوق نشان داد گرچه جنبایی اسپرم پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی کاهش می‌یابد، اما می‌توان با افزودن نارینژنین از روند کاهش جنبایی که پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی رخ می‌دهد، به‌طور معنی‌داری است. اسپرمی که به لحاظ عملکردی طبیعی است، غلظت‌های پایینی از گونه‌های اکسیژن فعال را تولید می‌کند. اما در اثر فرآیندهای سرد کردن و انجماد، کانال‌های یونی کلسیم تحریک‌شده و یک هجوم وابسته به کلسیمی از گونه‌های اکسیژن فعال را نشان داده که در نهایت منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود. تولید مقدار متوسط از گونه‌های اکسیژن

[DOI: 10.29252/rap.10.25.61]
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 2:59 +0330 on Wednesday October 21st 2020

فعال ممکن است با فرآیندهای طبیعی بلوغ درگیر شده با کاپاسیتاسیون و واکنش آکروزمی، همراه شود ولی گونه‌های اکسیژن فعال اضافی و استرس اکسیداتیو باعث کاهش فعالیت آنزیم‌هایی که در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی نقش دارند شده و موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید، کاهش یکپارچگی غشا، افزایش نفوذپذیری سلول، غیرفعال شدن آنزیم‌های موجود در غشا، آسیب به DNA، کاهش در جنبایی و ظرفیت باروری اسپرم ذخیره‌شده می‌شود و برای اسپرم زیان‌آور است (۷). نتایج این آزمایش با نتایج یک آزمایش دیگری که بر روی اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان روی انجماد اسپرم خروس بود، مطابقت دارد. آنها نشان دادند غلظت‌های که میزان تحرک کل و پیش‌رونده در زمان استفاده از آنتی‌اکسیدان بهبود می‌یابد (۱۸). نتایج این آزمایش (جدول شماره ۲) نشان می‌دهند که درصد اسپرم‌های با غشای سالم در طی فرآیند انجماد –یخ‌گشایی در تیمارها ۱۰۰ میکرومولار نارینژنین افزایش معنی‌داری داشته است. تخریب یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم ناشی از به‌هم‌ریختگی آرایش لیپیدها در داخل غشا در طول حفظ انجماد منی ممکن است آسیب‌های سلولی بیشتری را القا کند و در نتیجه منجر به مرگ سلول اسپرم شود (۲۵). یکپارچگی غشای پلاسمایی یکی از فراسنجه‌های تشخیص سلامت اسپرم بوده و در نرخ باروری مؤثر می‌باشد. ترکیب لیپیدی غشای اسپرم خروس نقش تعیین‌کننده‌ای در کیفیت و میزان باروری آن ایفا می‌کند. اسپرم خروس نسبت به پستانداران دارای اسیدهای چرب غیراشباع بیشتری در غشای خود بوده که این امر موجب افزایش حساسیت اسپرم خروس به پراکسیداسیون لیپیدها شده است (۶). این امر نیز سبب افزایش آسیب‌هایی نظیر کاهش زنده‌مانی، تحرک و قابلیت باروری طی فرآیندهای نگهداری اسپرم می‌شود (۱۳). این در حالی است که افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مناسب به محیط نگهداری اسپرم طیور می‌تواند تا حدی از شدت آسیب‌های وارده به اسپرم کاسته و کیفیت اسپرم را طی فرآیندهایی نظیر سردسازی و انجماد افزایش دهد (۲۲). نشان داده شده است که نارینژنین علاوه بر اثرات بالقوه آنتی‌اکسیدانی، قادر به حمله کردن به رادیکال‌های آزاد است و دارای اثرات ضدالتهابی برجسته‌ای نیز می‌باشد (۲۴). نتایج این پژوهش با نتایج شرفی و همکاران ۲۰۱۵ که نشان دادند استفاده از آنتی‌اکسیدان باعث افزایش یکپارچگی غشاء می‌شود مطابقت دارد (۲۶). افزودن نارینژنین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار، پارامتر زنده‌مانی را به‌طور مؤثری در مقایسه با گروه شاهد بالا برده و بنابراین نارینژنین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را به‌طور ویژه‌ای بروز داده است. لذا می‌توان گفت که عملکرد مثبت این غلظت تیماری بر پارامترهای تحرک کل و تحرک پیش‌رونده احتمالاً با زنده‌مانی اسپرم‌ها در ارتباط می‌باشد. نتایج این پژوهش با نتایج مهدی‌پور و همکاران ۲۰۱۶ که نشان دادند استفاده از آنتی‌اکسیدان باعث افزایش زنده‌مانی اسپرم می‌شود مطابقت دارد (۱۹). نتایج ما در مورد میزان اسپرم‌های غیرطبیعی با استفاده از محلول هانکوک نشان‌دهنده این است که افزودن ۱۰۰ میکرومولار نارینژنین، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را کاهش داد که این کاهش، معنی‌دار نبود. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسمای منی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته است. در این آزمایش غلظت MDA در غلظت ۱۰۰ میکرومولار نارینژنین به‌طور معنی‌داری کمتر بود. نتایج این پژوهش با نتایج فتاح و همکاران ۲۰۱۷ که نشان دادند استفاده از آنتی‌اکسیدان باعث کاهش معنی‌دار غلظت MDA می‌شود مطابقت دارد (۱۱). فلاونوئیدها از جمله نارینژنین، رایج‌ترین گروه پلی‌فنولیکی هستند که تقریباً در همه گیاهان وجود دارند. نارینژنین‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کرده و دارای خاصیت ضدسرطان ضدمیکروبی، ضدالتهاب و غیره هستند (۲۴). ساختار شیمیایی آنها بصورت C6-C3-C6 بوده که دو گروه C6 شامل حلقه بنزن و گروه C3 آن یک زنجیره آلیفاتیک شامل حلقه پیران می‌باشد. مشخص شده است که ترکیبات فنولیک (بخصوص نارینژنین) با پوشش دادن لیپیدها، روند پراکسیداسیون لیپیدی را تغییر داده و متوقف می‌کنند. همچنین با کاهش سیالیت غشاهای سلولی و جلوگیری از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و محدود کردن پراکسیداسیون فسفولیپیدها و اسیدهای چرب غیراشباع، از غشاهای سلولی محافظت کنند (۲۷). در تحقیق حاضر، نارینژنین باعث بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و در نتیجه افزایش جنبایی و بهبود یکپارچگی غشای اسپرم شد. نشان داده شده است که میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها با تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل ارتباط دارد. نارینژنین ترکیبی با سه گروه هیدروکسیل بوده و بنابراین توانایی و قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی داشته و قادر است آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها را تحریک کند. مصطفی و همکاران (۲۰۱۶) نشان داده شده است که نارینژنین علاوه بر اثرات بالقوه آنتی‌اکسیدانی، قادر به حمله کردن به رادیکال‌های آزاد می‌باشد. بنابراین نارینژنین با توجه قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا در این آزمایش باعث کاهش میزان MDA شده است. افزایش غلظت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی (TAC) ممکن است نقش معنی‌داری در MDA اسپرم داشته باشد. زیرا بازدارنده‌های مختلفی شامل GPX، SOD و CAT در اسپرم و پلاسمای منی وجود دارد که با حذف رادیکال‌های آزاد سبب حفظ اسپرم در برابر آسیب اکسیداتیو می‌شود. در این مطالعه میزان فعالیت GPX در گروه تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولار نارینژنین نسبت به گروه شاهد بهبود معنی‌داری یافت. در این مطالعه غلظت SOD تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نداشت. همچنین مشاهده شده است که فعالیت SOD پلاسمای منی، همبستگی معنی‌داری با تحرک و غلظت اسپرم ندارد (۱۹). نتایج این پژوهش با نتایج نجفی و همکاران ۲۰۱۸ که نشان دادند استفاده از آنتی‌اکسیدان باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و GPX می‌شود مطابقت دارد (۲۰).

با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش استفاده از نارینژنین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار می‌تواند باعث بهبود کیفیت اسپرم پس از انجماد– ذوب شود.

[DOI: 10.29252/rap.10.25.61]
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 2:59 +0330 on Wednesday October 21st 2020

منابع

1. Aitken, R.J., J.S. Clarkson and S. Fishel. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biology of Reproduction, 41: 183-97.
2. Aitken, R.J., D. Buckingham and D. Harkiss. 1993. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. Reproduction, Fertility and Development, 97: 441-50.
3. Alvarez, J.G. and B.T. Storey. 1984. Assessment of cell damage caused by spon-taneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa . Biology of Reproduction, 30: 323-331.
4. Blanco, J.M., G. Gee, D.E. Wildt and A.M. Donoghue. 2000. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. Biology of Reproduction, 63: 1164-1171.
5. Blesbois, E., I. Grasseau and F. Seigneurin. 2005. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. Reproduction, 129: 371-378.
6. Breque, C., P. Surai and J.P. Brillard. 2003. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. Molecular Reproduction and Development, 66: 314-23.
7. Bucak, M.N., S. Sarıözkan, P.B. Tuncer, P.A. Ulutaş and H.İ. Akçadağ. 2009. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. Small Ruminant Research, 81: 90-95.
8. De Lamirande, E. and C. Gagnon. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. Journal of Andrology, 13: 368-378
9. Donoghue, A. and G. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. Animal Reproduction Science, 62: 213-232.
10. Douard, V., D. Hermier, M. Magistrini, C. Labbé and E. Blesbois. 2004. Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology, 61: 1-13.
11. 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.
12. Fallahi, F., M. Roghani and S. Moghadami. 2012. Citrus flavonoid naringenin improves aortic reactivity in streptozotocin-diabetic rats. Indian Journal of Pharmacology, 44(3): 382-387.
13. Feyzi, S., M. Sharafi and S. Rahimi. 2018. Stress preconditioning of rooster semen before cryopreservation improves fertility potential of thawed sperm. Poultry Science, 97: 2582-2590.
14. Hammerstedt, R.H. and J.K. Graham. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. Cryobiology, 29: 26-38.
15. Leeson, S. and J.D. Summers. 2010. Broiler breeder production, Nottingham University Press, pp. 21-47.
16. Long, J. 2006. Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? Poultry Science, 85: 232-236.
17. 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.
18. 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.
19. Mehdipour, M., H.D. Kia, A. Najafi, H.V. Dodaran and O. Garcia-Alvarez. 2016. Effect of green tea (Camellia sinensis) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. Cryobiology, 73: 297-303.
20. 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.
21. Najafi, A., H. Daghigh-Kia, H.V. Dodaran, M. Mehdipour and M. Alvarez-Rodriguez. 2017. Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. Animal Reproduction Science, 177: 35-41.
22. Najafi, A., R.A. Taheri, M. Mehdipour, F. Martínez-Pastor, A.A. Rouhollahi and M.R. Nourani. 2018. Improvement of post-thawed sperm quality in broiler breeder roosters by ellagic acid-loaded liposomes. Poultry Science, 195: 168-175.
23. Pérez-Pastén, R., E. Martínez Galero and G. Chamorro-Cevallos. 2010. Quercetin and naringenin reduce abnormal development of mouse embryos produced by hydroxyurea. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 62: 1003-1009.

[DOI: 10.29252/rap.10.25.61]
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 2:59 +0330 on Wednesday October 21st 2020

24. Roy, S., N. Rahaman, F. Ahmed, S. Metya and S. Sannigrahi. 2013. Naringenin attenuates testicular damage, germ cell death and oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: naringenin prevents diabetic rat testicular damage. Journal of Applied Biomedicine, 11: 195-208.
25. Salamon, S. and W. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science, 62: 77-112.
26. Sharafi, M., M. Zhandi and A. Akbari Sharif. 2015. Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. Cell Tissue Bank, 16: 261-9.
27. Solak, K.A., R.R. Santos, M. van den Berg, B.J. Blaauboer, B.A. Roelen and M.B. van Duursen. 2014. Naringenin (NAR) and 8-prenylnaringenin (8-PN) reduce the developmental competence of porcine oocytes in vitro. Reproductive Toxicology, 49: 1-11.
28. Tselutin, K., F. Seigneurin and E. Blesbois. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. Poultry Science, 78: 586-590.
29. Zribi, N., N.F. Chakroun, F. Ben Abdallah, H. Elleuch, A. Sellami, J. Gargouri, T. Rebai, F. Fakhfakh and L.A. Keskes. 2012. Effect of freezing-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. Cryobiology, 65: 326-31.

[DOI: 10.29252/rap.10.25.61]
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 2:59 +0330 on Wednesday October 21st 2020

Improving Rooster Sperm Quality by Adding Different Levels of Naringenin after Freezing-Thawing Process

Mahdiyeh Mehdipour[1] and Hossein Daghighkia[2]

1- PhD Student Department of Animal Science University of Tabriz
2- Professor Department of Animal Science, University of Tabriz, (Corresponding author: Daghighkia@tabrizu.ac.ir)
Receive: September 11, 2018 Accepted: May 12, 2019

Abstract

Artificial insemination is a reproductive technology that uses the best male breeders. Successful artificial insemination is affected by several factors, one of the most important of which is the availability of fertile sperm after the freezing-thawing process. The purpose of this study was to investigate the effect of different concentrations of naringenin after the freezing process. Sperm collection was performed twice a week using abdominal masage. After adding the diluent to the semen samples, the samples were placed in the refrigerator at a temperature of 4°C for equilibration. Samples were then transferred to freezing straws and exposed to nitrogen vapor, then stored in a tank containing liquid nitrogen. After thawing, several parameters containing motility, viability, abnormality, membrane integrity, MDA production, SOD and GPX enzymes and total antioxidant capacity were evaluated. The results indicate that the total and progressive cavity in 100 µM naringenin treatment significantly increased compared to control treatment. The percentage of sperm with morphological abnormalities in different concentrations of naringenin did not differ significantly ($p<0.05$). The viability and membrane integrity of the sperm cells at 100 µm concentration increased significantly compared to the control group. The results of this experiment indicate that 100 µm naringenin treatment increased glutathione peroxidase and total antioxidant capacity and reduced MDA levels compared to control group. Based on the results of this study, naringenin at 100 µm in a diluent medium improves rooster sperm quality after freeze-thawing.

Keywords: Antioxidant, Freezing, Naringenin, Oxidative Stress, Rooster Sperm