دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

تأثیر مقادیر مختلف آنتی‌اکسیدان ۴،۲-دی‌نیتروفنول و لوتئولین بر کیفیت منی خروس طی انجماد-یخ‌گشایی

مهدی نظری[۱]، حسین دقیق‌کیا[۲]، ابوذر نجفی[۳]، مهدیه مهدی‌پور[۴] و جمیله امامی[۵]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، (نویسنده مسوول: daghighkia@tabrizu.ac.ir)
۳-استادیارگروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران
۴- محقق گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۵- دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۲
صفحه: ۱۰۹ تا ۱۱۷

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: طی انجماد اسپرم تولید گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، موجب آسیب به ساختارهای عملکردی اسپرم می‌شود. بیشترین تنش به دلیل تولید فراوان گونه‌های فعال اکسیژن و عدم نفوذپذیری آنتی‌اکسیدان‌ها به داخل میتوکندری، متوجه این اندامک می‌شود. در این مطالعه اثرات افزودن ۴ سطح ترکیبی از آنتی‌اکسیدان ۴،۲-دی‌نیتروفنول که یک آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی است و لوتئولین که از قوی‌ترین ترکیبات فلاونوییدی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی را دارد، در رقیق‌کننده لیک بر پایه لسیتین مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: بدین منظور نمونه‌های منی از ۱۵ خروس سویه راس با سن ۲۸ هفته به روش مالش پشتی-شکمی جمع‌آوری شدند. نمونه‌های منی پس از ارزیابی اولیه باهم مخلوط و پس از رقیق‌سازی و افزودن سطوح مختلفی به ترتیب تیمار ۱ (۰/۵ نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفنول + ۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۲ (۰/۵ نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفنول + ۱ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۳ (۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفنول + ۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۴ (۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفنول + ۱ میکرومولار لوتئولین) از آنتی‌اکسیدان‌ها، نمونه‌ها ابتدا برای تعادل دمایی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بمدت ۲ ساعت نگهداری شده و پس از لود شدن در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری در فاصله ۷ سانتی‌متری بوسیله بخار ازت منجمد و سپس در داخل ازت مایع غوطه‌ور شدند. پس از یخ‌گشایی، نمونه‌ها از نظر فراسنجه‌های عملکردی و بیوشیمیایی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که افزودن تیمارهای ۲ و ۳ به رقیق‌کننده لیک طی انجماد و یخ‌گشایی اسپرم خروس باعث افزایش معنی‌دار فراسنجه‌های تحرک کل و حرکت پیش‌رونده گردید و همینطور تیمار ۳ سبب افزایش معنی‌دار سرعت اسپرم در خط مستقیم و معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم نیز شد، تیمار ۲ و ۳ زنده‌مانی را نیز بصورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش داد و سبب کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید مایع منی و اسپرم‌های با ریخت‌شناسی غیر طبیعی طی انجماد و یخ‌گشایی شد ($p<۰/۰۵$) همینطور تیمار ۳ توانست میزان یکپارچگی غشا پلاسمایی نسبت به گروه کنترل افزایش بدهد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده ترکیبی این دو آنتی‌اکسیدان سبب هم‌افزایی خاصیت هر دو آنتی‌اکسیدان شده و سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی و کمی اسپرم خروس طی مرحله انجماد و یخ‌گشایی شده است.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، پروتئین جفت نشده، تنش اکسیداتیو، فلاونویید

مقدمه

تلقیح مصنوعی، استفاده مؤثر از اسپرم مازاد را ممکن می‌سازد. در روش تلقیح مصنوعی، می‌توان از یک انزال خروس برای بارور کردن ۲۰ مرغ استفاده کرده و هزینه‌های تولید را کاهش داد (۲۵). نگهداری منی مهم‌ترین مرحله در تلقیح مصنوعی است. با توجه به فاصله زمانی بین اسپرم‌گیری و تلقیح مصنوعی، داشتن یک محیط مناسب برای نگهداری اسپرم‌ها، با استفاده از رقیق‌کننده مناسب ضروری به نظر می‌آید (۷)، در این حالت می‌توان از اسپرم تازه و یا منجمد استفاده کرد. اما برای نگهداری طولانی‌مدت اسپرم نیاز به انجماد آن می‌باشد. انجماد اسپرم بیش از نیم‌قرن است که روی گونه‌های مختلف انجام می‌شود. تلاش‌های بسیاری در جهت انتخاب، گسترش و بهینه‌سازی پروتکل‌های انجماد و نرخ سردسازی انجام‌شده است. بازده عملی پروتکل‌های انجماد با موفقیت‌های مختلفی همراه بوده و تقریباً ۵۰ درصد از اسپرم‌ها در فرآیند انجماد و ذوب نمی‌توانند زنده بمانند (۳۸). عدم درک مکانیسم آسیب‌های انجماد یکی از علل محدودکننده استفاده از تلقیح مصنوعی می‌باشد. فرآیند انجماد اسپرم منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها در اسپرم می‌گردد. در حال حاضر یکی از دلایل اصلی آسیب اسپرم علاوه بر شوک سرمایی، تنش اکسیداتیو می‌باشد (۳۴). تنش اکسیداتیو یکی از علت‌های کاهش توان باروری اسپرم در شرایط برون تنی و درون تنی نامیده شده است. میتوکندری‌ها، جایگاه اصلی تولید ROS درون سلولی هستند که تولید بیش از حد ROS در این اندامک موجب ناهنجاری در انتقال الکترون، می‌شود (۴۵،۴). احتمال می‌رود که هیدروژن پراکسید بیشترین آسیب‌های سلولی و کنشی را به اسپرم وارد می‌کند زیرا تراوایی غشا کاملاً زیاد است و سیتوپلاسم و میتوکندری‌های اسپرم نیز مقادیر زیادی سوپراکسید دیسموتاز دارند. اگر تولید ROS، بیشتر از توان آنتی‌اکسیدانی اسپرم برای خنثی کردن اثر آن‌ها باشد، اسپرم دچار نوعی تنش اکسیداتیو می‌شود که از ویژگی‌های آن، آسیب پراکسیدی به غشای اسپرم و آسیب فیزیکی به DNA است. کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها در جیره، تا اندازه‌ای موجب بهبود باروری شده است. از سویی، افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به منی در شرایط برون تنی، بهبود کیفیت

1- Uncoupling Protein

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.4.1]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.109]

اسپرم را در پی داشته است (۳۷،۳۳،۳۲). ۴،۲-دی‌نیترو فنول (DNP) یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های جفت نشده (UCP[1]) است که از طریق تعدیل سوخت‌وساز اسپرم سبب کاهش تولید ROS می‌گردد (۱۸). DNP یک ترکیب مشتق از نیتروژن آلی است. سازوکار عمل DNP بر اساس برهم زدن گرادیان پروتون در اطراف غشای میتوکندری و جلوگیری از تشکیل ATP و ROS است. ROSها می‌توانند در میتوکندری تجمع یافته و موجب آسیب به میتوکندری، جهش در ژنوم میتوکندری، آسیب به DNA و پراکسیداسیون پروتئین و پراکسیداسیون لیپید و در نهایت سبب مرگ اسپرم شوند (۴۳). DNP یک پروتئین جفت نشده میتوکندریایی است که به پروتون‌ها اجازه می‌دهد که از غشای داخلی میتوکندری عبور کنند به‌گونه‌ای که سبب جدا شدن اکسیداسیون از فسفریلاسیون می‌گردد که نتیجه آن افزایش انتقال الکترون و به دنبال آن باعث کاهش تولید ROS می‌گردد (۱۸). جداکننده‌ها می‌توانند تولید ATP را شدیداً کاهش دهند. در واقع زنجیره انتقال الکترون می‌تواند بدون تولید ATP ادامه یافته و باعث افزایش میزان متابولیسم پایه شود (۴۲). جداکننده‌ها از طریق بسیاری از سازوکارها تولید ROS در میتوکندری را به مقدار قابل‌توجهی کاهش می‌دهند (۱۰). تولید سوپراکسید بوسیله کمپلکس I و III زنجیره انتقال الکترون یک فرآیند غیرآنزیمی بوده و بوسیله شیب بالای الکتروشیمیایی به‌شدت فعال است (۱۵). این رابطه non-ohmic بوده و می‌تواند تولید ROS را بدون کاهش زیاد در فسفرلاسیون اکسیداتیو محدود کند و از این رو پروتئین‌های جفت نشده میتوکندریایی نشان‌دهنده اولین خط دفاعی در مقابل تنش اکسیداتیو است (۲۲). لوتئولین[1](LTN) (۳،۴،۵،۷ تتراهیدروکسی فلاون) از جمله شناخته‌شده‌ترین ترکیبات فلاونوئیدی با گستردگی زیاد در سلسله گیاهی نظیر روغن زیتون، نعناع، رزماری، چای، آویشن و اسفناج است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی لوتئولین در شرایط درون و برون‌تنی به اثبات رسیده است (۴۹). فلاونوییدها علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارای خواص ضدمیکروبی، ضدویروسی و ضدجهش هستند (۲۱). مطالعات فارماکولوژیکی نشان می‌دهد که لوتئولین در محافظت از DNA در برابر H_2O_2 نقش مهمی داشته و اثرات آنتی‌اکسیدانی و پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد را دارد (۱۱). لوتئولین باعث کاهش تولید ROS در داخل سلول‌ها و افزایش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز می‌شود (۲۷). فعالیت آنتی‌اکسیدانی لوتئولین اصولاً به ساختار ۳ و ۴ دی هیدروکسی گروه کاتکول در حلقه فنلی B بعنوان فعال‌ترین جزء در مولکول‌های فلاونوئیدی نسبت داده می‌شود. همچنین پیوند دوگانه ۲ و ۳ در کونژوگاسیون با گروه ۴ اکسو یعنی جزء ۱ و ۴ پیرون بر حلقه C لوتئولین مورد توجه هستند تا در قدرت آنتی‌اکسیدانی مؤثر باشند؛ زیرا تغییر مکان الکترون جفت نشده بین حلقه‌های A، Bو C را میسر می‌کنند که به تشکیل رادیکال فنوکسیل پایدارتر منجر می‌شود (۲۹،۲۶). در این مطالعه با توجه به اثرات فارماکولوژیکی و زیستی گسترده هر دو آنتی‌اکسیدان برای اولین بار ترکیبی از این دو آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی و غیرهدفمند میتوکندریایی که هرکدام از این ترکیبات به‌تنهایی تأثیر مثبتی در عملکرد اسپرم گونه‌های مختلف دارند، در محیط رقیق‌کننده اسپرم خروس، طی فرآیند انجماد و یخ‌گشایی استفاده شد. آنتی‌اکسیدان هدفمند ۴-۲، دی‌نیتروفنل موجب تعدیل تولید ROSها در میتوکندری می‌شود و آنتی‌اکسیدان لوتئولین بعنوان یک فلاونویید موجب محافظت لیپیدهای غشا در برابر تنش اکسیداتیو و محافظت از DNA می‌شود. همچنین بعلت خاصیت ضدمیکروبی و ضدویروسی لوتئولین می‌تواند در نقش آنتی‌بیوتیک عمل کرده و محیط را از ROS پاک‌سازی کند. از لذا به نظر می‌رسد استفاده ترکیبی از مقادیر بهینه هر دو آنتی‌اکسیدان می‌تواند سبب به حداقل رسیدن تولید ROSها و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو شود و همینطور گمان می‌رود که استفاده هم‌زمان و ترکیبی آنتی‌اکسیدان‌های موردمطالعه اثرات هم‌افزایی داشته باشند.

مواد و روش‌ها

حیوانات و طراحی آزمایش

این پژوهش در واحد مرغداری ایستگاه تحقیقاتی و پژوهشی خلعت پوشان دانشگاه تبریز انجام شد. بدین منظور از ۱۵ قطعه خروس بالغ نژاد راس با سن ۲۸ هفته استفاده شد. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی به ابعاد ۷۰×۷۰×۸۵ سانتی‌متر و تحت شرایط ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی قرار داشتند. هرکدام از خروس‌ها روزانه با جیره یکسان ۱۵۰ گرم (ذرت ۵۰/۸٪، دانه سویا ۸/۹۵٪، گندم ۲۰٪، سبوس گندم ۱۴٪، دی کلسیم فسفات ۰/۷۴٪، سنگ‌آهک ۱/۸٪، نمک ۰/۳۸، لایزین ۰/۰۸٪، متیونین ۰/۱۷٪ و مکمل‌های ویتامینی و معدنی ۰/۵٪) تغذیه‌شده و دسترسی آزاد به آب داشتند. اسپرم گیری به روش مالش پشتی-شکمی و به‌صورت دو بار در هفته انجام گرفت. نمونه‌های اسپرم بلافاصله پس از جمع‌آوری در دمای ۳۷°C به آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا نمونه‌ها از نظر حجم، غلظت، تحرک و عدم وجود آلودگی بررسی شد و تنها نمونه‌های با حجم ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌لیتر، غلظت اسپرم بیشتر از ۳×۱۰^{۹} در هر میلی‌لیتر و تحرک بیش از ۸۰ درصد مورداستفاده قرار گرفت. برای از بین بردن اثرات انفرادی، نمونه‌های تأییدشده با یکدیگر مخلوط شد و به‌صورت یک نمونه واحد درآمد. به‌منظور رقیق‌سازی اسپرم‌ها از رقیق‌کننده لیک[2] اصلاح شده (فروکتوز ۰/۸gr، پتاسیم سیترات ۰/۵gr، سدیم آل گلوتامات ۱/۹۲gr، پلی‌وینیل پیرولیدون ۰/۳gr، منیزیم‌استات ۰/۰۷gr، گلیسین ۰/۳۷۴gr، با فشار اسمزی ۳۱۰ و pH ۷/۲) و لسیتین یک درصد و گلیسرول ۱۱٪ استفاده گردید. تیمارهای آزمایشی مشتمل بر موارد زیر بودند: تیمار شاهد: رقیق‌کننده لیک بدون آنتی‌اکسیدان، تیمار ۱: رقیق‌کننده لیک + ۰/۵ نانومولار DNP + ۰/۷۵ میکرومولار LTN، تیمار ۲: رقیق‌کننده لیک + ۰/۵ نانومولار DNP + ۱ میکرومولار LTN، تیمار ۳: رقیق‌کننده لیک + ۰/۷۵ نانومولار DNP + ۰/۷۵ میکرومولار LTN، تیمار ۴: رقیق‌کننده لیک + ۰/۷۵ نانومولار DNP + ۱ میکرومولار LTN (معیار انتخاب دوزهای ترکیبی آنتی‌اکسیدان، اخذ نتایج بهینه در آزمایش‌های قبلی بود) رقیق‌کننده پایه به دو قسمت

1- Luteolin
2- Lake

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.4.1]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.109]

مساوی تقسیم و به یکی از آنها یک چهارم گلیسرول (از ۱۱ درصد) و به دیگری سه چهارم گلیسرول (از ۱۱ درصد) افزوده شد. سپس رقیق‌کننده حاوی یک چهارم گلیسرول در ۵ فالکون به مقدار یک میلی‌لیتر ریخته شد و چهار تیمار ذکر شده اضافه گردید و یک لوله بدن دریافت گروه تیماری بعنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. سپس اسپرم به فالکون‌ها در دمای ۳۷°C اضافه گردید و بلافاصله فالکون‌ها به همراه رقیق‌کننده حاوی یک چهارم گلیسرول به یخچال که دمای آن روی ۴°C تنظیم شده منتقل گردید و بعد از دو ساعت سردسازی و رسیدن دمای نمونه‌ها به ۴°C، یک میلی‌لیتر رقیق‌کننده حاوی سه‌چهارم گلیسرول به هرکدام از فالکن‌ها افزوده شد که حجم محلول به ۲ میلی‌لیتر رسیده و رقیق‌سازی نهایی منی به نسبت ۱:۲۰ انجام شد (غلظت نهایی اسپرم در هر میلی‌لیتر $1/5 \times 10^8$). پس از رقیق‌سازی و بمدت یک ساعت دیگر در یخچال نگهداری شدند (۴۰). سپس نمونه‌ها را به داخل پایوت‌ها کشیده و بمدت ۷ دقیقه در ارتفاع ۴ سانتی‌متری از ازت مایع قرار داده و پس از انجماد نمونه‌ها، آنها را به داخل ازت مایع انتقال دادیم.

ارزیابی پارامترهای حرکتی اسپرم

جهت ارزیابی فراسنجه‌های جنبایی، ابتدا نمونه‌ها در دمای ۳۷°C بمدت ۳۰ ثانیه یخ گشایی شد (۳۶)، سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه را روی لام از قبل گرم شده قرار داده و بعد از پوشاندن با لامل، روی صفحه گرم میکروسکوپ، فراسنجه‌های جنبایی اسپرم شامل جنبایی کل، تحرک پیش‌رونده و ویژگی‌های کنتیکی اسپرم توسط سیستم کامپیوتری ارزیابی اسپرم (CASA, Video Test Sperm 3.1 Russia)[1] مورد ارزیابی قرار گرفت.

زنده‌مانی اسپرم

برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین–نیگروزین استفاده گردید (۵). بدین منظور بعد از یخ‌گشایی نمونه‌ها، ۱۰µl اسپرم از هر گروهتیماری بر روی یک لام قرارگرفته و با ۲۰µl از رنگ ائوزین نیگروزین مخلوط گردید. سپس توسط یک لام دیگر نمونه رنگ‌شده بر روی لام گسترش‌یافته و پس از خشک شدن، توسط میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ×۴۰ و شمارش ۲۰۰ اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده (رنگ نشده) و مرده (رنگ‌شده) تعیین شد.

یکپارچگی غشا اسپرم

برای ارزیابی یکپارچگی غشا از محلول‌هاست (HOST)[2]؛ (۹ گرم فروکتوز و ۴/۹ گرم سیترات در یک لیتر آب دوبار تقطیر) استفاده شد. بدین منظور ۱۰µl از نمونه منی را با µl ۱۰۰ از محلول‌هاست مخلوط کرده و بمدت نیم ساعت در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس ۱۰µl از نمونه را زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰× قرار داده، و چندین نقطه از محیط را بوسیله سیستم M SHOT Image analysis عکس‌برداری می‌کنیم. اسپرم‌هایی با دم خمیده، پیچیده یا متورم بعنوان اسپرم سالم در نظر گرفته شدند (۳۱).

مورفولوژی اسپرم

برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱۵۰ میکرولیتر محلول هانکوک افزوده شد و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شد و با شمارش زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی۴۰ ×، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی محاسبه شدند (۳۵). محیط هانکوک شامل ۶۲/۵ میلی‌لیتر فرمالین (۳۷ درصد)، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سالین، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر است. محلول سالین شامل ۹/۰۱ گرم کلرید سدیم در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر می‌باشد. محلول بافر خود از دو محیط جداگانه تشکیل شده است. محیط نخست شامل ۲۱/۶۸۲ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبدار در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و محیط دوم از ۲۲/۲۵۴ گرم فسفات پتاسیم در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر تشکیل شده است. با مخلوط کردن ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط نخست با ۵۰ میلی‌لیتر از محیط دوم، محلول بافر تهیه می‌شود. برای محاسبه درصد کل اسپرم‌های نابهنجار (ناهنجاری‌های آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) تعداد ۲۰۰ اسپرم از هر نمونه مورد بررسی قرار گرفته و شمارش شد.

اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید

به‌منظور تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای اسپرم از آزمون تیوباربیتوریک اسید (TBARS[3]) استفاده شد. در این آزمون، میزان مالون‌دی‌آلدهید بعنوان شاخصی از میزان پراکسیداسیون لیپیدها، از طریق واکنش با تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری می‌شود. لذا، ابتدا بمنظور رسوب پروتئین‌ها، ۱ml منی از هر گروه تیماری بعد از یخ‌گشایی در دمای ۳۷°C با ۲ml اسیدتری کلرواستیک در یک لوله استریل مخلوط کرده و سپس جهت جلوگیری از وقوع پراکسیداسیون لیپیدی در طی زمان انجام آزمایش، مقدار ۱ml از محلول هیدروکسی تولوئن بوتیله شده یا (BHT دو درصد در اتانول) به همراه ۱ml EDTA به محلول موردنظر افزوده شد. سپس نمونه‌ها بمدت ۱۵ دقیقه با دور g× ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، ۱ml از محلول رویی را برداشته و با ۱ ml از محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷ درصد در یک فالکن مخلوط کرده و بمدت ۲۰ دقیقه در آب ۹۵°C قرار گرفتند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب نور نمونه‌ها در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) اندازه‌گیری شد (۲۴).

آنالیز آماری

داده‌های بدست‌آمده برای فراسنجه‌های درصد تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، خطی بودن تحرک، زنده‌مانی، پاسخ به محلول HOST و هانکوک، سطح مالون‌دی‌آلدهید و سایر فراسنجه‌های سیستم کاسا بوسیله رویه GLM نرم‌افزار SAS (9.3) در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آنالیز قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی کرامر استفاده شد.

نتایج و بحث

در طی فرآیند انجماد، اسپرم‌ها بدلیل تولید ROS بیش از حد و کاهش سطح آنتی‌اکسیدان درون‌سلولی بیشتر مستعد آسیب‌های انجماد هستند. فرآیند انجماد و ذوب باعث ایجاد

1- Computer Assisted Sperm Analysis 2- Hypo Osmotic Swelling Test 3- Thiobarbituric acid reactive substances

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.4.1]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.109]

برخی تغییرات کشنده در خصوصیات ساختاری و عملکردی اسپرم‌ها یعنی اختلالات اسمزی، تشکیل کریستال یخ داخل و خارج سلولی می‌شود که باعث ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود (۲۰). میتوکندری اندامک مهمی در سلول اسپرم است که نقش اساسی در جنبایی، زنده‌مانی، بلوغ اسپرم و حفظ کیفیت باروری اسپرم دارد. بدلیل تولید مقادیر زیاد ROS در میتوکندری و عدم نفوذپذیری اکثر آنتی‌اکسیدان‌ها به آن، باعث شده که میتوکندری حساس‌ترین و آسیب‌پذیرترین بخش نسبت به ROSها و تنش اکسیداتیو باشند (۴۳،۱۶). همچنین ترکیب لیپیدی غشای اسپرم خروس نقش مهمی در کیفیت و باروری اسپرم دارد (۹). بدین منظور در این مطالعه اثر ترکیب آنتی‌اکسیدان هدفمند میتوکندریایی ۲،۴-دی نیتروفنل و آنتی‌اکسیدان لوتئولین بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم، غلظت مالون‌دی‌آلدهید، میزان سلامت غشاء، درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی طی فرآیند انجماد یخ‌گشایی بررسی شد. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که افزودن ترکیب آنتی‌اکسیدان‌ها به منی خروس باعث افزایش حرکت پیش‌رونده اسپرم‌ها می‌شود و این افزایش در تیمارهای شماره ۲ و ۳ نسبت به گروه شاهد معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$). افزودن تیمارهای ۲ و ۳ آنتی‌اکسیدانی باعث افزایش معنی‌دار تحرک کل در مقایسه با تیمار شاهد شد همچنین تیمار ۳ باعث افزایش معنی‌دار پارامترهای VSL و STR نسبت به گروه شاهد شد ($p<۰/۰۵$). تیمار ۳ نسبت به سایر گروه‌ها، تمایل به کاهش پارامتر BCF را نشان داد ($p=۰/۱۰$).

جدول ۱- مقایسه میانگین ویژگی‌های حرکتی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس در بین سطوح تیماری مختلف
Table 1. Mean comparison of motility parameters of frozen-thawed rooster sperm among treatment groups

متغیر	کنترل	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار۴	SEM	p-value
PM (%)	۲۸/۲۵^{b}	۳۷/۷۵^{ab}	۴۰/۵۰^{a}	۴۲/۵۰^{a}	۳۷/۲۵^{ab}	۲/۵۲	۰/۰۱۱۸
TM (%)	۵۳/۷۵^{b}	۶۳/۲۵^{ab}	۶۴/۷۵^{a}	۶۷/۲۵^{a}	۶۱/۷۵^{ab}	۲/۳۶	۰/۰۱۱۶
VAP(µm/s)	۲۴/۹۵	۲۱/۱۲	۲۹/۸۷	۲۹/۱۴	۲۵/۹۵	۱/۹۵	۰/۳۷۵۷
VSL(µm/s)	۱۸/۰۶^{b}	۱۹/۸۴^{ab}	۲۳/۱۰^{ab}	۲۴/۶۳^{a}	۲۰/۰۶^{ab}	۱/۲۵	۰/۰۱۳۶
STR (%)	۷۱/۴۸^{b}	۷۳/۳۵^{b}	۷۷/۹۷^{ab}	۸۳/۸۳^{a}	۷۷/۴۳^{ab}	۲/۲۴	۰/۰۱۳۲
ALH(µm)	۲/۴۶	۳/۱۳	۳/۷۳	۲/۸۷	۲/۵۵	۰/۴۰	۰/۲۱۵۸
VCL(µm/s)	۵۷/۷۱	۵۵/۴۱	۶۰/۱۸	۵۶/۰۰	۵۵/۹۷	۳/۳۰	۰/۸۴۱۸
LIN (%)	۳۱/۳۲	۳۶/۱۱	۳۸/۰۰	۴۲/۲۱	۳۳/۷۷	۳/۹۵	۰/۲۸۱۹
BCF(Hz)	۱۹/۱۲	۱۶/۹۱	۱۴/۶۲	۱۶/۹۱	۱۷/۹۴	۱/۱۰	۰/۱۰۲۴

میانگین‌ها با حروف ناهمسان (a,b,c) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$). PM: جنبایی پیش‌رونده، TM: جنبایی کل، ALH: بیشترین دامنه حرکت جانبی برحسب میکرومتر، BCF: فرکانس حرکت جانبی برحسب هرتز، LIN: معیار خطی بودن اسپرم که بر حسب درصد است، STR: معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد، VAP: میانگین سرعت در مسیر مستقیم، VCL: سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده، VSA: سرعت اسپرم در خط مستقیم.
تیمار ۱ (۰/۵ نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفنول + ۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۲ (۰/۵ نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفنول + ۱ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۳ (۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفنول + ۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۴ (۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفنول + ۱ میکرومولار لوتئولین)

DNP یک پروتئین جدا نشده میتوکندریایی است که به پروتون‌ها اجازه عبور از غشای داخلی میتوکندری را می‌دهد به‌گونه‌ای که سبب جدا شدن اکسیداسیون از فسفریلاسیون می‌گردد که نتیجه آن افزایش انتقال الکترون و افزایش میزان مصرف اکسیژن است که به دنبال آن سبب کاهش تولید ROS می‌گردد (۱۸). نتایج حاصل از مطالعه اسپرم ماهی نشان داد که جلوگیری از تولید ROS بوسیله ترکیبات UCP بهتر از تلاش برای حذف ROSها با استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی است (۴۷). همچنین گزارش‌شده است که القاء جداکننده‌های میتوکندی با استفاده از DNP در کشت جنین خوک و گاو مفید بوده است (۲۸). نتایج این تحقیق با داده‌های حاصل از مطالعه‌ای که روی اسپرم ماهی انجام شده بود همخوانی داشت، بطوریکه افزودن ۱ میکرومولار DNP به محیط انجماد اسپرم ماهی زرد باعث افزایش جنبایی اسپرم نسبت به گروه کنترل شد (۱۶). در یک پژوهشی گزارش کردند که افزودن ۱ میکرومولار DNP به اسپرم میمون رزوس باعث افزایش جنبایی اسپرم بعد از یخ‌گشایی نسبت به گروه کنترل شد (۱۴). همچنین افزودن یک میکرومولار DNP اسپرم ماهی زرد سبب افزایش تحرک و زنده‌مانی و سلامت غشا در انجماد شد (۱۶). نتایج ما نشان‌دهنده آن است که تیمارهای مورد استفاده باعث کاهش میزان تنش اکسیداتیو می‌شوند. یکی از مهمترین اثرات تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدها است. به خاطر وجود مقادیر زیاد لیپیدهای غیراشباع در غشاء پلاسمایی اسپرم، پراکسیداسیون لیپید سبب نابودی ساختار غشاء پلاسمایی اسپرم شده و بدنبال آن میزان زنده‌مانی و جنبایی اسپرم کاهش پیدا می‌کند (۲). افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها در محیط انجماد اسپرم، می‌تواند تولید بیش از اندازه ROS را در طول فرآیند انجماد و یخ‌گشایی کنترل کند (۳۹). با توجه به دلیل ذکر شده می‌توان احتمال داد تیمارهای مورد استفاده با کاهش آسیب به ساختار سلول اسپرم باعث افزایش کیفیت اسپرم شده‌اند. فلاوونوئیدها ترکیباتی هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته و از طریق سازوکارهای متفاوتی از لیپیدها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند. فلاوونوئیدها به‌عنوان جاروب‌کننده‌های طبیعی گونه‌های فعال اکسیژن هستند که در درمان ناباروری استفاده می‌شوند (۱۳). محققین نشان دادند که افزودن ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول بر لیتر از فلاوونوئید کوئرستین سبب حفظ زنده‌مانی اسپرم‌های گاو پس از انجماد می‌شود (۴۶). نتایج پژوهش‌ها نشان دادند که کوئرستین بعنوان فلاوونوئید توانایی کاهش میزان H_2O_2 در سلول اسپرم را دارا می‌باشد (۱). کوئرستین به سبب بهبود کیفیت و باروری آزمایشگاهی اسپرم‌های منجمد شده‌ی بوفالو می‌شود (۳). همچنین افزودن این ترکیب فلاوونوئیدی سبب بهبود معنی‌داری از نظر حرکت پیش‌رونده در اسپرم نریان می‌شود (۱۷). کوئرستین توانایی

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.4.1]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.109]

محافظت از اسپرم بز و رویان آن قبل از جایگزینی را در برابر آسیب القا شده توسط کادمیوم دارا می‌باشد (۳۰). مطالعات نشان دادند که اضافه کردن کریسین به‌عنوان فلاونویید به جیره باعث افزایش جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم و افزایش باروری خروس‌ها شد (۶). از دیگر ترکیبات مهمی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند می‌توان به فلاوونوئیدها اشاره کرد. آنها ترکیباتی هستند که از طریق سازوکارهای مختلفی نظیر مهار تشکیل ROS با مهار آنزیم‌ها یا از طریق به دام انداختن ریز عناصر درگیر در تشکیل رادیکال‌های آزاد، از لیپیدها در برابر آسیب اکسیداتیو حفاظت می‌کنند (۲۳). از آنجاییکه افزودن تیمارهای ۲ و ۳ باعث کاهش میزان مالون دی‌آلدهید داده و میزان یکپارچگی غشا اسپرم را افزایش می‌دهد می‌توان انتظار داشت که باعث بهبود و افزایش جنبایی سلول بشود. آنالیز داده‌های حاصل از افزودن ترکیب سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان‌ها روی زنده‌مانی اسپرم‌های منجمد شده نشان داد که درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها پس از انجماد-یخ‌گشایی در گروه‌های حاوی آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد (جدول ۲) که این افزایش در تیمارهای ۲ و ۳ نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($p<0/05$). در بین تیمارهای مورد مطالعه تیمار ۳ باعث بهبود معنی‌دار یکپارچگی غشای پلاسمایی نسبت به گروه شاهد شد ($p<0/05$). در این مطالعه افزودن تیمارهای ۲ و ۳ باعث کاهش میزان مقدار مالون‌دی‌آلدهید شد. در این مطالعه افزودن تیمارهای ۲ و ۳ باعث کاهش میزان مقدار مالون‌دی‌آلدهید شد. نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که تیمار ۲ و ۳ سبب کاهش معنی‌دار اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی شد ($p<0/05$).

جدول ۲- تأثیر مخلوط آنتی‌اکسیدان‌های ۴،۲-دی‌نیتروفنل و لوتئولین در رقیق‌کننده لسیتین بر صفات زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، میزان اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی و سطح مالون‌دی‌آلدهید

Table 2. Effect of 2.4-dinitrophenol and luteolin in a soybean lecithin extender on viability, plasma membrane functionality, abnormality, membrane lipid peroxidation

متغیر	گروه شاهد	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار۴	SEM	p-value
زنده‌مانی%	۵۸/۰۴^{b}	۶۶/۱۴^{ab}	۶۸/۲۴^{a}	۶۹/۱۸۹^{a}	۶۴/۷۰^{ab}	۱/۹۰	۰/۰۰۵
سلامت غشا%	۴۴/۲۰^{b}	۵۰/۵۲^{ab}	۵۰/۰۶^{ab}	۵۴/۵۹^{a}	۴۷/۸۱^{b}	۱/۵۵	۰/۰۰۴
اسپرم‌های ناسالم%	۳۱/۸۹^{a}	۲۵/۹۰^{ab}	۲۴/۳۰^{bc}	۱۸/۳۱^{c}	۲۷/۰۱^{ab}	۱/۵۳	۰/۰۰۰۳
غلظت مالون‌دی‌آلدهید	۲/۵۶^{a}	۲/۰۹^{ab}	۱/۹۶^{bc}	۱/۵۸^{c}	۲/۱۱^{ab}	۱/۱۱	۰/۰۰۰۳

میانگین‌ها با حروف ناهمسان (a, b, c) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌داری است ($p<0/5$).
تیمار ۱ (۰/۵ نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفنول + ۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۲ (۰/۵ نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفنول + ۱ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۳ (۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفنول + ۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۴ (۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفنول + ۱ میکرومولار لوتئولین)

سلامتی ساختاری و عملکردی غشای پلاسمایی اسپرم از اهمیت اساسی در ارزیابی ظرفیت باروری اسپرم‌ها برخوردار است. تست‌های ارزیابی یکپارچگی ساختاری و عملکردی اسپرم عبارتند از تست زنده‌مانی با رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین و سلامت غشای پلاسمایی با تست‌هاست (۳). مشخص شده است که اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی با کاهش باروری اسپرم پستانداران ارتباط داشته و قادر به بارور کردن تخمک نیست (۴۴). در مطالعه‌ای گزارش کردند که در هنگام قرار دادن بیضه موش در میدان مغناطیسی ۹۰۰ مگاهرتز، گروهی که با لوتئولین تیمار شده بودند موجب افزایش تعداد اسپرماتوزیدهای اولیه شد و همچنین تعداد اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی در گروه تیمار شده با آنتی‌اکسیدان لوتئولین بیشتر از بقیه گروه‌های تیماری بود که علت آن را نقش محافظتی لوتئولین بیان کردند (۴۸)، همچنین محققین گزارش کردند که اضافه کردن کریسین بعنوان فلاونویید به جیره باعث افزایش زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم و افزایش باروری خروس‌ها شد (۶). تحقیقات زیادی برای افزودن آنتی‌اکسیدان به مایع منی برای کاهش پراکسیداسیون لیپیدی انجام‌گرفته است. مقدار مالون دی‌آلدهید ارتباط مثبت و معنی‌داری با سطوح ROS موجود در پلاسمای منی دارد. در آزمایشی ارتباط بین ROS را با جنبایی، یکپارچگی DNA اسپرم و نفوذ اسپرم به داخل اووسیت را موردبررسی قرار دادند، نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش ROS، میزان جنبایی، یکپارچگی DNA اسپرم و نفوذ اسپرم به داخل اووسیت کاهش می‌یابد (۸). نتایج تحقیق حاضر همسو با نتایج محققین پیشین است که گزارش کردند افزودن یک میکرومولار DNP اسپرم ماهی زرد سبب کاهش معنی‌دار ROS و MDA طی فرآیند انجماد-یخ‌گشایی شد. بره موم بخاطر وجود ترکیبات فلاونوییدی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که اثرات منفی تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهد (۱۹). گزارش کردند که افزودن عصاره مرزنجوش به اسپرم قبل از انجماد نه‌تنها باعث بهبود فراسنجه‌های حرکتی بلکه باعث بهبود سلامت غشاء می‌شود که دلیل آن را وجود ترکیبات مختلف فنولیک از جمله لوتئولین دانستند. ترکیب آنتی‌اکسیدان هدفمند 2،4-دی نیتروفنول و غیرهدفمند لوتئولین می‌تواند تولید ROS را بطور غیرمستقیم بوسیله کاهش پراکسیداسیون لیپید، کاهش دهد. با این‌حال مطالعه حاضر نشان می‌دهد که کاهش پراکسیداسیون لیپید سبب افزایش زنده‌مانی اسپرم‌های منجمد و یخ گشایی شد. برخی از محققین گزارش کردند که برخی ترکیبات پلی‌فنولیک باعث مهار پراکسیداسیون لیپید، حفظ درصد تحرک و یکپارچگی غشاء اسپرم می‌شود (۴۱).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان دادند که استفاده ترکیبی از ۰/۷۵ نانومولار DNP با ۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین از طریق کاهش ROS سبب بهبود معنی‌دار پارامترهای عملکردی اسپرم‌های خروس پس از انجماد-یخ گشایی می‌شود.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.4.1]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.109]

منابع

1. Adedara, I.A., T.I. Subair, V.C. Ego, O. Oyediran and E.O. Farombi. 2017. Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brain-pituitary-testicular axis in rats. Chemico-Biological Interactions, 263: 88-98.
2. Agarwal, A., K. Makker and R. Sharma. 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. American journal of Reproductive Immunology, 59: 2-11.
3. Ahmed, H., S. Jahan, M.M. Salman and F. Ullah. 2019. Stimulating effects of Quercetin (QUE) in tris citric acid extender on post thaw quality and in vivo fertility of buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa. Theriogenology, 134: 18-23.
4. Aitken, J. and H. Fisher.1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. Bioessays, 16: 259-267.
5. Akhlaghi, A., Y.J. Ahangari, M. Zhandi and E. Peebles. 2014. Reproductive performance, semen quality, and fatty acid profile of spermatozoa in senescent broiler breeder roosters as enhanced by the long-term feeding of dried apple pomace. Animal Reproduction Science, 147: 64-73.
6. Altawash, A.S.A., A.Z. Shahneh, H. Moravej and M. Ansari. 2017. Chrysin-induced sperm parameters and fatty acid profile changes improve reproductive performance of roosters. Theriogenology, 104: 72-79.
7. Bajpai, P. 1963. The effect of photoperiodicity on semen characteristics of poultry. Poultry Science, 42: 462-465.
8. Balercia, G., L. Gandini, A. Lenzi and F. Lombardo. 2017. Antioxidants in Andrology. Springer.
9. Blesbois, E. 2011. Freezing avian semen. Avian Biology Research, 4: 52-58.
10. Caldeira da Silva, C.C., F.M. Cerqueira, L.F. Barbosa, M.H.Medeiros and A. J. Kowaltowski. 2008. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. Aging Cell, 7: 552-560.
11. Cheng, H.Y., M.T. Hsieh, F.S. Tsai, C.R. Wu, C.S. Chiu, M.M. Lee, H.X. Xu, Z.Z. Zhao and W.H. Peng. 2010. Neuroprotective effect of luteolin on amyloid β protein (25–35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons. Phytotherapy research, 24: S102-S108.
12. DaghighKia, H., F.S.S. Abad, H. Mohamadzadeh, H.V. Dodran and I. Ashrafi. 2017. The effect of Origanum Vulgare extract as natural antioxidant on quality cryopreserved ram sperm. Journal of Animal Science Research, 26: 111-120 (In Persian).
13. Diao, R., Gan, H., Tian, F., Cai, X., Zhen, W., Song, X., and Duan, Y. G. 2019. In vitro antioxidation effect of Quercetin on sperm function from the infertile patients with leukocytospermia. American journal of Reproductive Immunology, 82: e13155.
14. Dong, Q., T.L.Tollner, S.E. Rodenburg, D.L. Hill and C.A. VandeVoort. 2010. Antioxidants, Oxyrase, and mitochondrial uncoupler 2, 4-dinitrophenol improved postthaw survival of rhesus monkey sperm from ejaculates with low cryosurvival. Fertility and sterility, 94: 2359-2361.
15. Echtay, K.S. and M.D. Brand. 2007. 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production. Redox Report, 12: 26-29.
16. Fang, L., C. Bai, Y. Chen, J. Dai, Y. Xiang, X. Ji, C. Huang and Q. Dong. 2014. Inhibition of ROS production through mitochondria-targeted antioxidant and mitochondrial uncoupling increases post-thaw sperm viability in yellow catfish. Cryobiology, 69: 386-393.
17. Gibb, Z., T. Butler, L. Morris, W. Maxwell and C. Grupen. 2013. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. Theriogenology, 79: 1001-1009.
18. Harper, J., K. Dickinson and M. Brand. 2001. Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. Obesity Reviews, 2: 255-265.
19. Ibrahim, N.A. 2013. The possible protective effect of bee propolis on experimentally mediated cisplatin reproductive toxicity: a histological and immunohistochemical study. Egyptian Journal of Histology, 36: 78-86.
20. Iqbal, S., S.M.H. Andrabi, A. Riaz, A.Z. Durrani and N. Ahmad. 2016. Trehalose improves semen antioxidant enzymes activity, post-thaw quality and fertility in Nili Ravi buffaloes (Bubalus bubalis). Theriogenology, 85: 954-959.
21. Jamshidi, M., A. Ahmadi, S. Rezazadeh and F. Fathi Azad. 2010. Study and comparison of phenolic compounds and antioxidant activity of some native plant species of Mazandaran. Quarterly J. Med. Plants, 9: 178-183.
22. Kudin, A.P., N.Y.B. Bimpong-Buta, S. Vielhaber, C.E. Elger and W.S. Kunz. 2004. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. Journal of Biological Chemistry, 279: 4127-4135.
23. Kumar, S., U. Sharma, A. Sharma and A. Pandey. 2012. Protective efficacy of Solanum xanthocarpum root extracts against free radical damage: phytochemical analysis and antioxidant effect. Cellular and Molecular Biology, 58: 171-178.
24. Lavara, R., J. Vicente and M. Baselga. 2013. Genetic variation in head morphometry of rabbit sperm. Theriogenology, 80: 313-318.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.4.1]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.109]

25. Leeson, S., and J.D. Summers. 2010. Broiler breeder production. Nottingham University Press.
26. Leopoldini, M., I.P. Pitarch, N. Russo, and Toscano, M. 2004. Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. The Journal of Physical Chemistry A, 108: 92-96.
27. Liu, R., F. Meng, L. Zhang, A. Liu, H. Qin, X. Lan, L. Li and G. Du. 2011. Luteolin isolated from the medicinal plant Elsholtzia rugulosa (Labiatae) prevents copper-mediated toxicity in β-amyloid precursor protein Swedish mutation overexpressing SH-SY5Y cells. Molecules, 16: 2084-2096.
28. Macháty, Z., J.G. Thompson, L.R. Abeydeera, B.N. Day and R.S. Prather. 2001. Inhibitors of mitochondrial ATP production at the time of compaction improve development of in vitro produced porcine embryos. Molecular reproduction and development, 58: 39-44.
29. Maestri, D., V. Nepote, A. Lamarque and J. Zygadlo. 2006. Natural products as antioxidants. Phytochemistry: Advances in research, 37: 105-135.
30. Mao, T., C. Han, B.Wei, L. Zhao, Q. Zhang, R. Deng, J. Liu, Y. Luo and Y. Zhang. 2018. Protective effects of quercetin against cadmium chloride-induced oxidative injury in goat sperm and zygotes. Biological Trace Element Research, 185: 344-355.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Najafi, A., H. Daghigh Kia, M. Mehdipour, M. Shamsollahi and D.J. Miller. 2019. Does fennel extract ameliorate oxidative stress frozen-thawed ram sperm? Cryobiology, 87: 47-51.
35. Najafi, A., H.D. Kia, H. Hamishehkar, G. Moghaddam and S. Alijani. 2019. Effect of resveratrol-loaded nanostructured lipid carriers supplementation in cryopreservation medium on post-thawed sperm quality and fertility of roosters. Anim Reprod Science, 201: 32-40.
36. 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. Anim Reprod Science.
37. 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. Poult Science.
38. Najafi, D., R.A.Taheri, A. Najafi, A.A. Rouhollahi and M. Alvarez-Rodriguez. 2018. Effect of Achillea millefolium-loaded nanophytosome in the post-thawing sperm quality and oxidative status of rooster semen. Cryobiology, 82: 37-42.
39. O'Flaherty, C., E. de Lamirande and C. Gagnon. 2006. Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. Free Radical Biology and Medicine, 40: 1045-1055.
40. Safa, S., G. Moghaddam, R.J. Jozani, H. Daghigh Kia and H. Janmohammadi. 2016. Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. Anim Reprod Science.
41. Sapanidou, V.G., I. Margaritis, N. Siahos, K. Arsenopoulos, E. Dragatidou, I.A.Taitzoglou. I.A. Zervos, A. Theodoridis and M.P.Tsantarliotou. 2014. Antioxidant effect of a polyphenol-rich grape pomace extract on motility, viability and lipid peroxidation of thawed bovine spermatozoa. Journal of biological research-Thessaloniki, 21: 19.
42. Silva, E.F., A.S.V. Junior, T.F. Cardoso, F.M. Stefanello, A.C. Kalb, P.E. Martínez and C.D. Corcini. 2016. Reproductive toxicology of 2, 4 dinitrophenol in boar sperm. Toxicology in Vitro, 35: 31-35.
43. Skulachev, V.P. 2009. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1787: 437-461.
44. Söderquist, L., H. Rodriguez-Martinez and L. Janson. 1991. Post-thaw motility, ATP content and cytochrome C oxidase activity of AI bull spermatozoa in relation to fertility. Journal of Veterinary Medicine Series A, 38: 165-174.
45. Thomson, L.K., S.D. Fleming, R.J. Aitken, G.N. De Iuliis, J.A. Zieschang and A.M. Clark. 2009. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Hum Reprod, 24: 2061-2070.
46. Tvrda, E., E. Tušimová, A. Kováčik, D. Paál, H. Greifova, A. Abdramanov and N. Lukáč. 2016. Curcumin has protective and antioxidant properties on bull spermatozoa subjected to induced oxidative stress. Animal Reproduction Science, 172: 10-20.
47. Wang, G., N. Kang, H. Gong, Y. Luo, C. Bai, Y. Chen, X. Ji, C. Huang and Q. Dong. 2015. Upregulation of uncoupling protein Ucp2 through acute cold exposure increases post-thaw sperm quality in zebrafish. Cryobiology, 71: 464-471.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.4.1]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.109]

48. Yahyazadeh, A. and B. Altunkaynak. 2019. Protective effects of luteolin on rat testis following exposure to 900 MHz electromagnetic field. Biotechnic & Histochemistry, 94: 298-307.
49. Yang, J., J.S. Kim, H.J. Jeong, H.H. Kang, J.C. Cho, H.M. Yeom and M.J. Kim. 2011. Determination of antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities and luteolin contents of Chrysanthemum morifolium Ramat extracts. African Journal of Biotechnology, 10: 19197-19202.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.4.1]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.109]

Effect of Different Levels of 2, 4 Dinitrophenol and Luteolin on Semen Quality of Rooster during Freezing-Thawing Process

Mahdi Nazari[1], Hossein Daghigh Kia[2], Abouzar Najafi[3], Mahdieh Mahdipour[4] and Jamileh Emami[5]

1- PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz. Tabriz, Iran
2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz. Tabriz, Iran, (Corresponding Author: daghighkia@tabrizu.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran
4- Researcher, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz. Tabriz, Iran
5- M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz. Tabriz, Iran
Received: 16 May, 2020 Accepted: 12 Jun, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: During sperm freezing, the production of reactive oxygen species and the reduction of antioxidant activity cause damage to sperm. Most of the stress is due to the high production of reactive oxygen species and the impermeability of antioxidants to mitochondria. In this study, the effects of four levels of a combination of 2, 4- dinitrophenol which is a targeted mitochondrial antioxidant and Luteolin antioxidants, which are among the strongest flavonoid compounds with antioxidant and antimicrobial properties, were evaluated in lecithin-based Lake Extender.

Material and Methods: For this purpose, semen samples from 15 roosters were collected by dorso-abdominal massage method. Semen samples are mixed together after initial evaluation after diluting and adding different levels, treatment 1 (0.5 nanomolar 2, 4- dinitrophenol + 0.75 micromolar Luteolin), treatment 2 (0.5 nanomolar 2, 4- dinitrophenol + 1 micromolar Luteolin), treatment 3 (0.75 nanomolar 2, 4- dinitrophenol + 0.75 micromolar Luteolin) and treatment 4 (0.75 nanomolar 2, 4- dinitrophenol + 1 micromolar Luteolin), of antioxidants, samples were frozen by nitrogen vapor. After thawing, the samples were evaluated for sperm performance parameters.

Results: The results of the present study showed that the addition of treatments 2 and 3 to the leak diluent during freezing and thawing of rooster sperm significantly increased the parameters of total motility and progressive movement and also treatment 3 significantly increased sperm velocity in a straight line and the criterion of direct sperm motility. Also, treatments 2 and 3 significantly increased survival compared to the control group and reduced the amount of semen malondialdehyde and sperm with abnormal morphology during freezing and thawing ($p<0.05$). Also, treatment 3 was able to increase membrane integrity. Plasma increase compared to the control group ($p<0.05$).

Conclusion: The results of the present study show that the combined use of these two antioxidants has increased the properties of both antioxidants and improved the quality and quantity of sperm.

Keywords: Flavonoid, Mitochondria, Oxidative stress, Sperm, Uncoupling

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.34.4.1]
[DOI: 10.52547/rap.12.34.109]