دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

اثر استفاده از سطوح مختلف لوتئولین بر کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید و افزایش تحرک و زنده‌مانی اسپرم خروس راس ۳۰۸ طی فرایند انجماد و یخ گشایی

مهدی نظری[۱]، حسین دقیق‌کیا[۲] و ابوذر نجفی[۳]

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- استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۳
صفحه: ۱۰۰ تا ۱۰۸

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: استرس اکسیداتیو یک عامل مهم در عملکرد ضعیف اسپرم است که باعث تغییرات مورفولوژیکی، و آسیب اکسیداتیو می‌شود. پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند آنتی‌اکسیدان‌ها می توانند تا حدودی از آسیب‌های اکسیداتیو طی انجماد بکاهند. در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها باعث کاهش، حذف و غیر فعال‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌شوند. بسیاری از ترکیبات نظیر برخی از عصاره‌های گیاهی، برخی مواد شیمیایی صنعتی و برخی از اسیدهای آمینه می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان فعالیت کرده و رادیکال‌های آزاد را در محیط خنثی کنند. لوتئولین عضو مهمی از خانواده فلاونوئیدها است و به‌صورت گلیکوزیله در گیاهان وجود دارد و بر اساس مطالعات مشخص شده که لوتئولین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است. هدف از مطالعه حاضر کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید و به حداقل رساندن تنش اکسیداتیو با افزودن سطوح مختلف لوتئولین در محیط انجمادی است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های منی از ۱۵ قطعه خروس در سن ۲۸ هفتگی جمع‌آوری شدند. اسپرم‌گیری از خروس‌ها به روش مالش پشتی- شکمی انجام گرفت. برای از بین بردن اثرات فردی پس از ارزیابی‌های اولیه، نمونه‌ها با هم مخلوط شدند و جهت اعمال برنامه‌های انجمادی مورداستفاده قرار گرفتند. پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها و افزودن سطوح صفر (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ میکرومولار لوتئولین، به رقیق‌کننده‌ی پایه (لیک) اسپرم‌ها به نسبت ۱:۲۰ افزوده شدند. نمونه‌های مورد آزمایش در دمای ۴°C سردسازی شده و سپس در داخل ازت مایع منجمد گردیدند. یخ گشایی نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت و سپس فراسنجه‌های تحرک بوسیله سیستم کامپیوتری کاسا، زنده‌مانی با تست ایوزین نیگروزین، یکپارچگی غشای پلاسمایی با تست هاست، ریخت‌شناسی بوسیله تست هانکوک و میزان مالون‌دی‌آلدهید تولید شده اندازه گیری شد و سپس داده‌های حاصل در قالب طرح کاملا تصادفی آنالیز شدند.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان داد که افزودن سطوح ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ میکرومول سبب افزایش معنی‌داری در تحرک کل و سطوح ۰/۷۵ و ۱ باعث افزایش تحرک پیش‌رونده و VAP شد. علاوه بر این سطح ۱ میکرومول لوتئولین سبب افزایش معنی‌داری در فراسنجهVSL شد ($p<0/05$). نتایج نشان داد که سطوح ۰/۷۵ و ۱ میکرومول باعث افزایش معنی‌داری در زنده‌مانی و سلامت غشا شد و همچنین سطح ۰/۷۵ میکرومول لوتئولین باعث شد میزان مالون‌دی‌آلدهید و درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی غیرطبیعی کاهش پیدا کند ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن لوتئولین در رقیق‌کننده طی انجماد و یخ گشایی می‌تواند تأثیر مثبتی در بهبود کیفیت اسپرم خروس داشته باشد و متعاقبا سبب افزایش تحرک کل و پیش‌رونده بعد از انجماد و یخ‌گشایی شود و همینطور سطح ۰/۷۵ میکرومولار توانست بهترین عملکرد را در بین سطوح مختلف افزوده شده در رقیق کننده داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم خروس، تنش اکسیداتیو، فلاونویید

مقدمه

استرس اکسیداتیو یک عامل مهم در علت عملکرد ضعیف اسپرم است، باعث تغییرات مورفولوژیکی، و آسیب اکسیداتیو به DNA، غشاها و پروتئین‌ها می‌شود (۲۷) علاوه بر این، وجود بیش از حد ROS و تولید رادیکال‌های آزاد اغلب در پلاسمای منی و اسپرم مردان نابارور مشاهده‌شده است. اسپرم حاوی آنتی‌اکسیدان‌های محافظتی مانند سیستم گلوتاتیون پراکسیداز یا ردوکتاز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آنتی‌اکسیدان‌های با وزن مولکولی کم، ویتامین E، ویتامین C، اورات و آلبومین است که باعث کاهش ROS و جلوگیری از آسیب احتمالی سلول می‌شود. گزارش‌شده است که از یک‌سو تولید رادیکال‌های آزاد به‌وسیله اسپرم، یک فرایند طبیعی فیزیولوژیک است و نقش بسیار مهمی را در فرایند فیزیولوژیکی اسپرم همانند ظرفیت دار شدن و واکنش آکروزومی ایفا می‌کند. اما در طرف دیگر، مقادیر بالای ROS عامل اصلی اختلال عملکرد اسپرم است (۶). پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که محافظت از غشای اسپرم در مقابل واکنش اکسیداتیو، توسط آنتی‌اکسیدان‌ها صورت می‌گیرد. در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها باعث کاهش، حذف و غیر فعال‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌شوند، شرایط سلولی را به‌گونه‌ای عوض می‌کنند که حرکت و کیفیت اسپرم حفظ شود (۳۱). بسیاری از ترکیبات نظیر برخی از عصاره‌های گیاهی، برخی مواد شیمیایی صنعتی و برخی از اسیدهای آمینه می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان فعالیت کرده و رادیکال‌های آزاد را در محیط خنثی کنند (۳۷). ترکیبات فنلی و فلاونوییدها به دلیل خواص اکسید و احیاکنندگی و دهندگی گروه هیدروکسیل به، نقش مهمی در جذب و خنثی کردن ROSها به‌ویژه رادیکال‌های آزاد و تجزیه پراکسیدها دارند . بیشتر اثرات حفاظتی پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها در سیستم‌های بیولوژیکی به توانایی آنتی اکسیدانی آن‌ها، ظرفیت انتقال الکترون‌ها، کاهش پراکسیداسیون هیدروژن، فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از اکسیدازها نسبت داده می‌شود (۱۵). لوتئولین (۳ ،' ۴ ، ۵،۷–تتراهیدروکسی فلاون) عضو مهمی از خانواده فلاونوئیدها است و به‌صورت گلیکوزیله در کرفس، فلفل سبز، برگ پره و چای بابونه و غیره وجود دارد (۲۵). لوتئولین دارای گروه‌های هیدروکسیل در

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.10.6]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.100]

موقعیت‌های ۳ '، ۴'، ۵ و ۷ و یک پیوند مضاعف در موقعیت ۲ می‌باشد که مهم‌ترین قسمت‌های ساختار آن محسوب می‌شوند و وظیفه انجام فعالیت‌های مختلف بیوشیمیایی و بیولوژیکی را بر عهده دارند. گزارش شده است که دارای خواص ضد التهابی یا ضد آلرژی (۴۰) و آنتی‌اکسیدان است (۳۸). فعالیت آنتی‌اکسیدانی لوتئولین شامل فعالیت ضد التهابی و ضد سرطانی لوتئولین از طریق کنترل رادیکال‌های آزاد اعمال می‌شود (۲۳)، لوتئولین یکی از قوی‌ترین آنتی‌اکسیدانی شناخته شده است، یک کاروتنوئید است که می‌تواند در کاهش رادیکال‌های آزاد مشتق از لیپیدها با اثرات مخرب بر پراکسیداسیون لیپید اسپرم ایفا کند. مطالعات فارماکولوژیکی نشان می‌دهد که لوتئولین در حفاظت از DNA در برابر H_2O_2 نقش داشته و اثرات آنتی‌اکسیدانی در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد دارد (۲۴). لوتئولین تأثیر مفیدی در حفظ اسپرم‌های سالم از لحاظ ریخت‌شناسی هنگام قرارگیری در میدان مغناطیسی دارد (۴۲). محققین پیشین از دیگر فلاونوییدها در انجماد اسپرم استفاده کردند و نتایج مطلوبی را به دست آوردند از جمله افزودن کوئرسیتین در محیط انجماد اسپرم انسان (۴) و نریان (۳۶)، گاو (۳۹) و کریسین به‌عنوان دیگر فلاونویید نتایج مطلوبی را طی افزودن به محیط رقیق‌کننده اسپرم خروس (۲) حاصل داشته همین‌طور از دیگر فلاونوییدها که در محیط انجماد اسپرم مورداستفاده قرارگرفته به سیلی مارین می‌توان اشاره کرد که در مطالعات گذشته نتایج مطلوبی را گزارش کردند (۱۹،۴۳).

هدف از مطالعه حاضر بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و خفاظتی لوتئولین و بهبود در کیفیت فراسنجه‌های اسپرم خروس طی انجماد و یخ گشایی است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی مورداستفاده در این پژوهش از جمله لوتئولین(CAS Number:491-70-3) از شرکت سیگما و مرک آلمان تهیه‌شده است

پرنده‌های، شرایط نگهداری و جیره روزانه

بدین منظور از ۱۵ قطعه خروس نژاد راس ۳۰۸ با سن ۲۸ هفته استفاده شد. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی به ابعاد 85 × 70 × 70 سانتی‌متر و تحت شرایط 15 ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی قرار داشته که با جیره یکسان (جدول شماره ۱). خروس‌ها دسترسی آزاد به آب داشت.

جدول ۱- مواد خوراکی و ترکیبات شیمیایی جیره پایه

Table 1. Feed ingredients and nutrient composition of basal diet

اقلام خوراکی	درصد در نمونه اصلی(دارای آب)	ترکیب جیره(محاسبه شده)	
دانه ذرت	۵۰/۸	پروتئین خام (%)	۱۳/۴
دانه سویا	۸/۹۵	انرژی متابولیسمی (کیلوکالری در کیلوگرم)	۲۷۹۶
گندم	۲۰	کلسیم (%)	۰/۷۵
سبوس گندم	۱۷	فسفر (%)	۰/۳
دی کلسیم فسفات	۰/۷۴		
پودر صدف	۱/۳۸		
کربنات کلسیم	۰/۳۸		
نمک	۰/۳۸		
لایزین	۰/۰۸		
مکمل ویتامینه و معدنی	۰/۵		

اخذ نمونه‌های منی

اسپرم‌گیری به روش مالش پشتی-شکمی انجام شد. خروس‌ها به مدت یک ماه عادت‌دهی شده و اسپرم‌گیری هر هفته دو بار انجام گرفت. نمونه‌های اسپرم بلافاصله توسط فلاسک حاوی آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند.

ارزیابی اولیه نمونه‌ها و رقیق‌سازی

پس از رسیدن نمونه‌ها به آزمایشگاه، ابتدا هر کدام از نمونه‌ها بصورت مجزا ازنظر حجم، غلظت و رنگ بررسی‌شده و تنها نمونه‌هایی با حجم ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌لیتر و تحرک بیش از ۸۰ درصد مورداستفاده قرار گرفتند. برای از بین بردن اثرا انفرادی، نمونه‌های تأیید شده با یکدیگر مخلوط شدند. به‌منظور رقیق‌سازی اسپرم‌ها از رقیق‌کننده لیک (فروکتوز ۰/۸ گرم، پتاسیم‌سیترات ۰/۵ گرم، سدیم گلوتامات ۱/۹۲ گرم، پلی‌وینیل پیرولیدون ۰/۳ گرم، منیزیم‌استات ۰/۰۷ گرم، گلایسین ۰/۳۷۴ گرم، لستین ۱٪، آب دو بار تقطیر ۱۰۰ میلی‌لیتر) استفاده گردید سپس رقیق‌کننده پایه را به دو قسمت مساوی تقسیم کرده و به یکی از آن‌ها یک‌چهارم درصدگلیسرول و به دیگری سه‌چهارم درصد گلیسرول افزوده شد. و بعد از این مرحله سطوح ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ میکرومول لوتئولین به رقیق‌کننده افزودن شد.

رقیق‌کننده پایه به دو قسمت مساوی تقسیم و به یکی از آن‌ها یک چهارم گلیسرول و به دیگری سه چهارم گلیسرول افزوده شد. سپس رقیق‌کننده حاوی یک چهارم گلیسرول در ۵ فالکون به مقدار یک میلی‌لیتر ریخته شد و چهار تیمار ذکرشده اضافه گردید و یک لوله بدن دریافت گروه تیماری به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. سپس اسپرم به فالکون‌ها در دمای ۳۷°C اضافه گردید و بلافاصله فالکون‌ها به همراه رقیق‌کننده حاوی سه چهارم گلیسرول به یخچال که دمای آن روی ۴°C تنظیم‌شده منتقل گردید و بعد از دو ساعت سردسازی و رسیدن دمای نمونه‌ها به ۴°C، یک میلی‌لیتر رقیق‌کننده حاوی گلیسرول 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. پس

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.10.6]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.100]

از رقیق‌سازی و به مدت یک ساعت دیگر برای تعدیل دمایی در یخچال نگهداری شدند (۳۵).

انجماد اسپرم

نمونه‌ها سردسازی شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد را به داخل پایوت‌ها ۰/۲۵ میلی‌لیتر کشیده و به مدت ۷ دقیقه در ارتفاع ۴ سانتی‌متری از ازت مایع قرار داده و سپس در ازت مایع غوطه‌ور شد برای نگهداری پس از انجماد نمونه‌ها، آن‌ها را به داخل تانک ازت مایع منتقل گردید، تمامی مراحل فوق پنج مرتبه تکرار شدند (۳۰).

تحرک اسپرم

جهت ارزیابی فراسنجه‌های تحرک کل، پیش‌رونده و دیگر فراسنجه‌های کنتیکی ابتدا نمونه‌ها را در داخل بن‌ماری حاوی آب دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه یخ‌گشایی کرده و سپس 5 میکرولیتر از نمونه منی را روی لام قرار داده و بعد از پوشاندن با لامل زیر میکروسکوپ قرار داده شد. از هر نمونه حداقل 10 فیلد به‌طور کاملاً تصادفی انتخاب شده فراسنجه‌های تحرک کل و تحرک پیش‌رونده و فراسنجه‌های سرعتی حداقل 200 اسپرم به‌وسیله سیستم CASA (Video Test Sperm 3.1 Russia) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۱).

ارزیابی زنده‌مانی

برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین- نیگروزین استفاده گردید. بدین منظور یک قطره از اسپرم رقیق‌شده از هر گروه بر روی یک لام قرارگرفته و با یک قطره کوچک از رنگ ائوزین نیگروزین مخلوط گردید، سپس گسترش تهیه‌شده و پس از خشک شدن، توسط میکروسکوپ فاز کنتراست (Labomed LX400; labomed Inc., Culver City, CA, USA) با بزرگنمایی۴۰× و شمارش ۲۰۰ اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده (رنگ نشده) و مرده (رنگ شده) تعیین شدند (۳۲).

سلامت غشاء پلاسمایی اسپرم (HOST)

برای ارزیابی سلامت غشا اسپرم از آزمون‌هاست استفاده شد. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر از مایع منی را با ۱۰۰ میکرولیتر محیط هایپواسموتیک هاست مخلوط کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای C°۳۷ انکوبه شد. سپس، درصد اسپرم‌های با دم و ناحیه‌ی میانی متورم و پیچ‌خورده با شمارش ۲۰۰ اسپرم و بزرگنمایی ۴۰× تحت میکروسکوپ فاز کنتراست تعیین گردید (۲۸).

ناهنجاری‌های مورفولوژیکی

برای ارزیابی ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد (۱۶). برای این منظور، ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه منی به ۱۵۰ میکرولیتر از محلول هانکوک افزوده شد، سپس یک قطره از این مخلوط را روی لام قرار داده و توسط یک لامل پوشانده و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۴۰× درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی و ناهنجار محاسبه شدند (۲۹).

اندازه گیری میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA)

به‌منظور تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای اسپرم از تست TBARs[1] استفاده شد. در این تست، میزان مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان شاخصی از میزان پراکسیداسیون لیپیدها از طریق واکنش با تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد. بدین منظور، ابتدا به‌منظور رسوب پروتئین‌ها، ۱ میلی‌لیتر از محلول هر گروه تیماری بعد از یخ گشایی در دمای ۳۷°C با ۲ میلی‌لیتر اسیدتری کلرواستیک در یک لوله استریل مخلوط کرده و سپس جهت جلوگیری از وقوع پر اکسیداسیون لیپیدی در طی زمان انجام آزمایش، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول هیدروکسی تولوئن بوتیله شده یا (BHT دو درصد در اتانول) به همراه ۱ میلی‌لیتر EDTA به محلول موردنظر افزوده شد. سپس نمونه‌ها بمدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰×g سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی را برداشته و با ۱ میلی‌لیتر 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 نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) اندازه‌گیری شدند (۱۴).

آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده برای فراسنجه‌های تحرک، زنده‌مانی، پاسخ به محلولHOST و هانکوک اسپرم‌های خروس راس پس از انجماد و یخ گشایی توسط رویه GLM با نرم‌افزار SAS (نسخه ۹.۳) در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آنالیز قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی استفاده شد.

نتایج و بحث

ارزیابی جنبایی و فراسنجه‌های حرکتی اسپرم پس از انجماد و ذوب

طبق جدول شماره ۲ نتایج پژوهش حاضر نشان داد افزودن تیمار ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ میکرومول توانست میزان تحرک کل را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش بدهد ($p<0/05$) همچنین تیمار ۳ توانست تحرک پیش‌رونده را نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری دهد ($p<0/05$). در رابطه با فراسنجه های دیگر کاسا سطوح ۰/۷۵ و ۱ میکرومول سبب افزایش VAP و تیمار ۱ میکرو مول سبب افزایش VSL به‌صورت معنی‌داری شد($p<0/05$) در ارتباط با دیگر فراسنجه‌ها افزودن سطوح لوتئولین نتوانست در فراسنجه‌های VCL، STR، LIN و BCF افزایش معنی‌داری داشته باشند.

1- Thiobarbituric acid

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.10.6]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.100]

جدول ۲- مقایسه میانگین ویژگی‌های حرکتی اسپرم یخ‌گشایی شده خروس در بین سطوح مختلف تیمار با لوتئولین (میانگین ± انحراف معیار)

Table 2. Mean comparison of motility parameters of rooster thawed semen among different levels of treatments by luteolin (Mean ± SD)

متغیر	کنترل	۰/۲۵ µmol	۰/۵ µmol	۰/۷۵ µmol	۱ µmol	۱/۲۵ µmol	SEM
TM (%)	۵۲/۸۰^{c} ±۰/۸۶	۵۳/۶۰^{bc}±۰/۶۸	۵۵/۴۰^{abc}±۰/۲۴	۵۷/۸۰^{a}±۱/۲۵	۵۷/۴۰^{a}±۰/۹۷	۵۷/۰۰^{ab}±۰/۷۱	۰/۸۴
PR (%)	۲۸/۲۰^{c} ±۰/۹۲	۲۹/۲۰^{bc}±۰/۶۷	۳۰/۸۰^{abc}±۱/۰۲	۳۳/۶۰^{a}±۱/۱۲	۳۳/۴۰^{ab}±۰/۹۳	۳۱/۸۸۰^{abc}±۰/۹۷	۰/۹۴
VAP(µm/s)	۲۴/۷۰^{c} ±۰/۴۲	۲۵/۳۵^{bc}±۰/۷۱	۲۵/۳۱^{bc}±۰/۷۰	۲۷/۶۵^{ab}±۰/۷۵	۲۸/۵۹^{a}±۰/۵۳	۲۵/۷۰^{bc}±۰/۳۲	۰/۵۹
VSL(µm/s)	۱۸/۲۶^{b} ±۰/۳۵	۱۸/۲۹^{b}±۰/۶۷	۱۸/۴۹۸^{b}±۰/۵۷	۱۹/۷۹^{ab}±۰/۴۲	۲۱/۳۸^{a}±۰/۴۵	۱۹/۱۳^{b}±۰/۱۸	۰/۴۷
ALH(µm)	۳/۱۸±۰/۱۳	۳/۲۲±۰/۱۵	۳/۴۷±۰/۱۹	۳/۶۲±۰/۰۵	۳/۶۶±۰/۱۳	۳/۶۰±۰/۲۲	۰/۱۵
VCL(µm/s)	۵۷/۷۴±۰/۹۰	۵۷/۵۸±۱/۰۰	۵۸/۵۵±۰/۶۹	۶۰/۶۹±۰/۹۳	۶۰/۵۳±۰/۹۴	۵۶/۵۰±۱/۲۴	۰/۹۶
STR (%)	۷۳/۴۲±۱/۷۱	۷۲/۴۱±۳/۴۷	۷۵/۱۲±۰/۷۶	۷۱/۷۳±۲/۹۵	۷۴/۹۴±۲/۶۵	۷۴/۴۶±۰/۹۹	۲/۴۹
LIN (%)	۳۱/۴۵±۱/۰۶	۳۱/۳۳±۱/۵۶	۳۲/۴۸±۱/۲۹	۳۲/۶۳±۱/۱۶	۳۵/۳۴±۰/۷۵	۳۳/۹۳±۰/۷۵	۱/۱۴
BCF(Hz)	۱۹/۲۰۵۶±۰/۷۷	۱۹/۵۷±۱/۰۱	۲۰/۷۶±۲/۳۵	۲۱/۱۷±۰/۳۲	۲۰/۸۴±۱/۰۱	۵۶/۵۳±۰/۸۲	۱/۱۶

میانگین‌ها با حروف ناهمسان (a,b,c) بین تیمارها در هر سطر بیانگر تفاوت معنی‌دار است (p< ۰/۰۵).

PM: جنبایی پیش‌رونده، TM: جنبایی کل، ALH: بیشترین دامنه حرکت جانبی، BCF: فرکانس حرکت جانبی، LIN: معیار خطی بودن اسپرم، STR: معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم، VAP: میانگین سرعت در مسیر مستقیم، VCL: سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده، VSA: سرعت اسپرم در خط مستقیم

اندازه‌گیری زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم خروس پس از انجماد و ذوب

نتایج حاصل از تست ائوزین نگروزین در جدول ۳ آورده شده است، نتایج ارزیابی حاکی از آن است که افزودن سطح تیمار ۰/۷۵ و ۱ میکرومول پس از انجماد و یخ گشایی توانست افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته باشد نتایج جدول ۳ بیانگر این است افزودن سطوح مختلف لوتئولین باعث افزایش معنی‌داری اسپرم‌هایی با غشای سالم در گروه‌های دریافت‌کننده سطوح ۰/۷۵ و ۱ میکرومول نسبت به گروه کنترل شد.

اندازه‌گیری ریخت‌شناسی اسپرم بعد از انجماد و یخ گشایی

نتایج حاصل از جدول ۳ نشان می‌دهد افزودن سطح تیماری ۰/۷۵ میکرومول به محیط رقیق‌کننده اسپرم خروس طی انجماد و یخ گشایی باعث کاهش معنی‌داری در درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی غیرطبیعی شد و افزودن دیگر سطوح سبب کاهش معنی‌داری در این فراسنجه سبب نشد.

جدول ۳- تاثیر سطوح مختلف لوتئولین بر زنده‌مانی، یکپارچگی غشا، ریخت‌شناسی و غلظت مالون‌دی‌آلدهید طی انجماد و یخ‌گشایی (میانگین±SD)

Table 3. Effect of different levels of Luteolin on viability, plasma membrane integrity, morphology and malondialdehyde concentration during cryopreservation and thawing (Mean ± SD)

متغیر	کنترل	۰/۲۵ µmol	۰/۵ µmol	۰/۷۵ µmol	۱ µmol	۱/۲۵ µmol	SEM
زنده‌مانی (%)	۵۳/۴۰^{c}±۱/۰۱	۵۵/۴۰^{bc}±۰/۷۲	۵۶/۷۳^{abc}±۱/۲۲	۶۰/۲۵^{a}±۱/۴۰	۵۸/۳۵^{ab}±۱/۳۱	۵۷/۳۳^{abc}±۰/۴۶	۱/۰۸
سلامت غشا(%)	۴۸/۲۰^{c}±۱/۳۹	۴۹/۰۱^{bc}±۱/۸۱	۵۰/۷۷^{abc}±۰/۵۳	۵۴/۰۹^{a}±۰/۵۱	۵۳/۵۲^{ab}±۰/۴۵	۵۱/۲۶^{abc}±۱/۰۷	۱/۰۹
اسپرم ناسالم(%)	۳۱/۱۸^{a}±۱/۲۱	۳۰/۰۳^{ab}±۰/۵۹	۲۹/۳۸^{ab}±۱/۳۰	۲۶/۵۵^{b}±۰/۵۴	۲۶/۵۵^{ab}±۰/۷۴	۳۱/۰۲^{ab}±۰/۷۸	۰/۹۱
MDA (nano mol/dl)	۳/۵۶^{a}±۰/۱۶	۳/۴۰^{ab}±۰/۱۲	۳/۳۷^{ab}±۰/۱۵	۲/۹۳^{b}±۰/۰۸	۳/۱۴^{ab}±۰/۰۸	۳/۳۹^{ab}±۰/۱۵	۰/۱۳

میانگین‌ها با حروف ناهمسان (a,b,c) بین تیمارها در هر سطر بیانگر تفاوت معنی‌دار است (p< ۰/۰۵).

اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدهید بعد از انجماد و یخ گشایی

بر اساس جدول شماره سه نتایج نشان می‌دهد افزودن سطح ۰/۷۵ میکرومول توانست میزان مالون‌دی‌آلدهید اندازه‌گیری شده را در نمونه تیماری کاهش بدهد و دیگر سطوح تأثیر معنی‌داری بر میزان مالون‌دی‌آلدهید نداشتند (p<۰/۰۵).

عملکرد و ساختار اسپرم به‌طور قابل‌توجهی با استرس اکسیداتیو و تولید ROS در طی فرآیند انجماد و یخ گشایی تحت تأثیر قرار می‌گیرد، همچنین، دیگر مطالعات نشان داده‌اند که رادیکال‌های آزاد به یکپارچگی غشا و آکروزوم آسیب میزند، DNA را قطعه‌قطعه می‌کند و در نهایت باعث کاهش و یا حتی متوقف کردن جنبایی اسپرم بعد از فرآیند انجماد و یخ گشایی می‌شود (۳). در شرایط فیزیولوژیک یک تعادل بین تولید ROS و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی منی وجود دارد و تولید بیش از حد ROS موجب تنش‌اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپید، اختلال در عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی منی و درنهایت عملکرد اسپرم‌ها می‌شود و افزودن آنتی‌اکسیدان در غلظت‌های مناسب و مؤثر به محیط انجماد مایع منفی همچنان یک روش مفید برای حفظ کیفیت اسپرم در پروسه انجماد است نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که اثرات مفیدی از اضافه کردن سطوح مختلف لوتئولین به‌عنوان یک فلانونوید که دارای خاصیت‌های آنتی‌اکسیدانی قوی است به محیط انجمادی اسپرم خروس حاصل شد و نتایج حاکی از افزایش میزان زنده‌مانی و تحرک

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.10.6]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.100]

کل و دیگر فراسنجه‌های مورد ارزیابی کاسا بود. اطلاعاتی زیادی در مورد اثر حفاظتی لوتئولین بر روی اسپرم‌های یخ‌زده که نتایج به دست آمده از این تحقیق با آن‌ها مقایسه می‌شود، وجود ندارد.

تاکنون از چندین فلاونویید در انجماد منی استفاده‌شده است، در مطالعات قبلی گزارش شده که افزودن ۱۰ میکرومول کوئرسیتین به محیط انجماد اسپرم انسان سبب افزایش تحرک و زنده‌مانی به‌طور معنی‌داری شد و همچنین میزان آسیب‌های DNA و ROS تولیدی کاهش چشمگیری پیدا کرد (۴) که همسو با نتایج پژوهش حاضر است که نشان داد افزودن لوتئولین به عنوان یک فلاونویید در محیط رقیق کننده اسپرم خروس طی انجماد توانست میزان تحرک . زنده مانی را افزایش دهد ، صیفی و جمادی گزارش کردند افزودن ۰/۱ میلی‌مول به محیط انجمادی نریان ترکمن باعث افزایش چشمگیری در زنده‌مانی، تحرک و دیگر فراسنجه‌های کاسا گردید (۳۶)، در ارتباط با دیگر فلاونوییدها گزارش شده که افزودن ۰/۳۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر توانست اثرات سودمندی در افزایش میزان تحرک طی ۱۰ روز نگهداری در محیط سردسازی و سطح ۰/۱۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر طی انجماد و یخ گشایی توانست میزان تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم گاو را افزایش دهد (۱۳) در مطالعه حاضر نیز لوتئولین تاثیر مثبتی در افزایش میزان اسپرم‌هایی با غشای سالم نسبت به گروه شاهد شد. سطوح زیاد ROS می‌تواند سبب آسیب DNA اسپرم شده و درنتیجه موجب کاهش زنده‌مانی اسپرم شود. همچنین تحرک اسپرم یکی از مهم‌ترین فراسنجه‌ها در رابطه با انتقال در طول مجاری تناسلی ماده بوده و مرتبط با بارور کردن اووسیت ثانویه است. عملکرد میتوکندری به‌عنوان یک عامل احیا کننده تحرک اسپرم شناخته‌شده است و میتوکندری انرژی مورد نیاز برای تولید و انتشار امواج تاژکی را فراهم می‌کند (۲۶).

دقیق‌کیا و همکاران (۲۰) گزارش کردند که افزودن عصاره مرزنجوش به اسپرم قوچ 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 که موافق با یافته های پژوهش حاضر است. آنتی‌اکسیدانت‌ها با مکانیسم‌های متفاوتی سبب جلوگیری از آسیب اسپرم می‌شوند. 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. مطالعات انجام‌شده روی سلول‌های مغزی در موش نشان دادند که استفاده‌ی خوراکی از لوتئولین این سلول‌ها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو با خاصیت جاروب‌کنندگی و شلاته کردن محافظت می‌کند (۳۳). لوتئولین مستقیماً خاصیت جاروب کنندگی رادیکال‌های اکسیژن از جمله آنیون سوپر اکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل را دارد (۲۲) لوتئولین همچنین می‌تواند به افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تأثیر بگذارد و سلول‌ها را در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند (۴۱) ROS در غشای اسپرم می‌تواند باعث اکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم، آسیب به یکپارچگی غشاها، اختلال در ساختار آکسونمال شود و در نهایت فعالیت اسپرم و باروری را کاهش می‌دهد (۲۱).

همچنین بر طبق یافته‌های محققین پیشین مشخص گردید که فلاونوئیدهای موجود در چای قادرند اکسیداسیون LDL را توسط یون‌های فلزی مهار کنند (۱۷). 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 مورد بررسی قرار دادند، نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش ROS و پراکسیداسیون لیپید میزان جنبایی، یکپارچگی DNA اسپرم و نفوذ اسپرم به داخل اووسیت کاهش می‌یابد (۵). ROS در غشای اسپرم می‌تواند به‌طور مستقیم به اسیدهای چرب اشباع نشده حمله کرده و باعث اکسیداسیون لیپیدها شود، به یکپارچگی غشا آسیب برساند، ساختار آکسونما را از بین ببرد و در نهایت فعالیت و باروری اسپرم را کاهش دهد.

افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و یا کاهش ظرفیت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها، هر دو از عوامل اصلی به وجود آمدن تنش اکسیداتیو و آسیب‌های ناشی از آن می‌باشند. ترکیب لیپیدی غشای اسپرم خروس نقش تعیین‌کننده‌ای در کیفیت و میزان باروری آن ایفا می‌کند (۱۰).

ما دریافتیم که آنتی‌اکسیدان لوتئولین، یک اثر محافظتی در برابر آسیب به مورفولوژی اسپرم دارد و تعداد اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی را کاهش می‌دهد و همچنین سبب کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید نمونه منی بعد از انجماد و یخ گشایی می‌شود که همسو با مطالعات محققین پیشین است که گزارش کردند آنتی‌اکسیدان لوتئولین اثر محافظتی در برابر آسیب به مرفولوژی اسپرم دارد و سبب افزایش اسپرم‌های با ریخت‌شناسی سالم طی قرار گرفتن بیضه موش در میدان مغناطیسی ۹۰۰ مگاهرتز شد که عامل آن را نقش محافظتی لوتئولین بیان کردند همچنین در گروه تیمار شده با لوتئولین تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه و سلول‌های لاییدیک افزایش پیدا کرد که علت آن را خاصیت آنتی‌اکسیدانی لوتئولین بیان گردند(۴۲).

محققین گزارش کردند افزودن ۰/۳ میلی‌مول به رقیق‌کننده اسپرم نریان ترکمن طی انجماد باعث کاهش میزان اسپرم‌هایی با ریخت‌شناسی غیرطبیعی و همین‌طور سطح ۰/۱ میلی‌مول سبب کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید شد (۳۶)، در ارتباط با دیگر فلاونوییدها محققین گزارش کردند که افزودن ۰/۳۶ و ۰/۵۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سیلیمارین توانست درصد اسپرم‌هایی با ریخت‌شناسی ناسالم را کاهش بدهد (۱۳) که موافق با نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر بود. تحقیقات نشان داده است که مالون دی آلدهید به‌عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی، می‌تواند باعث تخریب کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها شود (۴۴) تحت شرایط تسلط پراکسیدان‌ها بر

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.10.6]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.100]

آنتی‌اکسیدان‌ها، تعادل گلوتاتیون پراکسیداز بر گلوتاتیون، به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو مختل می‌شود (۱۸).
ساختار شیمیایی فلاونوییدها با هر دو خاصیت آنتی‌اکسیدانی و پروکسیدانتی آنها ارتباط دارد؛ بطوریکه شمار و موقعیت گروه‌های هیدوکسیل و گروه‌های کربونیل در ساختار آنها، بیانگر توان آنتی‌اکسیدانی این ترکیب‌ها است (۹) وجود ۲ گروه هیدروکسیل در موقعیت کربن شماره ۳ و ۴، در توانایی بیشتر فلاونوییدها، برای از بین بردن رادیکال‌های پراکسیل اهمیت دارند (۹). کاهش این رادیکال‌ها در نهایت سبب جلوگیری از تولید آلدهیدهای سیتوتوکسیک مانند مالون دی آلدهاید می‌شوند که مانع ایجاد آثار مخرب بر ساختار اسپرم می‌شوند (۱).

فلاونوییدها، که گروهی از ترکیبات فنلی‌هستند به خاطر خاصیت احیا کنندگی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار هستند. مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها در in vitro وابسته به آرایش گروه‌های عملکردی آن‌ها می‌باشد بطوریکه توانایی فلاونوئیدها در از بین بردن رادیکال‌های آزاد مربوط به فعالیت گروه‌های هیدروکسیل آن‌ها است (۷). گزارش‌شده است که لوتئولین علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود، با افزایش تنظیم ژن استروئیدزایی وابسته به cAMP در سلول‌های لیدیک، باعث افزایش تولید تستوسترون می‌شود (۸).

تحقیقات نشان داده است که فلاونوئیدها در محیط In vitro علاوه بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی رفتار پرواکسیدانی نیز از خود نشان می‌دهند. قدرت پرواکسیدانی فلاونوئیدها مستقیماً با تعداد گروه‌های هیدروکسیل و دوز مصرفی فلاونوئیدها در ارتباط است (۳۴). فلاوونوئیدها ترکیباتی هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته و از طریق سازوکارهای متفاوتی از لیپیدها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند. که همسو با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد. همچنین محققین گزارش کردند که اضافه کردن کریسین به‌عنوان فلاونویید به جیره باعث افزایش زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم و افزایش باروری خروس‌ها شد (۲). دقیق کیا و همکاران 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 (۱۲).
فلاونویید هایی مثل سیلیمارین به دلیل چربی دوست بودن با ترکیبات غشای پلاسمایی متصل می‌شود و بدین‌ترتیب سبب مستحکم شدن غشای لیپیدی از هم گسیختگی و شکستگی آن جلوگیری می‌کند.
این یافته می‌تواند این نکته را بیان کند که فلاونوییدها با کاهش آسیب اسپرم در خلال فرآیندهای سرد کردن، انجماد و یخ گشایی سبب حفظ کنش‌های میتوکندری شده و با افزایش تولید ATP و نگهداری از غشایی پلاسمایی، جنبایی اسپرم را افزایش داده است. هم‌چنین، این بهبود می‌تواند به خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی آن نسبت داده شود. به‌طورکلی، فلاونوییدهایی مانند لوتئولین سیلی مارین و کوئرستین با دادن یک اتم هیدروژن یا یک الکترون به رادیکال‌های آزاد اکسیژن و از بین بردن آن‌ها، سلول را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند (۷).

افزودن لوتئولین به محیط رقیق‌کننده اسپرم خروس طی فرایند انجماد تأثیرات سودمندی از جمله کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید داشت و توانست میزان تحرک، و زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم خروس را افزایش دهد و از آسیب به ساختار اسپرم طی انجماد و افزایش میزان ROS جلوگیری کند.

منابع

1. Aitken, R.J. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reproduction, Fertility and Development, 7: 659-668.
2. 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.
3. Aumüller, G. and J. Seitz. 1990. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. International review of cytology, 121: 127-231.
4. Azadi, L., M. Tavalaee, M.R. Deemeh, M. Arbabian and M.H. Nasr-Esfahani. 2017. Effects of tempol and quercetin on human sperm function after cryopreservation. CryoLetters, 38: 29-36.
5. Balercia, G., L. Gandini, A. Lenzi and F. Lombardo. 2017. Antioxidants in Andrology. Springer.
6. Bansal, A.K. and G. Bilaspuri. 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Veterinary medicine international, 2011.
7. Cao, G., E. Sofic and R.L. Prior. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. Free radical biology and medicine, 22: 749-760.
8. Cormier, M., F. Ghouili, P. Roumaud, W. Bauer, M. Touaibia and L.J. Martin. 2018. Influences of flavones on cell viability and cAMP-dependent steroidogenic gene regulation in MA-10 Leydig cells. Cell biology and toxicology, 34: 23-38.
9. Correa, J., G. Heersche and P. Zavos. 1997. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. Theriogenology, 47: 715-721.
10. Daghigh Kia, H. and M. Nazari. 2020. Effect of combination of MitoQ as a targeted antioxidant and Pentoxifylline as a non-targeted in Lake based extender on functional quality of rooster sperm during chilled storage on 4◦C. Journal of Animal Science Research, 30: 71-83.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.10.6]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.100]

11. Daghigh Kia, H., M. Nazari and J. Emami. 2021. Effect of cysteamine amino acid supplementation on reduced lipid peroxidation rate of rooster sperm during freezing-thawing. Journal of Animal Science Research, 31: 113-124.
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.
13. El-Sheshtawy, R. and W. El-Nattat. 2017. Impact of silymarin enriched semen extender on bull sperm preservability. Asian Pacific Journal of Reproduction, 6: 81.
14. Esterbauer, H. and K.H. Cheeseman. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in enzymology, 186: 407-421.
15. Ghorbani, E., D. Bakhshi, H. Hajnajari, M. Ghasemnezhad and P. Taghidoost. 2010. Phenolic compounds and antioxidant activity of some native and imported apple cultivars in Karaj region. Journal of Horticultural Science, 24.
16. Hancock, J. 1956. The morphology of boar spermatozoa. Journal of the Royal Microscopical Society, 76: 84-97.
17. Ishikawa, T., M. Suzukawa, T. Ito, H. Yoshida, M. Ayaori, M. Nishiwaki, A. Yonemura, Y. Hara and H. Nakamura. 1997. Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. The American journal of clinical nutrition, 66: 261-266.
18. Jones, D.P. 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. Methods in enzymology, 348: 93-112.
19. Kumar, A., J. Prasad, N. Srivastava and S. Ghosh. 2019. Strategies to minimize various stress-related freeze–thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa. Biopreservation and biobanking, 17: 603-612.
20. 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.
21. Lavranos, G., M. Balla, A. Tzortzopoulou, V. Syriou and R. Angelopoulou. 2012. Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways. Reproductive Toxicology, 34: 298-307.
22. Lei, X.M., G.W. Liu, G.Y. Wang, G.F. Shi, T.C. Guo and F.Y. Li. 2016. Antioxidant Activity of Flavonoids on Superoxide Anion Free Radical (O^ sub 2*-^). Asian Journal of Chemistry, 28: 2082.
23. Lin, Y., R. Shi, X. Wang and H.M. Shen. 2008. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. Current Cancer Drug Targets, 8: 634-646.
24. 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.
25. Manju, V., V. Balasubramaniyan and N. Nalini. 2005. Rat colonic lipid peroxidation and antioxidant status: the effects of dietary luteolin on 1, 2-dimethylhydrazine challenge. Cellular and Molecular Biology Letters, 10: 535.
26. Mehaisen, G.M., A. Partyka, Z. Ligocka and W. Niżański. 2020. Cryoprotective effect of melatonin supplementation on post-thawed rooster sperm quality. Animal Reproduction Science, 212: 106238.
27. Moretti, E., L. Mazzi, G. Terzuoli, C. Bonechi, F. Iacoponi, S. Martini, C. Rossi and G. Collodel. 2012. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. Reproductive Toxicology, 34: 651-657.
28. Nazari, M., H. Daghigh Kia, M. Ebrahimi, A. Najafi and M. Mehdipour. 2021. Effect of 2, 4 dinitrophenol as a targeted antioxidant on Ghezel ram sperm on functional quality performance after freeze-thawing process of semen on non-breeding season. Animal Sciences Journal, 34: 181-190.
29. Nazari, M., H. Daghigh Kia and A. Najafi. 2021. Effect of combination of 2, 4-dinitrophenol as a targeted antioxidant and luteolin as a non-targeted antioxidant on functional parameter of rooster sperm during chilling storage at 4°C. Animal Sciences Journal, 34: 3-14.
30. Nazari, M., H. Daghigh Kia, A. Najafi, M. Mahdipour and J. Emami. 2021. Effect of different levels of 2, 4 Dinitrophenol and Luteolin on semen quality of rooster during freezing-thawingprocess. Research on Animal Production, 12: 109-117 (In Persian).
31. Nazari, M. and H. Daghighkia. 2021. Investigating the process of surviving sperm in oviduct to get a method for sperm storage without cryopreservation. Journal of Cell & Tissue, 12: 260-272.
32. Nazari, M., H. Daghighkia and A. Najafi. 2021. Study of different levels of Vitamin A supplementation in extender on sperm quality in cooling storing and cryopreservation condition in Ghezel ram. Journal of Cell & Tissue, 12: 134-145.
33. Nazari, Q.A., T. Kume, Y. Takada-Takatori, Y. Izumi and A. Akaike. 2013. Protective effect of luteolin on an oxidative-stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice. Journal of pharmacological sciences, 122: 109-117.
34. Rice-Evans, C.A., N.J. Miller and G. Paganga. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free radical biology and medicine, 20: 933-956.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.10.6]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.100]

35. 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. Animal Reproduction Science.
36. Seifi-Jamadi, A., H. Kohram, A.Z. Shahneh, M. Ansari and B. Macías-García. 2016. Quercetin ameliorate motility in frozen-thawed Turkmen stallions sperm. Journal of Equine Veterinary Science, 45: 73-77.
37. Seifi-Jamadi, A., H. Kohram, A. Zareh-Shahne, P. Dehghanizadeh and E. Ahmad. 2016. Effect of various concentrations of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on freezing capacity of Turkman stallion sperm. Animal Reproduction Science, 170: 108-113.
38. Shimoi, K., S. Masuda, M. Furugori, S. Esaki and N. Kinae. 1994. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in γ-ray irradiated mice. Carcinogenesis, 15: 2669-2672.
39. 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.
40. Ueda, H., C. Yamazaki and M. Yamazaki. 2002. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of Perilla frutescens. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 25: 1197-1202.
41. Xin, S.B., H. Yan, J. Ma, Q. Sun and L. Shen. 2016. Protective effects of luteolin on lipopolysaccharide-induced acute renal injury in mice. Medical science monitor :international medical journal of experimental and Clinical Research, 22: 5173.
42. 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.
43. Ziaeirad, H., M. Roostaei and M. Mohammadi. 2016. Effect of silymarin on rooster semen during storage at 4 °C. Journal of Animal Science Research, 26: 1-13.
44. Zhang, J., X. Bao, M. Zhang, Z. Zhu, L. Zhou, Q. Chen, Q. Zhang and B. Ma. 2019. MitoQ ameliorates testis injury from oxidative attack by repairing mitochondria and promoting the Keap1-Nrf2 pathway. Toxicology and Applied Pharmacology, 370: 78-92.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.10.6]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.100]

The Effect of using Different Levels of Lut eolin on Reducing Malondialdehyde Content and Increasing the Motility and Viability of Ross 308 Rooster Sperm during Cryopreservation and Thawing Process

Mahdi Nazari[1], Hossein Daghigh kia[2] and Abouzar Najafi[3]

1- PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz,
(Corresponding Author: daghighkia@tabrizu.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran
Received: 6 June, 2021 Accepted: 25 August, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: Oxidative stress is an important factor in poor sperm function that causes morphological changes and oxidative damage. Various studies have shown that antioxidants can reduce oxidative damage during freezing. In fact, antioxidants reduce, eliminate, and inactivate free radicals. Many compounds, such as some plant extracts, some industrial chemicals, and some amino acids, can act as active antioxidants and neutralize free radicals. luteolin is an important member of flavonoids which is present in glycosylated form in plants and studies have shown that luteolin has antioxidant properties. The aim of this study was to reduce lipid peroxidation and minimize oxidative stress by adding different levels of luteolin in the freezing medium.

Material and Methods: Semen samples were collected from 15 roosters at 28 weeks of age. Sperm collection from roosters was performed by back-abdominal massage method. To eliminate individual effects after initial evaluations, the samples were mixed together and used for cryopreservation. After extending the samples and adding the levels of 0 (control), 0.25, 0.5, 0.75, 0.1 and 1.25 µM luteolin to the base extender (Lake Extender), sperm were added at 1:20 ratio. The test samples were cooled to 4 °C and then frozen in liquid nitrogen. The samples were thawed at 37 °C and then the motility parameters were measured by CASA computer system, survival by eosin nigrosine test, plasma membrane integrity by host test, morphology by Hancock test and the amount of produced malondialdehyde. Then the data were analyzed by completely randomized design.

Results: The results showed that the addition of 0.75, 1 and 1.25 µM levels significantly increased the total motility and the levels of 0.75 and 1 increased the progressive mobility and VAP. In addition, 1 µM of luteolin caused a significant increase in VSL parameter ($p<0.05$). The results showed that levels of 0.75 and 1 µM significantly increased membrane integrity, and also level of 0.75 µM of luteolin decreased malondialdehyde content and sperm percentage with abnormal morphology ($p<0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that the addition of luteolin in the extender during freezing and thawing can have a positive effect on improving the quality of rooster sperm and subsequently increase the total and progressive motility after freezing and thawing and also the level of 0.75 µM could be the best performance among different levels added to the extender.

Keywords: Flavonoids, Oxidative stress, Rooster sperm

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.10.6]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.100]