



بهبود کیفیت اسپرم خروس با افرودن غلظت‌های مختلف نارینزینین بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی

مهديه مهدى پور^۱ و حسین دقیق کیا^۲

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز، (ویسندۀ مسؤول: (Daghaghkia@tabrizu.ac.ir

تاریخ ارسال: ۹۷/۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۲۹

صفحه: ۶۸ تا ۶۱

چکیده

تلقیح مصنوعی یک تکنولوژی تولیدمثلى است که در آن از بهترین نرهای پرورشی استفاده مؤثر می‌شود. تلقیح مصنوعی موفق، متأثر از عوامل متعددی می‌باشد که یکی از اصلی ترین و کلیدی ترین آن‌ها دسترسی به اسپرم‌های بارور بعد از فرآیند انجماد- ذوب می‌باشد. هدف از این پژوهش بررسی اثر غلظت‌های مختلف نارینزینین پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی می‌باشد. اسپرم‌گیری بهصورت هفت‌های دو بار و به روش مالش شکمی انجام شد. پس از افرودن رقیق کننده به نمونه‌های می، 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 نارینزینین شامل 0° ، 50° ، 100° و 150° میکرومولار بودند. پس از یخ‌گشایی، پارامترهای جنبایی، زنده‌مانی، میزان ناهنجاری‌ها، یکپارچگی غشاء، میزان تولید MDA، فعالیت آندزرنوسی آنزیم‌های SOD و گلواتایون پراکسیداز و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی، ارزیابی شد. نتایج نشان داد که جنبایی کل و پیش‌رونده در تیمار 100° میکرومولار نارینزینین به‌طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار کترول افزایش نداشت. زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء سلول‌های اسپرم در غلظت 100° میکرومولار در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($p < 0.05$). تیمار 100° میکرومولار نارینزینین باعث افزایش گلواتایون پراکسیداز و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و کاهش میزان MDA در مقایسه با تیمار کترول شد ($p < 0.05$). بر اساس نتایج تحقیق حاضر، نارینزینین در غلظت 100° میکرومولار در محیط رقیق کننده، کیفیت اسپرم خروس را پس از یخ‌گشایی بهبود می‌بخشد.

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

مقدمه

دلایل قابل ذکر آن، قابلیت انجمادپذیری پایین اسپرم (۱۴) و باوری کم در گله نسبت به تنفس‌های 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 قرار گرفته و منجر به کاهش باوری اسپرم خواهد شد. غشای پلاسمایی اسپرم دارای اسیدهای چرب غیراشبع (PUFA) زیادی است و بنابراین برای جلوگیری از آسیب پراکسیداسیون، بهویژه هنگام محافظت انجمادی، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها لازم است (۱۷).

نارینزینین یک فلاونوئید طبیعی است که در مرکبات، گوجه‌فرنگی و کاکائو وجود دارد که دارای اثرات ضدالتهای، آنتی‌اکسیدانی، ضد سلطانی و حفاظت از سیستم عصبی می‌باشد (۱۵). نارینزینین 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 نارینزینین باعث تغییرات مطلوبی از جمله هیبریگ‌لایسمی در موش‌های دیابتی شد (۱۲). در تحقیق دیگر، نارینزینین بلوغ آرمایشگاهی اووسیت را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرارداد، بدین صورت 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

توسعه پرورش طیور در سال‌های اخیر و تبدیل آن به صنعتی عظیم و فعل از نظر تهیه گوشت سفید و تخم مرغ، در رفع نسبی بحران کمبود پروتئین حیوانی، بسیار مؤثر و مفید بوده و توانسته است از نظر تأمین مواد غذایی نقش ارزشمندی داشته باشد. برای پیشرفت هر چه بیشتر این صفت نیاز به راهکارهایی برای کم شدن هزینه‌ها، انتخاب بهترین نژادها و افزایش بهره‌وری می‌باشد. در این زمینه با توجه به سهم بسیار باز رخوس‌ها در تعیین هزینه‌ها و مشکلات مربوط به مدیریت همزمان مرغ و رخوس در گله‌های مادر، بحث جداسازی رخوس‌ها و استفاده از روش تلقیح مصنوعی مطرح است (۲۹). در روش تلقیح مصنوعی، می‌توان از یک ازال خروس برای بارور کردن 20° 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 پرنده‌گان در حدود 50° 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

از این پژوهش، بررسی اثر غلظت‌های مختلف ناریتینین پس از فرایند انجاماد و بخ‌گشایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش، از ۱۰ خروس بالغ سویه تجاری رأس (۳۰ هفتنه) که به طور تصادفی از گله مورد نظر انتخاب شده بودند، استفاده شد. تمامی خروس‌ها برای یک دوره سه هفته‌ای، به اسپرم‌گیری با روش مالش شکمی، عادت داده شدند. مایع منی بهوسیله ماساژ شکمی به صورت هفت‌های دو بار جمع‌آوری شد. برای پردازش مایع منی، غلظت بیشتر از ۱۰^۹ اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک بیش از ۸۰ درصد و مورفوولوژی کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیرطبیعی، در هر انزال به عنوان مایع منی نرمال در نظر گرفته شد، در غیر این صورت مایع منی‌های جمع‌آوری شده حذف شدند. رقیق‌سازی به نسبت ۱ حجم منی و ۲۰ حجم محیط انجامد در دمای ۳۷ درجه انجام شد. از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای بر اثر ناریتینین روی اسپرم خروس انجام نشده بود غلظت‌های مورد مطالعه در این پژوهش براساس دوز یابی تعیین گردید. ناریتینین در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولا ر 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 انجامد ۰/۲۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و هفت دقیقه در معرض بخار از قرار گرفتند، سپس به تانک حاوی ازت مایع ۱۹۶- سانتی‌گراد) منتقل و به مدت حداقل ۴۸ ساعت نگهداری شدند. برای بخ‌گشایی مایع منی، پایوت‌ها 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 بخ‌گشایی نمونه‌های منی، پارامترهای تحرک کلی (TM)، تحرک پیش‌رونده^۱ (PM)، سرعت در مسیر میانگین^۲ (VAP)، سرعت در مسیر منحنی^۳ (VCL)، سرعت در مسیر مستقیم^۴ (VSL)، جنبای عرضی سر^۵ (ALH)، خطی بودن جنبای^۶ (LIN) ارزیابی گردیدند. برای بررسی پارامترهای تحرک، ابتدا نمونه‌های منی بخ‌گشایی شدند و پس از رقیق‌سازی اولیه، پنج میکروولیتر از نمونه را روی لام از قبل گرم شده^۷ (۳۷°C) قرار داده و با قرار دادن روی صفحه گرم میکروسکوب، از هر نمونه حداقل ۵ زمینه به صورت 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 میکروولیتر از نمونه منی را روی لام قرار داده و ۲۰ میکروولیتر 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 میکروسکوب با بزرگنمایی × ۴۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند. اسپرم‌های که

رنگ را به خود جذب کرده بودند، اسپرم مرده و اسپرم‌هایی که رنگ نگرفته بودند به عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شدند.

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

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

اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدهید: 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 به مدت ۱۵ دقیقه در ۵ گ ۱۲۰۰ سانتی‌فیبوژ 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 ۹۵ نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۵۳ درجه گذاشته شدند و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگهدارشده شدند تا سرد شوند. سپس، یک میلی‌لیتر از نمونه حاصل، درون کوت ریخته شد. غلظت MDA موجود در نمونه‌ها توسط دستگاه اسیکتوفوتومتر 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 به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس پلاسما جدا شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه با ۱ میلی‌لیتر از کروموزن، در کوت نمونه مخلوط شدند و در کوت بلانک ۲۰ میکرولیتر از DDH₂O با ۱ میلی‌لیتر از کروموزن مخلوط شدند. همچنین در کوت استاندارد ۲۰ میکرولیتر از استاندارد با ۱ میلی‌لیتر از کروموزن 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

5- Straight line velocity

6- Lateral head amplitude

3- Average path velocity

4- Curvilinear velocity

7- linearity

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 GLM Proc 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:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Y_{ij} : مشاهدات

e_{ij} : میانگین

T_i : اثر آمنی تیمار

e_{ij} : اثرات باقیمانده

نتایج و بحث

اثر نارینژنین بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان نارینژنین بر فراسنجه‌های جنبایی بعد از فرآیند انجماد-بین‌گشایی در جدول ۱ نشان داده شده است. جنبایی کل در تیمار ۱۰۰ میکرومول به طور معنی‌داری از تیمار کنترل بالاتر بود ($p < 0.05$). همچنین جنبایی پیش‌رونده بعد از بین‌گشایی در تیمار ۱۰۰ میکرومول نسبت به تیمار کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافته بود. در فراسنجه‌های VAP، VSL، VCL، ALH، VCL و BCF تقاضت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد.

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

ارزیابی میزان فعالیت کلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px): میزان فعالیت کلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) با توجه به روش ارائه شده توسط مهدی پور و همکاران (۱۹) تعیین شد. بدین مظنه ۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه مایع منی به $1/8$ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش اضافه شده و به مدت پنج دقیقه قبل از شروع واکنش در 25°C انکوبه شد. علاوه بر این از $1/10$ میلی‌لیتر از محلول H_2O_2 استفاده شد. میزان جذب نوری در 412 نانومتر و به مدت پنج دقیقه با استفاده از اسپکتروفوتومتر (T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) ثبت شد.

ارزیابی میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز: میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز نمونه‌های منی با استفاده از کیت Randox Laboratories شرکت رندوکس (UK Ltd., UK) مورد سنجش قرار گرفت (۱۹). نمونه‌های منی بین‌گشایی شده به نسبت یک به پنج در PBS (۵۰ میلی‌مول و $7/\text{pH}=0.7$) رفیق شدند. روش سنجش شامل بافر سدیم کربنات (50 میلی‌مول، $\text{pH}=10.0$)، $1/\text{pH}=10.0$ میلی‌مول گزانتین، $1/\text{pH}=10.0$ میلی‌مول نیترو ترازوژلیوم آبی، $1/\text{pH}=10.0$ میلی‌مول EDTA، گزانتین اکسیداز و در نهایت نمونه‌ها در یک کوتوت کوچک مخلوط شدند. به طور کلی، 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

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان نارینژنین بر ویژگی‌های جنبایی اسپرم پس از فرآیند انجماد-بین‌گشایی

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

| آنتی‌اکسیدان | میکرومولار | TM (%) | PM (%) | VSL (μm/s) | VAP (μm/s) | VCL (μm/s) | LIN (%) | STR (%) | ALH (μm) | BCF (Hz) |
|--------------|------------|---------------------|---------------------|------------|------------|------------|---------|---------|----------|----------|
| کنترل | | ۶۱/۰.۶ ^b | ۲۲/۰.۳ ^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. ($p < 0.05$)
TM: درصد جنبایی کل، PM: درصد جنبایی پیش‌رونده، LIN: 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: تابع عرضی زنش (هرتز)

غلظت ۱۰۰ میکرومولار نارینژنین بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۲). درصد اسپرم‌های دارای ناهنجاری‌های مورفو‌لوزیکی در غلظت‌های مختلف نارینژنین تقاضت معنی‌داری باهم نداشت.

اثر نارینژنین بر یکپارچگی غشاء، زنده‌مانی و ناهنجاری‌های اسپرم زنده‌مانی سلول‌های اسپرم در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد اما غلظت بالاتر از ۱۰۰ اثر بر غشاء اسپرم‌ها نداشت (جدول ۲). یکپارچکی غشاء اسپرم‌ها در

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف نارینژنین بر زندمانی، مورفولوژی، یکپارچگی غشا و میزان مالون دی‌آلدید پس از فرآیند انجماد-بخ گشاپی

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

| آنتی‌اکسیدان | میکرو‌مولار | زنده‌مانی (%) | یکپارچگی غشا اسپرم (%) | اسپرم‌های غیر طبیعی (%) |
|--------------|-------------|---------------------|------------------------|-------------------------|
| کنترل | | ۶۴/۶۶ ^b | ۵۵/۹۳ ^b | ۱۴/۲۴ |
| 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. ($p < 0.05$)

نارینژنین باعث افزایش گلوتاتیون پراکسیداز در مقایسه با تیمار کنترل شده است. میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰۰ میکرومولار نارینژنین در مقایسه با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). نتایج نشان داد که میزان تولید MDA در تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نارینژنین در مقایسه با سایر غلظت‌ها پایین‌تر بود ($p < 0.05$).

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

جدول ۳- اثر نارینژنین بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و میزان تولید مانون دی‌آلدید بعد از فرآیند انجماد-بخ گشاپی

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

| آنتی‌اکسیدان | میکرو‌مولار | میزان تولید مانون دی‌آلدید (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 | ۳/۱۱ ^b | ۵۷/۱۸ ^{ab} | ۱۱۷/۸۷ | ۱/۶۴ ^{ab} |
| | ۱۰۰ | ۱/۹۰ ^c | ۶۲/۲۱ ^a | ۱۲۳/۹۲ | ۱/۸۸ ^a |
| | ۱۵۰ | ۴/۰۱ ^a | ۵۳/۶۱ ^b | ۱۰۸/۲۷ | ۱/۱۱ ^b |
| SEM | | ۰/۱۶ | ۱/۹ | ۵/۵۶ | ۰/۱۶ |

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. ($p < 0.05$)

(۵)، به طوری که پس از بخ گشاپی، میزان سیالیت غشاء و مقدار ترکیبات لیپیدی اسپرم کاهش می‌باید و این خود سبب کاهش قدرت جنبایی، باروری و زندمانی 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 می‌باید و این موضوع موجب کاهش جنبایی می‌شود (۱۶). این نتایج در راستای پژوهش‌های فوق نشان داد گرچه جنبایی اسپرم پس از فرآیند انجماد و بخ گشاپی کاهش می‌باید، اما می‌توان با افزودن نارینژنین از روند کاهش جنبایی که پس از فرآیند انجماد و بخ گشاپی رخ می‌دهد، به طور 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 تحريك شده و یک هجوم واپسیه به کلسیمی از گونه‌های اکسیژن فعل را نشان داده که در نهایت منجر به استرس اکسیدانتیو می‌شود. تولید مقدار متوسط از گونه‌های اکسیژن

این آزمایش اولین مطالعه درباره تأثیر غلظت‌های مختلف نارینژنین بر روی پارامترهای اسپرم بخ گشاپی شده خروس همراه با ارزیابی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. تنش اکسیدانتیو در غشاء اسپرم باعث خسارات و تغییرات جبران‌ناپذیر در سیالیت غشاء و فعالیت آنزیمی اسپرم، همراه با کاهش در جنبایی، زندمانی و توانایی لقاح‌پذیری اسپرم می‌شود (۱،۸). 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 اکسیدانتیو عملکردی می‌شود (۱،۲،۳،۸). مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با نارینژنین به طور 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)،

۱۰۰ میکرومولار ناریتین، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را کاهش داد که این کاهش، معنی‌دار نبود. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ظرفیت آنتی‌اسیدانی تام پلاسمای منی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته است. در این آزمایش غلظت MDA در غلظت ۱۰۰ میکرومولار ناریتین به طور معنی‌داری کمتر بود. نتایج این پژوهش با نتایج فتاح و همکاران ۲۰۱۷ که نشان دادند استفاده از آنتی‌اسیدان باعث کاهش معنی‌داری MDA می‌شود مطابقت دارد (۱۱). فلاؤنوئیدها از جمله ناریتین، رایج‌ترین گروه پلی‌فولیک هستند که تقریباً در همه گیاهان وجود دارند. ناریتین‌ها به عنوان آنتی‌اسیدان 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 آلفا-تیک شامل حلقة پیران می‌باشد. مشخص شده است که ترکیبات فولیک (بخصوص ناریتین) با پوشش دادن لبیدها، روند پراکسیداسیون لبیدی را تغییر داده و متوقف می‌کنند. همچنین با کاهش سیالیت غشاء‌های سلولی و جلوگیری از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و محدود کردن پراکسیداسیون فسفولبیدها و اسیدهای چرب غیراشیاع، از غشاء‌های سلولی محافظت کنند (۲۷). در تحقیق حاضر، ناریتین باعث بهبود ظرفیت آنتی‌اسیدانی تام و در نتیجه افزایش جنبایی و بهبود یکپارچگی غشاء اسپرم شد. نشان داده شده است که میزان قدرت آنتی‌اسیدانی فلاؤنوئیدها با تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل ارتباط دارد. ناریتین ترکیبی با سه گروه هیدروکسیل بوده و بنابراین توانایی و قدرت آنتی‌اسیدانی سیار بالای داشته و قادر است آنریتمهای آنتی‌اسیدانی سلول‌ها را تحریک کند. مصطفی و همکاران (۲۰۱۶) نشان داده شده است که ناریتین علاوه بر اثرات بالقوه آزاد می‌باشد. بنابراین ناریتین با توجه قدرت آنتی‌اسیدانی بالا در این آزمایش باعث کاهش میزان MDA شده است. افزایش غلظت آنتی‌اسیدانی پلاسمای منی (TAC) ممکن است نقش معنی‌داری در اسپرم داشته باشد. زیرا بازدارندهای مختلفی شامل GPX، SOD، CAT در اسپرم و پلاسمای منی وجود دارد که با حذف رادیکال‌های آزاد سبب حفظ اسپرم در برابر آسیب اسیدیاتیو می‌شود. در این مطالعه میزان میزان GPX در گروه تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولار ناریتین 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، همیستگی معنی‌داری با تحرک و غلظت اسپرم ندارد (۱۹). نتایج این پژوهش با نتایج نجفی و همکاران ۲۰۱۸ که نشان دادند استفاده از آنتی‌اسیدان باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اسیدانی تام و GPX می‌شود مطابقت دارد (۲۰).

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

فعال ممکن است با فرآیندهای طبیعی بلوغ درگیر شده با کاپاسیتاسیون و واکنش آکروزی، همراه شود ولی گونه‌های اکسیژن فعال اضافی و استرس اکسیداتیو باعث کاهش فعالیت آنزیم‌هایی که در سیستم دفاعی آنتی‌اسیدانی نقش دارند شده و موجب افزایش پراکسیداسیون لبید، کاهش یکپارچگی غشاء، افزایش نفوذپذیری سلول، غیرفعال شدن آنزیم‌های موجود در غشاء، آسیب به DNA، کاهش در جنبایی و ظرفیت باوری اسپرم ذخیره‌شده می‌شود و برای اسپرم زیان‌آور است (۷). نتایج این آزمایش با نتایج یک گروه اسپرم دیگری که بر روی اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌اسیدان روی انجماد اسپرم خروس بود، مطابقت دارد. آنها نشان دادند غلظت‌هایی که میزان تحرک کل و پیش‌رونده در زمان استفاده از آنتی‌اسیدان بهبود می‌یابد (۱۸). نتایج این آزمایش (جدول شماره ۲) نشان می‌دهند که درصد اسپرم‌های با غشاء سالم در طی فرآیند انجماد سینه‌گشایی در تیمارها ۱۰۰ میکرومولار ناریتین افزایش معنی‌داری داشته است. تحریب یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم ناشی از بهم‌ریختگی آرایش لبیدها در داخل غشاء در طول حفظ انجماد منکن است آسیب‌های سلولی بیشتری را القا کند و در نتیجه منجر به مرگ سلول اسپرم شود (۲۵). یکپارچگی غشاء پلاسمایی یکی از فراسنجه‌های تشخیص سلامت اسپرم بوده و در نرخ باوری مؤثر می‌باشد. ترکیب لبیدی غشاء اسپرم خروس نقش تعیین‌کننده‌ای در کیفیت و میزان باوری آن ایفا می‌کند. اسپرم خروس نسبت به پستانداران دارای اسیدهای چرب غیراشیاع بیشتری در غشاء خود بوده که این امر موجب افزایش حساسیت اسپرم خروس به پراکسیداسیون لبیدها شده است (۶). این امر نیز سبب افزایش آسیب‌هایی نظیر کاهش زنده‌مانی، تحرک و قابلیت باوری طی فرآیندهای نگهداری اسپرم می‌شود (۱۳). این در حالی است که افروden آنتی‌اسیدان‌های مناسب به محیط نگهداری اسپرم طیور می‌تواند تا حدی از شدت آسیب‌های وارد به اسپرم کاسته و کیفیت اسپرم را طی فرآیندهایی نظیر سردسازی و انجماد افزایش دهد (۲۲). نشان داده شده است که ناریتین علاوه بر اثرات بالقوه آنتی‌اسیدانی، 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 آنتی‌اسیدان باعث افزایش یکپارچگی غشاء می‌شود مطابقت دارد (۲۶). افزودن ناریتین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار، پارامتر زنده‌مانی را به طور مؤثری در مقایسه با گروه شاهد بالا برده و بنابراین ناریتین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار خاصیت آنتی‌اسیدانی خود را به طور ویژه‌ای بروز داده است. لذا می‌توان گفت که عملکرد مثبت این غلظت تیماری بر پارامترهای تحرک کل و تحرک پیش‌رونده احتیالاً با زنده‌مانی اسپرم‌ها در ارتباط می‌باشد. نتایج این پژوهش با نتایج مهدی‌پور و همکاران ۲۰۱۶ که نشان دادند استفاده از آنتی‌اسیدان 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

منابع

- 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.
- 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.
- Alvarez, J.G. and B.T. Storey. 1984. Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa . *Biology of Reproduction*, 30: 323-331.
- 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.
- Blesbois, E., I. Grasseau and F. Seigneurin. 2005. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction*, 129: 371-378.
- Breque, C., P. Surai and J.P. Brilland. 2003. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 66: 314-23.
- Bucak, M.N., S. Sarıözkan, P.B. Tuncer, P.A. Uluta and H. Akçada . 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.
- 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
- Donoghue, A. and G. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 213-232.
- Douard, V., D. Hermier, M. Magistrini, C. Labb  and E. Blesbois. 2004. Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. *Theriogenology*, 61: 1-13.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hammerstedt, R.H. and J.K. Graham. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29: 26-38.
- Leeson, S. and J.D. Summers. 2010. Broiler breeder production, Nottingham University Press, pp. 21-47.
- Long, J. 2006. Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? *Poultry Science*, 85: 232-236.
- 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.
- Mehdipour, M., H. Daghagh 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.
- 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.
- 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.
- Najafi, A., H. Daghagh-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.
- 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.
- Pérez-Past n, 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.

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. Blauboer, 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.

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

Mahdiyeh Mehdipour¹ and Hossein Daghikhia²

1- PhD Student Department of Animal Science University of Tabriz

2- Professor Department of Animal Science, University of Tabriz, (Corresponding author: Daghikhia@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 massage. 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