



## "مقاله پژوهشی"

# تأثیر مقادیر مختلف آنتی اکسیدان ۴،۲-دی نیترو فنول و لوتئولین بر کیفیت منی خروس طی انجماد-یخ گشایی

مهدی نظری<sup>۱</sup>، حسین دقیق کیا<sup>۲</sup>، ابودر نجفی<sup>۳</sup>، مهدیه مهدی پور<sup>۴</sup> و جمیله امامی<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز  
۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، (نویسنده مسؤول: daghighkia@tabrizu.ac.ir)  
۳- استادیار گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران  
۴- محقق گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز  
۵- دانشجوی کارشناسی ارشد 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 آنتی اکسیدانی، موجب آسیب به ساختارهای عملکردی اسپرم می‌شود. بیشترین تنش به دلیل تولید فراوان گونه‌های فعال اکسیژن و عدم نفوذپذیری آنتی اکسیدان‌ها به داخل میتوکندری، متوجه این اندامک می‌شود. در این مطالعه اثرات افزودن ۴ سطح ترکیبی از آنتی اکسیدان ۴،۲-دی نیترو فنول که یک آنتی اکسیدان هدفمند میتوکندریایی است و لوتئولین که از قوی‌ترین ترکیبات فلاونوئیدی با خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی را دارد، در رقیق کننده لیک بر پایه لستین 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-دی نیترو فنول + ۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۲ (۰/۵ نانومولار ۴،۲-دی نیترو فنول + ۱ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۳ (۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی نیترو فنول + ۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۴ (۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی نیترو فنول + ۱ میکرومولار لوتئولین) از آنتی اکسیدان‌ها، 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 ازلت 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 رقیق کننده لیک طی انجماد و یخ‌گشایی اسپرم خروس باعث افزایش معنی‌دار فراسنجه‌های تحرک کل و حرکت پیش‌رونده گردید و هم‌طور 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 مالون‌دی‌الدهید مایع منی و اسپرم‌های با ریخت‌شناسی غیر طبیعی طی انجماد و یخ‌گشایی شد ( $p < 0.05$ ) هم‌طور تیمار ۳ توانست میزان یکپارچگی غشا پلاسمایی نسبت به گروه کنترل افزایش بدهد ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده ترکیبی این دو آنتی اکسیدان سبب هم‌افزایی خاصیت هر دو آنتی اکسیدان 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، فلاونوئید

## مقدمه

اسپرم منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش سطح آنتی اکسیدان‌ها 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 آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدان‌ها در جیره، تا اندازه‌ای موجب بهبود باروری شده است. از سویی، افزودن آنتی اکسیدان‌ها به منی در شرایط برون تنی، بهبود کیفیت

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 انجام شده است. بازده عملی پروتکل‌های انجماد با موفقیت‌های مختلفی همراه بوده و تقریباً ۵۰ درصد از اسپرم‌ها در فرایند انجماد و ذوب نمی‌توانند زنده بمانند (۳۸). عدم درک مکانیسم آسیب‌های انجماد یکی از علل محدودکننده استفاده از تلقیح مصنوعی می‌باشد. فرایند انجماد

میتوکندریایی که هر کدام از این ترکیبات به تنهایی تأثیر مثبتی در عملکرد اسپرم گونه‌های مختلف دارند، در محیط رقیق کننده اسپرم خروس، طی فرآیند انجماد و یخ گشایی استفاده شد. آنتی اکسیدان هدفمند ۴-۲، دی نیترو فنل موجب تعدیل تولید ROSها در میتوکندری می شود و آنتی اکسیدان لوتئولین بعنوان یک فلاونوئید موجب محافظت لیپیدهای غشا در برابر تنش اکسیداتیو و محافظت از DNA می شود. همچنین بعلاوه خاصیت ضد میکروبی و ضد ویروسی لوتئولین می تواند در نقش آنتی بیوتیک عمل کرده و محیط را از ROS پاک سازی کند. از لذا به نظر می رسد استفاده ترکیبی از مقادیر بهینه هر دو آنتی اکسیدان می تواند سبب به حداقل رسیدن تولید ROSها و کاهش آسیب های اکسیداتیو شود و همینطور گمان می رود که استفاده هم زمان و ترکیبی آنتی اکسیدان های مورد مطالعه اثرات هم افزایی داشته باشند.

### مواد و روش ها 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. خروس ها در قفس های انفرادی به ابعاد ۸۵×۷۰×۷۰ سانتی متر و تحت شرایط ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی قرار داشتند. هر کدام از خروس ها روزانه با جیره یکسان ۱۵۰ گرم (ذرت) ۵۰/۸٪، دانه سویا ۸/۹۵٪، گندم ۲۰٪، سوس گندم ۱۴٪، دی کلسیم فسفات ۷۴/۰٪، سنگ آهک ۱/۸٪، نمک ۳۸/۰٪، لایزین ۰/۸٪، متیونین ۰/۱۷٪ و مکمل های ویتامینی و معدنی ۵/۰٪ تغذیه شده و دسترسی آزاد به آب داشتند. اسپرم گیری به روش مالش پشتی-شکمی و به صورت دو بار در هفته انجام گرفت. نمونه های اسپرم بلافاصله پس از جمع آوری در دمای ۳۷°C به آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا نمونه ها از نظر حجم، غلظت، تحرک و عدم وجود آلودگی بررسی شد و تنها نمونه های با حجم ۰/۲ تا ۰/۷ میلی لیتر، غلظت اسپرم بیشتر از ۳×۱۰<sup>۹</sup> در هر میلی لیتر و تحرک بیش از ۸۰ درصد مورد استفاده قرار گرفت. برای از بین بردن اثرات انفرادی، نمونه های تأیید شده با یکدیگر مخلوط شد و به صورت یک نمونه واحد درآمد. به منظور رقیق سازی اسپرم ها از رقیق کننده لیک<sup>۲</sup> اصلاح شده (فروکتوز ۰/۸gr، پتاسیم سترات ۰/۵gr، سدیم آل گلو تانات ۱/۹۲gr، پلی وینیل پیرولیدون ۰/۳gr، منیزیم استات ۰/۰۷gr، گلیسین ۰/۳۷۴gr، با فشار اسمزی ۳۱۰ pH و ۷/۲) و لسیتین یک درصد و گلیسرول ۱۱٪ استفاده گردید. تیمارهای آزمایشی مشتمل بر موارد زیر بودند: تیمار شاهد: رقیق کننده لیک بدون آنتی اکسیدان، تیمار ۱: رقیق کننده لیک + ۰/۵ نانومولار DNP + ۰/۷۵ میکرومولار LTN، تیمار ۲: رقیق کننده لیک + ۰/۵ نانومولار DNP + ۱ میکرومولار LTN، تیمار ۳: رقیق کننده لیک + ۰/۷۵ نانومولار DNP + ۰/۷۵ میکرومولار LTN، تیمار ۴: رقیق کننده لیک + ۰/۷۵ نانومولار DNP + ۱ میکرومولار LTN (معیار انتخاب دوزهای ترکیبی آنتی اکسیدان، اخذ نتایج بهینه در آزمایش های قبلی بود) رقیق کننده پایه به دو قسمت

اسپرم را در پی داشته است (۳۷،۳۳،۳۲). ۴-۲، دی نیترو فنول (DNP) یکی از اعضای خانواده پروتئین های جفت نشده (UCP)<sup>۱</sup> است که از طریق تعدیل سوخت و ساز اسپرم سبب کاهش تولید ROS می گردد (۱۸). DNP یک ترکیب مشتق از نیتروژن آلی است. سازوکار عمل DNP بر اساس برهم زدن گرادین پروتون در اطراف غشای میتوکندری و جلوگیری از تشکیل ATP و ROS است. ROSها می توانند 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 پروتون ها اجازه می دهد که از غشای داخلی میتوکندری عبور کنند به گونه ای که سبب جدا شدن اکسیداسیون از فسفریلاسیون می گردد که نتیجه آن افزایش انتقال الکترون و به دنبال آن باعث کاهش تولید ROS می گردد (۱۸). جدا کننده ها می توانند تولید ATP را شدیداً کاهش دهند. در واقع زنجیره انتقال الکترون می تواند بدون تولید ATP ادامه یافته و باعث افزایش میزان متابولیسم پایه شود (۴۲). جدا کننده ها از طریق بسیاری از سازوکارها تولید ROS در میتوکندری را به مقدار قابل توجهی، کاهش می دهند (۱۰). تولید سوپراکسید بوسیله کمپلکس I و III زنجیره انتقال الکترون یک فرآیند غیر آنزیمی بوده و بوسیله شیب بالای الکتروشیمیایی به شدت فعال است (۱۵). این رابطه non-ohmic بوده و می تواند تولید ROS را بدون کاهش زیاد در فسفریلاسیون اکسیداتیو محدود کند و از این رو پروتئین های جفت نشده میتوکندریایی نشان دهنده اولین خط دفاعی در مقابل تنش اکسیداتیو است (۲۲). لوتئولین<sup>۱</sup> (LTN) (۳۴،۵،۷) تراهایدروکسی فلاون) از جمله شناخته شده ترین ترکیبات فلاونوئیدی با گستردگی زیاد در سلسله گیاهی نظیر روغن زیتون، نعنای، رزماری، چای، آویشن و اسفناج است. فعالیت آنتی اکسیدانی لوتئولین در شرایط درون و برون تنی به اثبات رسیده است (۴۹). فلاونوئیدها علاوه بر خاصیت آنتی اکسیدانی دارای خواص ضد میکروبی، ضد ویروسی و ضد جهش هستند (۲۱). مطالعات فارماکولوژیکی نشان می دهد که لوتئولین در محافظت از DNA در برابر H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> نقش مهمی داشته و اثرات آنتی اکسیدانی و پاک سازی رادیکال های آزاد را دارد (۱۱). لوتئولین باعث کاهش تولید ROS در داخل سلول ها و افزایش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز می شود (۲۷). فعالیت آنتی اکسیدانی لوتئولین اصولاً به ساختار ۳ و ۴ دی هیدروکسی گروه کاتکول در حلقه فنلی B بعنوان فعال ترین جزء در مولکول های فلاونوئیدی نسبت داده می شود. همچنین پیوند دو گانه 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 آنتی اکسیدانی مؤثر باشند؛ زیرا تغییر مکان الکترون جفت نشده بین حلقه های A، B و C را میسر می کنند که به تشکیل رادیکال فنوکسیل پایدارتر منجر می شود (۲۹،۲۶). در این مطالعه با توجه به اثرات فارماکولوژیکی و زیستی گسترده هر دو آنتی اکسیدان برای اولین بار ترکیبی از این دو آنتی اکسیدان هدفمند میتوکندریایی و غیر هدفمند

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 بزرگنمایی  $\times 400$  درصد اسپرمهای غیرطبیعی محاسبه شدند (۳۵). محیط هانکوک شامل  $62/5$  میلی لیتر فرمالین (۳۷ درصد)،  $150$  میلی لیتر محلول سالین،  $150$  میلی لیتر محلول بافر و  $500$  میلی لیتر آب دوبار تقطیر است. محلول سالین شامل  $9/01$  گرم کلرید سدیم در  $500$  میلی لیتر آب دو بار تقطیر می باشد. محلول بافر خود از دو محیط جداگانه تشکیل شده است. محیط نخست شامل  $21/682$  گرم دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبدار در  $500$  میلی لیتر آب دو بار تقطیر و محیط دوم از  $22/254$  گرم فسفات پتاسیم در  $500$  میلی لیتر آب دو بار تقطیر تشکیل شده است. با مخلوط کردن  $100$  میلی لیتر از محیط نخست با  $50$  میلی لیتر از محیط دوم، محلول بافر تهیه می شود. برای محاسبه درصد کل اسپرمهای نابهنجار (ناهنجاریهای آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیبهای دم) تعداد  $200$  اسپرم از هر نمونه مورد بررسی قرار گرفته و شمارش شد.

#### اندازه گیری غلظت مالون دی آلدید

به منظور تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای اسپرم از آزمون تیوباریتوریک اسید (TBARS) استفاده شد. در این آزمون، میزان مالون دی آلدید بعنوان شاخصی از میزان پراکسیداسیون لیپیدها، از طریق واکنش با تیوباریتوریک اسید اندازه گیری می شود. لذا، ابتدا بمنظور رسوب پروتئین ها،  $1\text{ ml}$  منی از هر گروه تیماری بعد از یخ گشایی در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  با  $2\text{ ml}$  اسیدتری کلرواستیک در یک لوله استریل مخلوط کرده و سپس جهت جلوگیری از وقوع پراکسیداسیون لیپیدی در طی زمان انجام آزمایش، مقدار  $1\text{ ml}$  از محلول هیدروکسی تولون بوتیل شده یا (BHT) دو درصد در اتانول) به همراه  $1\text{ ml}$  EDTA به محلول موردنظر افزوده شد. سپس نمونه ها بمدت  $15$  دقیقه با دور  $\times g 1200$  سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ،  $1\text{ ml}$  از محلول رویی را برداشته و با  $1\text{ ml}$  از محلول تیوباریتوریک اسید  $0/67$  درصد در یک فالکن مخلوط کرده و بمدت  $20$  دقیقه در آب  $95^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند. پس از سرد شدن نمونه ها، میزان جذب نور نمونه ها در طول موج  $532\text{ nm}$  نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) اندازه گیری شد (۲۴).

#### آنالیز آماری

داده های بدست آمده برای فراسنجه های درصد تحرک کل، تحرک پیش رونده، خطی بودن تحرک، زنده مان، پاسخ به محلول HOST و هانکوک، سطح مالون دی آلدید و سایر فراسنجه های سیستم کاسا بوسیله رویه GLM نرم افزار 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، اسپرم ها بدلیل تولید ROS بیش از حد و کاهش سطح آنتی اکسیدان درون سلولی بیشتر مستعد آسیب های انجماد هستند. فرآیند انجماد و ذوب باعث ایجاد

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 رقیق کننده حاوی یک چهارم گلیسرول در ۵ فالکون به مقدار یک میلی لیتر 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 فالکون ها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  اضافه گردید و بلافاصله فالکون ها به همراه رقیق کننده حاوی یک چهارم گلیسرول به یخچال که دمای آن روی  $4^{\circ}\text{C}$  تنظیم شده منتقل گردید و بعد از دو ساعت سردسازی و رسیدن دمای نمونه ها به  $4^{\circ}\text{C}$ ، یک میلی لیتر رقیق کننده حاوی سه چهارم گلیسرول به هر کدام از فالکون ها افزوده شد که حجم محلول به  $2$  میلی لیتر رسیده و رقیق سازی نهایی منی به نسبت  $1:20$  انجام شد (غلظت نهایی اسپرم در هر میلی لیتر  $10^8 \times 1/5$ ). پس از رقیق سازی و بمدت یک ساعت دیگر در یخچال نگهداری شدند (۴۰). سپس نمونه ها را به داخل پایوت ها کشیده و بمدت  $7$  دقیقه در ارتفاع  $4$  سانتی متری از ازن مایع قرار داده و پس از انجماد نمونه ها، آنها را به داخل ازن مایع انتقال دادیم.

#### ارزیابی پارامترهای حرکتی اسپرم

جهت ارزیابی فراسنجه های جنمایی، ابتدا نمونه ها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  بمدت  $30$  ثانیه یخ گشایی شد (۳۶)، سپس  $10$  میکرولیتر از نمونه را روی لام از قبل گرم شده قرار داده و بعد از پوشاندن با لامل، روی صفحه گرم میکروسکوپ، فراسنجه های جنمایی اسپرم شامل جنمایی کل، تحرک پیش رونده و ویژگی های کنتیکی اسپرم توسط سیستم کامپیوتری ارزیابی اسپرم (CASA, Video Test Sperm Russia) 3.1 مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### زنده مانی اسپرم

برای ارزیابی میزان اسپرم های زنده و مرده از رنگ آمیزی حیاتی ائوزین-نیگروزین استفاده گردید (۵). بدین منظور بعد از یخ گشایی نمونه ها،  $10\text{ }\mu\text{l}$  اسپرم از هر گروه تیماری بر روی یک لام قرار گرفته و با  $20\text{ }\mu\text{l}$  از رنگ ائوزین نیگروزین مخلوط گردید. سپس توسط یک لام دیگر نمونه رنگ شده بر روی لام گسترش یافته و پس از خشک شدن، توسط میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی  $\times 400$  و شمارش  $200$  اسپرم، درصد اسپرم های زنده (رنگ نشده) و مرده (رنگ شده) تعیین شد.

#### یکپارچگی غشا اسپرم

برای ارزیابی یکپارچگی غشا از محلول هاست (HOST)؛ (۹) گرم فروکتوز و  $4/9$  گرم سترات در یک لیتر آب دوبار تقطیر) استفاده شد. بدین منظور  $10\text{ }\mu\text{l}$  از نمونه منی را با  $100$  از محلول هاست مخلوط کرده و بمدت نیم ساعت در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس  $10\text{ }\mu\text{l}$  از نمونه را زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی  $\times 400$  قرار داده، و چندین نقطه از محیط را بوسیله سیستم M SHOT Image analysis عکس برداری می کنیم. اسپرم هایی با دم خمیده، پیچیده یا متورم بعنوان اسپرم سالم در نظر گرفته شدند (۳۱).

#### مورفولوژی اسپرم

برای ارزیابی اسپرم های غیرطبیعی حداقل  $15$  میکرولیتر از هر نمونه به میکروتیوب های حاوی  $150$  میکرولیتر محلول

اسپرم، غلظت مالون دی آلدیید، میزان سلامت غشاء، درصد زنده ماندی اسپرم ها و درصد اسپرم های غیر طبیعی طی فرآیند انجماد یخ گشایی بررسی شد. نتایج حاصل از آنالیز داده ها نشان داد که افزودن ترکیب آنتی اکسیدان ها به منی خروس باعث افزایش حرکت پیش رونده اسپرم ها می شود و این افزایش در تیمارهای شماره ۲ و ۳ نسبت به گروه شاهد معنی دار است ( $p < 0.05$ ). افزودن تیمارهای ۲ و ۳ آنتی اکسیدانی باعث افزایش معنی دار تحرک کل در مقایسه با تیمار شاهد شد همچنین تیمار ۳ باعث افزایش معنی دار پارامترهای VSL و STR نسبت به سایر گروه ها، تمایل به کاهش پارامتر BCF را نشان داد ( $p = 0.10$ ).

برخی تغییرات کشنده در خصوصیات ساختاری و عملکردی اسپرم ها یعنی اختلالات اسمزی، تشکیل کریستال یخ داخل و خارج سلولی می شود که باعث ایجاد تنش اکسیداتیو می شود (۲۰). میتوکندری اندامک مهمی در سلول اسپرم است که نقش اساسی در جنبایی، زنده ماندی، بلوغ اسپرم و حفظ کیفیت باروری اسپرم دارد. بدلیل تولید مقادیر زیاد ROS در میتوکندری و عدم نفوذ پذیری اکثر آنتی اکسیدان ها به آن، باعث شده که میتوکندری حساس ترین و آسیب پذیرترین بخش نسبت به ROS ها 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 آنتی اکسیدان هدفمند میتوکندریایی ۲،۴-دی نیترو فنول و آنتی اکسیدان لوتولین بر فراسنجه های حرکتی

جدول ۱- مقایسه میانگین ویژگی های حرکتی اسپرم منجمد-یخ گشایی شده خروس در بین سطوح تیماری مختلف

متغیر	کنترل	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	SEM	p-value
PM (%)	۲۸/۲۵ <sup>a</sup>	۳۷/۷۵ <sup>ab</sup>	۴۰/۵۰ <sup>a</sup>	۴۲/۵۰ <sup>a</sup>	۳۷/۲۵ <sup>ab</sup>	۲/۵۲	۰/۰۱۱۸
TM (%)	۵۳/۷۵ <sup>d</sup>	۶۳/۲۵ <sup>ab</sup>	۶۴/۷۵ <sup>a</sup>	۶۷/۲۵ <sup>a</sup>	۶۱/۷۵ <sup>ab</sup>	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 <sup>d</sup>	۱۹/۸۴ <sup>ab</sup>	۲۳/۱۰ <sup>ab</sup>	۲۴/۶۳ <sup>a</sup>	۲۰/۰۶ <sup>ab</sup>	۱/۲۵	۰/۰۱۳۶
STR (%)	۷۱/۴۸ <sup>d</sup>	۷۳/۳۵ <sup>d</sup>	۷۷/۹۷ <sup>ab</sup>	۸۳/۸۳ <sup>a</sup>	۷۷/۴۳ <sup>ab</sup>	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	۰/۰۰۲۴

میانگین ها با حروف ناهمسان (a,b,c) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی دار است ( $p < 0.05$ ). PM: جنبایی پیش رونده، TM: جنبایی کل، ALH: بیشترین دامنه حرکت جانبی بر حسب میکرومتر، BCF: فرکانس حرکت جانبی بر حسب هرتز، LIN: معیار خطی بودن اسپرم که بر حسب درصد است، STR: معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم بر حسب 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-دی نیترو فنول + ۰/۷۵ میکرومولار لوتولین، تیمار ۲ (۰/۵) نانومولار ۴،۲-دی نیترو فنول + ۱ میکرومولار لوتولین، تیمار ۳ (۰/۷۵) نانومولار ۴،۲-دی نیترو فنول + ۰/۷۵ میکرومولار لوتولین، تیمار ۴ (۰/۷۵) نانومولار ۴،۲-دی نیترو فنول + ۱ میکرومولار لوتولین، تیمار ۵ (۰/۷۵) نانومولار ۴،۲-دی نیترو فنول + ۱ میکرومولار لوتولین.

پراکسیداسیون لیپیدها است. به خاطر وجود مقادیر زیاد لیپیدهای غیر اشباع در غشاء پلاسمایی اسپرم، پراکسیداسیون لیپید سبب نابودی ساختار غشاء پلاسمایی اسپرم شده و بدنبال آن میزان زنده ماندی و جنبایی اسپرم کاهش پیدا می کند (۲). افزودن آنتی اکسیدان ها در محیط انجماد اسپرم، می تواند تولید بیش از اندازه ROS را در طول فرآیند انجماد و یخ گشایی کنترل کند (۳۹). با توجه به دلیل ذکر شده می توان احتمال داد تیمارهای مورد استفاده با کاهش آسیب به ساختار سلول اسپرم باعث افزایش کیفیت اسپرم شده اند. فلاوونوئیدها ترکیباتی هستند که خاصیت آنتی اکسیدانی داشته و از طریق سازوکارهای متفاوتی از لیپیدها در برابر آسیب های اکسیداتیو محافظت می کنند. فلاوونوئیدها به عنوان جاروب کننده های طبیعی گونه های فعال اکسیژن هستند که در درمان ناباروری استفاده می شوند (۱۳). محققین نشان دادند که افزودن ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول بر لیتر از فلاوونوئید کوئرستین سبب حفظ زنده ماندی اسپرم های گاو پس از انجماد می شود (۴۶). نتایج پژوهش ها نشان دادند که کوئرستین بعنوان فلاوونوئید توانایی کاهش میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در سلول اسپرم را دارا می باشد (۱). کوئرستین به سبب بهبود کیفیت و باروری آزمایشگاهی اسپرم های منجمد شده ی بوفالو می شود (۳). همچنین افزودن این ترکیب فلاوونوئیدی سبب بهبود معنی داری از نظر حرکت پیش رونده در اسپرم نریان می شود (۱۷). کوئرستین توانایی

DNP یک پروتئین جدا نشده میتوکندریایی است که به پروتون ها اجازه عبور از غشای داخلی میتوکندری را می دهد به گونه ای که سبب جدا شدن اکسیداسیون از فسفریلاسیون می گردد که نتیجه آن افزایش انتقال الکترون و افزایش میزان مصرف اکسیژن است که به دنبال آن سبب کاهش تولید ROS می گردد (۱۸). نتایج حاصل از مطالعه اسپرم ماهی نشان داد که جلوگیری از تولید ROS بوسیله ترکیبات UCP بهتر از تلاش برای حذف ROS ها با استفاده از مکمل های آنتی اکسیدانی است (۴۷). همچنین گزارش شده است که القاء جدا کننده های میتوکندری با استفاده از DNP در کشت جنین خوک و گاو مفید بوده است (۲۸). نتایج این تحقیق با داده های حاصل از مطالعه ای 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 یخ گشایی نسبت به گروه کنترل شد (۱۴). همچنین افزودن یک میکرومولار DNP اسپرم ماهی زرد سبب افزایش تحرک و زنده ماندی و سلامت غشا در انجماد شد (۱۶). نتایج ما نشان دهنده آن است که تیمارهای مورد استفاده باعث کاهش میزان تنش اکسیداتیو می شوند. یکی از مهمترین اثرات تنش اکسیداتیو،

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 ( $p < 0.05$ ).

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 فلاونوئید 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 فلاونوئیدها 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 مالون‌دی‌آلدهید داده و میزان یکپارچگی غشا اسپرم را افزایش می‌دهد می‌توان انتظار داشت که باعث بهبود و افزایش جنبایی سلول بشود. آنالیز

جدول ۲- تأثیر مخلوط آنتی‌اکسیدان‌های ۴،۲-دی‌نیتروفل و لوتولین در رفیق‌کننده لستین 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	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	SEM	p-value
زنده‌مانی %	۵۸/۰۳ <sup>a</sup>	۶۶/۱۳ <sup>ab</sup>	۶۸/۲۳ <sup>a</sup>	۶۹/۸۹ <sup>a</sup>	۶۴/۷۰ <sup>ab</sup>	۱/۹۰	۰/۰۰۵
سلامت غشا %	۴۴/۲۰ <sup>b</sup>	۵۰/۵۲ <sup>ab</sup>	۵۰/۰۶ <sup>ab</sup>	۵۴/۵۹ <sup>a</sup>	۴۷/۸۱ <sup>b</sup>	۱/۵۵	۰/۰۰۴
اسپرم‌های ناسالم %	۳۱/۸۹ <sup>a</sup>	۲۵/۹۰ <sup>ab</sup>	۲۴/۳۰ <sup>bc</sup>	۱۸/۳۱ <sup>c</sup>	۲۷/۰۱ <sup>ab</sup>	۱/۵۳	۰/۰۰۰۳
غلظت مالون‌دی‌آلدهید	۲/۵۶ <sup>a</sup>	۲/۰۹ <sup>ab</sup>	۱/۹۶ <sup>bc</sup>	۱/۵۸ <sup>c</sup>	۲/۱۱ <sup>ab</sup>	۱/۱۱	۰/۰۰۰۳

میانگین‌ها با حروف ناهمسان (a, b, c) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌داری است ( $p < 0.05$ ).

تیمار ۱ (۰/۵) نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفل + ۰/۷۵ میکرومولار لوتولین، تیمار ۲ (۰/۵) نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفل + ۱ میکرومولار لوتولین، تیمار ۳ (۰/۷۵) نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفل + ۱ میکرومولار لوتولین، تیمار ۴ (۰/۷۵) نانومولار ۴،۲-دی‌نیتروفل + ۱ میکرومولار لوتولین

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 فلاونوئیدی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که اثرات منفی تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهد (۱۹). گزارش کردند که افزودن عصاره مرزنجوش به اسپرم قبل از انجماد نه تنها باعث بهبود فراسنجه‌های حرکتی بلکه باعث بهبود سلامت غشاء می‌شود که دلیل آن را وجود ترکیبات مختلف فنولیک از جمله لوتولین دانستند. ترکیب آنتی‌اکسیدان هدمند ۲،۴-دی‌نیتروفل و غیرهدمند لوتولین می‌تواند تولید ROS را بطور غیرمستقیم بوسیله کاهش پراکسیداسیون لیپید، کاهش دهد. با این حال مطالعه حاضر نشان می‌دهد که کاهش پراکسیداسیون لیپید سبب افزایش زنده‌مانی اسپرم‌های منجمد و یخ‌گشایی 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 لوتولین از طریق کاهش ROS سبب بهبود معنی‌دار پارامترهای عملکردی اسپرم‌های خروس پس از انجماد-یخ‌گشایی می‌شود.

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 اتوزین-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 لوتولین تیمار شده بودند موجب افزایش تعداد اسپرماتوزییدهای اولیه شد و همچنین تعداد اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی در گروه تیمار شده با آنتی‌اکسیدان لوتولین بیشتر از بقیه گروه‌های تیماری بود که علت آن را نقش محافظتی لوتولین بیان کردند (۴۸). همچنین محققین گزارش کردند که اضافه کردن کریسین به‌عنوان فلاونوئید 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 انجام گرفته است. مقدار مالون‌دی‌آلدهید 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، میزان جنبایی، یکپارچگی DNA اسپرم

## منابع

- 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.
- 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.
- 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.
- Aitken, J. and H. Fisher. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, 16: 259-267.
- 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.
- 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.
- Bajpai, P. 1963. The effect of photoperiodicity on semen characteristics of poultry. *Poultry Science*, 42: 462-465.
- Balercia, G., L. Gandini, A. Lenzi and F. Lombardo. 2017. *Antioxidants in Andrology*. Springer.
- Blesbois, E. 2011. Freezing avian semen. *Avian Biology Research*, 4: 52-58.
- 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.
- 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  $\beta$  protein (25-35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons. *Phytotherapy research*, 24: S102-S108.
- Daghighi Kia, 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).
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lavara, R., J. Vicente and M. Baselga. 2013. Genetic variation in head morphometry of rabbit sperm. *Theriogenology*, 80: 313-318.

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* (Labiateae) prevents copper-mediated toxicity in  $\beta$ -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. Tvrdá, 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.

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  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities and luteolin contents of *Chrysanthemum morifolium* Ramat extracts. *African Journal of Biotechnology*, 10: 19197-19202.



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

Mahdi Nazari<sup>1</sup>, Hossein Daghigh Kia<sup>2</sup>, Abouzar Najafi<sup>3</sup>, Mahdiah Mahdipour<sup>4</sup> and Jamileh Emami<sup>5</sup>

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