نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۳۲، پاییـــز ۱۴۰۰
ص‌ص: ۳~۱۴

اثر ترکیبی آنتی‌اکسیدان میتوکندریایی ۴،۲-دی نیتروفنول و لوتئولین بر فرآسنجه‌های عملکردی اسپرم خروس نژاد راس طی نگهداری در دمای ۴°C

• مهدی نظری[1]، حسین دقیق کیا*[1]، ابوذر نجفی[2]
۱ گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲ گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت : اردیبهشت ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش : مهر ۱۳۹۹
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۰۸۹۴۳۱
Email: hdk6955@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ASJ.2020.342828.2058

چکیده

در فرآیند نگهداری اسپرم تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، موجب آسیب به اسپرم می‌شود. بیشترین آسیب به دلیل تولید فراوان ROS و عدم نفوذپذیری آنتی‌اکسیدان‌ها به داخل میتوکندری، متوجه این اندامک می‌شود. به‌منظور کاهش آسیب‌های اکسیداتیو در سطح گسترده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مختلفی استفاده شده است. این مطالعه اثر افزودن سطوح مختلف ترکیب آنتی‌اکسیدان ۴،۲-دی‌نیتروفنل و لوتئولئین در رقیق‌کننده منی، بر فرآسنجه‌های عملکردی اسپرم خروس در شرایط نگهداری برون تنی در دمای ۴°C، بمدت ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های منی از ۱۵ قطعه خروس در سن ۲۸ هفتگی جمع‌آوری شدند. پس از ارزیابی‌های اولیه، نمونه‌های منی با یکدیگر مخلوط شدند. پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها و افزودن سطوح تیمار ۱ (۰/۵ نانومولار ۲-۴، دی‌نیتروفنل+۰/۵ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۲ (۰/۵ نانومولار ۲-۴، دی‌نیتروفنول+۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۳ (۰/۵ نانومولار ۲-۴، دی‌نیتروفنل+۱ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۴ (۰/۷۵ نانومولار ۲-۴، دی‌نیتروفنول+۰/۵ میکرومولار لوتئولین)، تیمار ۵ (۰/۷۵ نانومولار ۲-۴، دی‌نیتروفنل+۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین) و تیمار ۶ (۰/۷۵ نانومولار ۲-۴، دی‌نیتروفنول+۱ میکرومولار لوتئولین) از آنتی‌اکسیدان‌های ترکیبی و نگهداری نمونه‌ها در دمای ۴°C بمدت ۴۸ ساعت، فرآسنجه‌های کیفی و کمی در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ ساعت پس از نگهداری در دمای ۴°C، ارزیابی شدند. نتایج نشان دادند که پارامترهای ارزیابی‌شده در اثر گذر زمان کاهش معنی‌داری داشتند (P< ۰/۰۵). نمونه‌های تیمار شده با آنتی‌اکسیدان ترکیبی سبب افزایش معنی‌دار پارامترهای اندازه‌گیری شده مستقل از زمان و اثر متقابل تیمار در زمان شد (P< ۰/۰۵). همچنین افزودن تیمار ۳، ۴، ۵ و ۶ باعث کاهش معنی‌دار غلظت مالون‌دی‌آلدهید شدند و تیمار ۶ باعث کاهش معنی‌دار اسپرم‌های ناسالم شد (P< ۰/۰۵). در نتیجه استفاده ترکیبی از این دو آنتی‌اکسیدان می‌تواند سبب بهبود پارامترهای عملکردی اسپرم خروس پس از سردسازی شود.

واژه‌های کلیدی: ۴،۲-دی‌نیتروفنول، لوتئولین، میتوکندری، پراکسیداسیون لیپید.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 132 pp: 3-14

Combination effect of mitochondrial antioxidant 4,2-dinitrophenol and luteolin on functional parameters of Ross rooster sperm during storage at 4 ºC

By: M. Nazari[1], H. Daghigh Kia[1]*, A. Najafi[۲]
[1]Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: May 2020 **Accepted: October 2020**

In the process of sperm storage, production of reactive oxygen species (ROS) and reduction of antioxidant activity cause sperm damage. The most damage related to high ROS production and inadequate antioxidant penetration into mitochondria attacks this organelle. Combination of antioxidants was used to reduce oxidative damage. This study investigated the effect of different levels of combination of targeted antioxidant 2, 4-dinitrophenol and non-targeting luteolin on semen dilution on sperm parameters under in vitro storage at 4°C for 48 h. Semen samples were collected from 15 rooster at 28 weeks of age. After initial evaluations, semen samples were mixed with each other. After diluting the samples and adding different levels of antioxidants, treatment 1 (0.5 nM 4,2-di-nitrophenol + 1 µM luteolin), treatment 2 (0.5 nM 4,2-di-nitrophenol +3 µM luteolin), treatment 3 (0.75 nM) 4,2-Ditrophenol + 1 µM luteolin), 4 (0.75 nM 4,2-Dithinrophenol +3 µM luteolin) from combined antioxidant and storage of samples at 4°C for 48 h in refrigerator quantitative parameters were evaluated at 1, 24, 48 h after storage at 4°C**.** The parameters evaluated had a significant decrease over time. But the samples treated with the combination antioxidant significantly increased (P <0.05) in the measured parameters independent of the time and the interaction effect of the treatment on time. Also, addition of 3, 4, 5 and 6 treatments significantly decreased malondialdehyde concentration and treatment's 6 significantly decreased unhealthy spermatozoa (P <0.05).

Key words: 2, 4-dinitrophenol, Luteolin, Lipid peroxidation, Mitochondria.

مقدمه

همواره سعی شده است با افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدان به رقیق‌کننده‌ها، باروری اسپرم‌ها در مدت نگهداری بصورت مایع حفظ شود تا بتوان از آن در تلقیح استفاده کرد. از عوامل مؤثر بر کاهش باروری اسپرم می‌توان به تغییرات غیرقابل برگشت غشاء فسفولیپیدی اسپرم در اثر پراکسیداسیون اشاره کرد. تنش اکسیداتیو موجب پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود که این عمل سبب کاهش باروری منی پرندگان می‌شود (Long and Kramer و همکاران ۲۰۰۳).

در شرایط عادی تعادل بین تولیدگونه‌های فعال اکسیژن (ROS) [1] و سیستم آنتی‌اکسیدانی، جهت حفظ زنده‌مانی اسپرم وجود دارد درحالی‌که این تعادل با نگهداری و انجماد اسپرم به‌هم می‌خورد (صفا و همکاران ۲۰۱۷)؛ که نتیجه آن تجمع رادیکال‌های آزاد در میتوکندریها و آسیب به آنها، جهش ژنوم میتوکندری، آسیب به DNA و پروتئین اسپرم می‌باشد (Skulachev و همکاران ۲۰۰۹). دو مسیر برای تولید ROS در اسپرماتوزوا شناسایی شده است: مسیر NADPH اکسیداز در غشاء سیتوپلاسمی و مسیر NADH اکسیدوردوکتاز میتوکندریایی. ازآنجائیکه میتوکندری اندامکی مهم در سلول است که موجب جنبایی، زنده‌مانی، بلوغ اسپرم و حفظ کیفیت باروری اسپرم می‌شود؛ تولید مقادیر زیادROS در این اندامک و عدم نفوذپذیری اکثر آنتی‌اکسیدان‌ها به آن موجب شده که میتوکندری حساس‌ترین و آسیب پذیرترین اندامک نسبت به ROSها و تنش اکسیداتیو باشند (Fang و همکاران ۲۰۱۴). میتوکندری بعلت نفوذناپذیر بودن نسبت به آنتی‌اکسیدان‌ها و

[1]Reactive Oxygen Species (ROS)

وجود مقادیر ۵ الی ۱۰ برابر ROS نسبت به سیتوپلاسم، بیشتر در معرض آسیب اکسیداتیو است (Skulachev و همکاران ۲۰۰۹). تولید ROS بطور قابل توجهی در میتوکندری ناکارآمد افزایش می‌یابد که این امر بنوبه خود بر عملکرد میتوکندری اسپرم‌ها تأثیر می‌گذارد. ROS باعث آسیب به غشاء میتوکندری شده و افزایش تولید ROS می‌گردد(Agarwal and Anandh Prabakaran و همکاران ۲۰۰۵).

برای انتقال هدفمند آنتی‌اکسیدان‌ها به درون میتوکندری نیاز به حامل‌هایی است که بتواند آنتی‌اکسیدان را محصور نموده سپس ورود آن به درون سیتوزول و تحویل هدفمند آنتی‌اکسیدان مورد نظر به میتوکندی را تنظیم کند (Yamada و همکاران ۲۰۰۷). مطالعات نشان دادند که حفظ پتانسیل بالای غشاء میتوکندری برای باروری ضروری است (Gallon و همکاران ۲۰۰۶). ۲، ۴-دی نیتروفنول یک جداکننده[2] میتوکندریایی است که به پروتون‌ها اجازه عبور از غشاء داخلی میتوکندری را می‌دهد به گونه‌ای که سبب جدا شدن اکسیداسین از فسفریلاسیون می‌گردد که نتیجه آن، افزایش انتقال الکترون و افزایش میزان مصرف اکسیژن است (Harper و همکاران ۲۰۰۱). نحوه عمل ۲، ۴-دی نیتروفنول بر اساس جلوگیری از تشکیل ATP در میتوکندری است. زنجیره انتقال الکترون می‌تواند در نبود ATP کار خود را ادامه داده و موجب افزایش میزان متابولیسم پایه شود. همچنین ۲،۴-دی نیتروفنل سبب بهبود فرآسنجه‌های اسپرم خروس و کاهش ROS موجود در مایع منی شده است (محمدی و دقیق‌کیا ۲۰۱۹). نتایج سودمندی از افزودن ۲،۴-دی نیتروفنول به نمونه اسپرم‌های با زنده‌مانی پایین بدست آمده است (Hernández و همکاران ۲۰۰۷). 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 (Cheng و همکاران ۲۰۱۰ ؛ Liu و همکاران ۲۰۱۱). لوتئولین (۳،۴،۵،۷ تتراهیدروکسی فلاون) ازجمله شناخته شده‌ترین ترکیبات فلاونوییدی است که در گیاهانی مانند روغن زیتون، نعناع، رزماری و مرزنجوش وجود دارد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی لوتئولین در شرایط درون و برون تنی به اثبات رسیده است (Yang و همکاران ۲۰۱۱). لوتئولین دارای گروه‌های هیدروکسیل در موقعیت‌های ۳، ۴، ۵ و ۷ و یک پیوند مضاعف در موقعیت ۲ است که مهمترین قسمت‌های ساختار آن محسوب شده و وظیفه انجام فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی لوتئولین را در واکنش‌های ضدالتهابی و ضدسرطانی از طریق کنترل رادیکال‌های آزاد بر عهده دارد(Lin و همکاران ۲۰۰۸). همچنین لوتئولین مستقیماً رادیکال‌های آزاد مانند سوپراکسید آنیون و رادیکال‌های هیدروکسیل را از بین می‌برند (Yahyazadeh and Altunkaynak و همکاران ۲۰۱۹). لوتئولین موجب کاهش آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو به غشا پلاسمایی می‌شود (An و همکاران ۲۰۱۶). لوتئولین اثرات مفیدی در حفظ اسپرم‌های سالم از لحاظ ریخت‌شناسی هنگام قرارگیری در میدان مغناطیسی دارد (Yahyazadeh and Altunkaynak همکاران ۲۰۱۹). آنتی‌اکسیدان هدفمند ۴-۲، دی‌نیتروفنل موجب تعدیل تولید ROSها در میتوکندری می‌شود. آنتی‌اکسیدان لوتئولین بعنوان یک فلاونویید موجب محافظت لیپیدهای غشا در برابر تنش اکسیداتیو و محافظت ازDNA می‌شود. همچنین بعلت خاصیت ضدمیکروبی و ضدویروسی آن می‌تواند در نقش آنتی‌بیوتیک عمل کرده و محیط را از ROS پاک‌سازی کند.

با توجه به اثرات فارماکولوژیکی و زیستی گسترده ترکیب آنتی‌اکسیدان‌های لوتئولین و ۲،۴-دی‌نیتروفنول، در پژوهش حاضر برای اولین بار ترکیبی از این دو آنتی‌اکسیدان هدفمند و غیرهدفمند که هرکدام از این ترکیبات به‌تنهایی تأثیر مثبتی در عملکرد اسپرم پستانداران دارند، در محیط رقیق‌کننده اسپرم خروس، طی نگهداری در دمای ۴°C استفاده شد. بنظر می‌رسد استفاده ترکیبی از مقادیر بهینه هر دوآنتی‌اکسیدان بتواند سبب کاهش ROS تولیدی شده و باعث کاهش آسیب‌های اکسیداتیو شود. علاوه بر این استفاده هم‌زمان و ترکیبی آنتی‌اکسیدان‌های موردمطالعه اثرات هم‌افزایی داشته باشند.

[2] Uncoupler

مواد روش‌ها

این پژوهش در واحد مرغداری ایستگاه تحقیقاتی و پژوهشی خلعت پوشان دانشگاه تبریز انجام پذیرفت.

پرندگان و طراحی آزمایش: بدین منظور از ۱۵ خروس بالغ نژاد راس با سن ۲۸ هفته استفاده شد. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی به ابعاد ۷۰×۷۰×۸۵ سانتی‌متر و تحت شرایط ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی قرار داشتند. هر کدام از خروس‌ها جیره یکسان ۱۵۰ گرم (دانه ذرت ۵۰/۸٪، دانه سویا ۸/۹۵٪، گندم ۲۰٪، سبوس گندم ۱۷٪، دی‌کلسیم فسفات ۰/۷۴٪، کربنات‌کلسیم ۰/۳۸٪، نمک ۰/۳۸٪، لایزین ۰/۰۸٪، میتونین ۰/۱۷٪ و مکمل ویتامینه و معدنی ۰/۵٪) دریافت کردند. خروس‌ها دسترسی آزاد به آب داشتند. اسپرم‌گیری به روش مالش پشتی-شکمی دو بار در هر هفته انجام گرفت. پس از انتقال نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد ابتدا از نظر 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. به‌منظور از بین بردن اثرات انفرادی، نمونه‌های با یکدیگر مخلوط شده و بصورت یک نمونه واحد درآمدند. به‌منظور رقیق‌سازی (نسبت رقیق سازی ۱:۲۰) اسپرم‌ها، از رقیق‌کننده لیک[3] (فروکتوز ۰/۸ گرم، پتاسیم سیترات ۰/۵ گرم، سدیم‌الگلوتامات ۱/۹۲ گرم، پلی‌وینیل پیرولیدون ۰/۳ گرم، منیزیم‌استات ۰/۰۷ گرم، گلیسین ۰/۳۷۴ گرم، لسیتین ۱٪ و آب دو بار تقطیر ۱۰۰ میلی‌لیتر، با فشار اسمزی ۳۱۰ و pH ۷/۲) استفاده گردید (Masoudi و همکاران ۲۰۲۰). مواد شیمیایی مورداستفاده در مطالعه حاضر از شرکت مرک و آلمان تهیه شدند. پس از آماده‌سازی رقیق‌کننده، ۲ میلی‌لیتر از آن را در داخل ۷ لوله استریل ریخته و به هر لوله بر اساس گروه‌های آزمایشی، آنتی‌اکسیدان موردنظر اضافه گردید. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از:

گروه شاهد: رقیق‌کننده لیک بدون تیمار

تیمار ۱: رقیق‌کننده لیک+ ۰/۵ نانومولار ۴،۲-دی نیتروفنول + ۰/۵ میکرومولار لوتئولین

تیمار ۲: رقیق‌کننده لیک+ ۰/۵ نانومولار ۴،۲-دی نیتروفنول+ ۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین

تیمار ۳: رقیق‌کننده لیک+ ۰/۵ نانومولار ۴،۲-دی نیتروفنول + ۱ میکرومولار لوتئولین

تیمار ۴: رقیق‌کننده لیک+ ۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی نیتروفنول + ۰/۵ میکرومولار لوتئولین

تیمار ۵: رقیق‌کننده لیک+ ۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی نیتروفنول + ۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین

تیمار ۶: رقیق‌کننده لیک+ ۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی نیتروفنول + ۱ میکرومولار لوتئولین

۴،۲-دی‌نیتروفنل از شرکت سیگما آلدریچ (شماره ثبت[4]:۵-۲۸-۵۱، شماره محصول:۳۴۳۳۴) و لوتئولین نیز از شرکت سیگما آلدریچ آلمان (شماره ثبت:۳-۷۰-۴۹۱، شماره محصول:۷۲۵۱۱) تهیه شدند. معیار انتخاب دوزهای ترکیبی آنتی‌اکسیدان، مقادیر بهینه حاصل از آزمایش‌های قبلی بود. پس از اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده، نمونه اسپرم به نسبت ۱ به ۲۰ به داخل هر لوله اضافه گردید. برای کاهش کنترل‌شده دما و به‌منظور به حداقل رساندن تنش دمایی، پس از بستن درب لوله‌ها، آن‌ها را در ظروف حاوی آب ۳۷°C، آن‌ها را بداخل یخچال با دمای ۴°C منتقل گردید. پس از سه ساعت دمای ظرف آب حاوی لوله‌های نمونه به ۴°C کاهش یافت (Najafi و همکاران ۲۱۴). سپس در صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از رسیدن دمای نمونه‌ها به ۴°C، نمونه‌ها از نظر صفات درصد اسپرم‌های متحرک و با حرکت پیش‌رونده، اسپرم‌های زنده، درصد اسپرم‌های با غشاء سالم نسبت به گروه شاهد ارزیابی شدند. همچنین ۴۸ ساعت پس از نگهداری اسپرم‌ها، درصد اسپرم‌های ناسالم و مقادیر مالون‌دی-آلدهید نمونه‌ها جهت تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء پلاسمایی اسپرم، نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی تحرک اسپرم: جهت ارزیابی فرآسنجه‌های تحرک کل و پیش‌رونده، ۵ میکرولیتر از نمونه منی را روی لام قرار داده و بعد از پوشاندن با لامل، از هر نمونه حداقل ۱۰ فیلد بطورکاملاً تصادفی (حداقل ۲۰۰ اسپرم) از نظر فرآسنجه‌های تحرک، بوسیله

[3] Lake

[4] Chemical Abstracts Service(CAS Number)

نرم‌افزار کامپیوتری کاسا (CASA, Video Test Sperm 3.1 Russia)مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی زنده‌مانی: برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ آمیزی حیاتی ائوزین-نیگروزین استفاده گردید. بدین منظور در زمانهای صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت، ۱۰ میکرولیتر نمونه اسپرم رقیق شده از هر گروه بر روی یک لام قرار گرفته و با ۲۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین-نیگروزین مخلوط گردید. پس ازتهیه گسترش و خشک شدن، توسط میکروسکوپ فازکنتراست با(Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) بزرگنمایی ×۴۰ و شمارش ۲۰۰ اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده (رنگ نشده) و مرده (رنگ شده) تعیین شدند (Daghigh Kia و همکاران ۲۰۱۸).

سلامت غشا پلاسمایی اسپرم (HOST[5]) برای ارزیابی یکپارچگی غشا از محلول هاست (۹ گرم فروکتوز و ۴/۹ گرم سیترات در یک لیتر آب دوبار تقطیر) استفاده شد. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی را با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌هاست مخلوط کرده و بمدت نیم ساعت در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه را زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ×۴۰ قرار داده، و چندین نقطه از محیط را به‌وسیله نرم افزار M SHOT Image analysis عکس‌برداری می‌کنیم. اسپرم‌هایی با دم خمیده، پیچیده یا متورم به‌عنوان اسپرم سالم در نظر گرفته شدند و درصد اسپرم‌های سالم محاسبه می‌گردد.

مورفولوژی اسپرم:

برای ارزیابی ناهنجاریمورفولوژیکی اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد. برای تهیه محلول هانکوک ابتدا محلول سدیم سالین ۹/۱ محلول سدیم کلراید در ۵۰۰ میلی‌لیتر از آب دو بار تقطیر تهیه شد. برای ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم‌ها، ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه منی به میکروتیوب‌های حاوی ۱۵۰ میکرولیتر از محلول هانکوک افزوده شد (اسکافر و هولزمن ۲۰۰۰). سپس یک قطره از این مخلوط را روی لام قرار داده و توسط یک لامل پوشانده و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ×۴۰، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی محاسبه شدند (هانکوک و همکاران، ۱۹۵۶).

پراکسیداسیون لیپید: به‌منظور تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای اسپرم از تست TBARs 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 یک میلی‌لیتر از هر گروه تیماری بعد از ذوب در دمای ۳۷°C با دو میلی‌لیتر اسیدتری‌کلرواستیک در یک لوله استریل مخلوط شده و سپس جهت جلوگیری از وقوع پراکسیداسیون لیپیدی در طی زمان انجام آزمایش، یک میلی‌لیتر از محلول هیدروکسی تولوئن بوتیله شده یا BHT دو درصد در اتانول به همراه یک میلی‌لیتر EDTA به محلول مورد نظر افزوده شد. سپس نمونه‌ها بمدت ۱۵ دقیقه با دور g× ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ یک میلی‌لیتر از محلول رویی را برداشته و با یک میلی-لیتر از محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷ درصد در یک فالکون مخلوط کرده و بمدت ۲۰ دقیقه در آب ۹۵°C قرار گرفتند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) اندازه‌گیری شدند (Najafi و همکاران ۲۰۱۴).

آنالیز آماری: این آزمایش دارای ۷ (۶ تیمار آزمایشی بعلاوه گروه شاهد) تیمار، ۴ تکرار و ۳ زمان بود. داده‌های بدست آمده برای فرآسنجه‌های درصد تحرک کل، تحرک پیش رونده، زنده‌مانی، پاسخ به محلول HOST، در همه زمان‌ها با رویه Mixed نرم افزار (SAS (9.3 آنالیز شده‌اند. داده‌های مربوط به پاسخ به محلول هانکوک و سطح مالون‌دی-آلدهاید که فقط در ۴۸ ساعت اندازه‌گیری شده بودند، با رویه GLM در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آنالیز قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی کرامر در سطح ($P<$ ۰/۰۵) استفاده شد. مدل آماری این طرح برای رویه Mixed عبارت

[5] Hypo Osmotic Swelling Test

است از:

$Y_{ijkl} = \mu + Treat_i + Time_j + Treat_i \times Time_j + Batch_k + e_{ijkl}$

i=(۱-۷)

j = (۱-۳)

k = (۱-۱۲)

l = (۱-۴)

Y_{ijkl} = شاهد ijkl ام

μ = میانگین جمعیت

$Treat_i$ = اثر تیمارها(اثر ثابت)

$Time_j$ = اثر زمان‌ها(اثر ثابت)

$Treat_i \times Time_j$ = اثر متقابل تیمار در زمان

$Batch_k$ = اثر بچ اسپرم(اثر متغیر)

e_{ijkl}= اثر عوام ناشناخته ijkl ام

نتایج

نتایج جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که افزودن تیمارهای ۳، ۵ و ۶ باعث افزایش معنی‌دار پارامتر جنبایی در مقایسه با سایر تیمارها شدند. در فراسنجه‌های تحرک پیش رونده تیمارهای ۳ و ۶ باعث افزایش معنی‌دار نسبت به سایر تیمارها گردید. (P< ۰/۰۵). در پارامتر زنده‌مانی تیمارهای ۳ و ۶ باعث افزایش معنی دار زنده‌مانی نسبت به اکثر تیمارها بغیر از تیمار ۵ شده بودند. در پارامتر سلامت غشاء تیمارهای ۳، ۵ و ۶ باعث افزایش معنی‌دار پارامتر سلامت غشاء در مقایسه با سایر تیمارها شدند.

نتایج ما نشان دهنده آن است که در زمان صفر در اکثر پارمتر ها در مقایسه با زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نتایج بهتری بدست آمده است.

جدول ۱: تأثیر افزودن ترکیب آنتی‌اکسیدان‌هدفمند و غیرهدفمند و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشاء اسپرم خروس در ٤°C

تیمارها	تحرک کل (%)	تحرک پیش‌رونده (%)	زنده‌مانی (%)	سلامت‌غشاء (%)
کنترل	۷۶/۳۳^{c}	۵۲/۹۲^{e}	۷۸/۱۲^{d}	۶۸/۵۸^{c}
تیمار ۱	۷۸/۰۰^{b}	۵۵/۲۵^{cd}	۸۱/۳۳^{c}	۷۱/۲۲^{b}
تیمار ۲	۷۸/۳۳^{b}	۵۵/۷۵^{bcd}	۸۲/۲۵^{c}	۷۱/۲۵^{b}
تیمار ۳	۸۱/۲۵^{a}	۵۹/۷۵^{a}	۸۵/۵۱^{a}	۷۵/۴۴^{a}
تیمار ٤	۷۹/۲۵^{b}	۵۶/۱۷^{bc}	۸۴/۲۰^{b}	۷۲/۵۳^{b}
تیمار ٥	۸۱/۳۳^{a}	۵۷/۵۰^{b}	۸۵/۰۷^{ab}	۷۶/۰۵^{a}
تیمار ٦	۸۲/۰۸^{a}	۶۱/۲۵^{a}	۸۶/۳۸^{a}	۷۷/۸۹^{a}
SEM	۰/۵۳	۰/۶۴	۰/۶۷	۰/۷۸
زمان				
صفر	۹۵/۴۳^{a}	۷۴/۰۴^{a}	۹۶/۹۵^{a}	۸۷/۳۰^{a}
۲٤	۷۸/۵۷^{b}	۵۸/۵۰^{b}	۸۴/۳۸^{b}	۷۳/۱۴^{b}
٤۸	۶۴/۵۴^{c}	۳۸/۲۹^{c}	۶۸/۴۶^{c}	۵۹/۴۰^{c}
SEM	۰/۳۵	۰/۴۳	۰/۴۴	۰/۵۱
P value تیمار	<۰/۰۱	<۰/۰۱	<۰/۰۱	<۰/۰۱
P value زمان	<۰/۰۱	<۰/۰۱	<۰/۰۱	<۰/۰۱
P value تیمار×زمان	<۰/۰۱	<۰/۰۱	<۰/۰۱	<۰/۰۱

تیمار ۱: ۰/۵ نانومولار ۴،۲-دی نیتروفنول + ۰/۵ میکرومولار لوتئولین؛ تیمار ۲: ۰/۵ نانومولار ۴،۲-دی نیتروفنول+ ۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین؛ تیمار ۳: ۰/۵ نانومولار ۴،۲-دی نیتروفنول + ۱ میکرومولار لوتئولین؛ تیمار ۴: ۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی نیتروفنول + ۰/۵ میکرومولار لوتئولین؛ تیمار ۵: ۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی نیتروفنول +۰/۷۵ میکرومولار لوتئولین؛ تیمار ۶: ۰/۷۵ نانومولار ۴،۲-دی نیتروفنول + ۱ میکرومولار لوتئولین

a-e حروف غیرتشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (P< ۰/۰۵).

نتایج حاصل از جدول ۲ نشان می‌دهد با گذشت زمان، درهمه تیمارهای آزمایشی تحرک کل کاهش‌معنی‌داری پیدا کرد. مقایسه تیمارها نشان می‌دهد که افزودن تیمارهای ۵ و ۶ در زمان ۲۴ و افزودن تیمارهای ۳، ۵ و ۶ در زمان صفر و ۴۸ ساعت پس از نگهداری در دمای ۴°C سبب افزایش معنی‌دار جنبایی نسبت به گروه کنترل گردید (P< ۰/۰۵).

جدول ۲: حداقل میانگین مربعات درصد تحرک کل اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ٤°C

تیمار	مدت نگهداری (ساعت)		
	۰ ساعت	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت
شاهد	۹۴/۵۰^{Ab}	۷۶/۰۰^{Bc}	۵۸/۵۰^{Cb}
تیمار ۱	۹۵/۲۵^{Ab}	۷۷/۲۵^{Bbc}	۶۱/۵۰^{Cb}
تیمار ۲	۹۵/۲۵^{Ab}	۷۷/۷۵^{Babc}	۶۲/۰۰^{Cb}
تیمار ۳	۹۶/۰۰^{Aa}	۷۹/۲۵^{Babc}	۶۸/۵۰^{Ca}
تیمار ٤	۹۵/۰۰^{Aab}	۷۷/۷۵^{Babc}	۶۳/۵۰^{Cab}
تیمار ۵	۹۶/۵۰^{Aa}	۸۰/۵۰^{Bab}	۶۸/۵۰^{Ca}
تیمار ٦	۹۵/۵۰^{Aa}	۸۱/۵۰^{Ba}	۶۹/۲۵^{Ca}
SEM	۱/۲۹	۱/۲۹	۱/۲۹

حروف بزرگ ABC در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در هر یک از زمان‌های آزمایشی است (P< ۰/۰۵).

حروف کوچک abc در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار هر یک از تیمارها در کل ازمایش است (P< ۰/۰۵).

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد تیمارها در تحرک پیش‌رونده در زمان صفر تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت است (P< ۰/۰۵) اما مقایسه تیمارها در زمان ۲۴ ساعت نشان می‌دهد که افزودن تیمارهای ۳ و ۶ باعث افزایش تحرک پیش‌رونده در مقایسه با نسبت به اکثر تیمارها بغیر از تیمار ۵ شده‌است. همچنین تیمارهای ۳، ۴، ۵ و ۶ باعث افزایش معنی‌دار تحرک پیش‌رونده در ۴۸ ساعت از نگهداری در دمای ۴°C نسب به گروه شاهد (P< ۰/۰۵).

جدول ۳: حداقل میانگین مربعات درصد تحرک پیش رونده اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ٤°C

تیمار	مدت نگهداری (ساعت)		
	ساعت صفر	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت
شاهد	۷۲/۵۰^{Aa}	۵۵/۵۰^{Bb}	۳۰/۷۵^{Cd}
تیمار ۱	۷۴/۰۰^{Aa}	۵۷/۵۰^{Bab}	۳۴/۲۵^{Cdc}
تیمار ۲	۷۵/۷۳^{Aa}	۵۸/۲۵^{Bab}	۳۲/۲۵^{Cdc}
تیمار ۳	۷۴/۰۰^{Aa}	۶۱/۷۵^{Ba}	۴۳/۵۰^{Cab}
تیمار ٤	۷۴/۲۵^{Aa}	۵۷/۷۵^{Bb}	۳۸/۵۰^{Cbc}
تیمار ۵	۷۴/۲۵^{Aa}	۵۹/۰۰^{Bab}	۳۹/۲۵^{Cbc}
تیمار ٦	۷۵/۵۰^{Aa}	۶۱/۷۵^{Ba}	۴۶/۵۰^{Ca}
SEM	۱/۵۷	۱/۵۷	۱/۵۷

حروف بزرگ ABC در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در هر یک از زمان‌های آزمایشی است (P< ۰/۰۵).

حروف کوچک abc در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار تیمارها در کل آزمایش است (P< ۰/۰۵).

نتایج جدول شماره ۴ نشان می‌دهد با گذشت زمان نگهداری (۴۸ ساعت) کاهش معنی‌داری در زنده‌مانی اسپرم بوجود می‌آید. مقایسه تیمارها در هر زمان‌های مختلف نشان می‌دهد تیمارهای ۵،۳،۲ و ۶ باعث افزایش معنی‌دار درصد زنده‌مانی بعد از گذشت ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۴°C می‌شود؛ همچنین تیمارهای ۵،۴،۳ و ۶ باعث افزایش معنی‌دار درصد اسپرم‌های زنده طی ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۴°C می‌شود (P< ۰/۰۵).

جدول ٤: حداقل میانگین مربعات درصد زنده‌مانی اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ٤°C

تیمار	مدت نگهداری (ساعت)		
	ساعت صفر	٢٤ ساعت	٤٨ ساعت
شاهد	۹۵/۶۴^{Aa}	۸۰/۱۹^{Bb}	۵۸/۵۲^{Cc}
تیمار ۱	۹۶/۹۶^{Aa}	۸۲/۹۸^{Bab}	۶۴/۰۶^{Cc}
تیمار ۲	۹۷/۲۵^{Aa}	۸۵/۱۹^{Ba}	۶۴/۳۱^{Cbc}
تیمار ۳	۹۷/۹۶^{Aa}	۸۵/۵۵^{Ba}	۷۳/۶۳^{Ca}
تیمار ٤	۹۷/۲۵^{Aa}	۸۳/۶۷^{Bab}	۷۱/۶۹^{Cab}
تیمار ٥	۹۶/۲۵^{Aa}	۸۷/۵۵^{Ba}	۷۳/۱۵^{Ca}
تیمار ٦	۹۷/۰۸^{Aa}	۸۷/۵۵^{Ba}	۷۳/۸۸^{Ca}
SEM	۱/۶۵	۱/۶۵	۱/۶۵

حروف بزرگ ABC در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در هر یک از زمان‌های آزمایشی است (P< ۰/۰۵).
حروف کوچک abc در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار هر یک از تیمارها در کل ازمایش است (P< ۰/۰۵).

نتایج جدول ۵ بیانگر کاهش معنی‌دار میزان یکپارچگی غشاء اسپرم طی ۴۸ نگهداری نمونه رقیق‌شده اسپرم در دمای ۴°C است. آنالیز تیمارها در هر زمان نشان می‌دهد که افزودن تیمار ۶ سبب افزایش معنی‌دار سلامت غشاء نسبت به گروه شاهد شد (۰/۰۵ >P). تیمارهای ۳، ۵ و ۶ سبب افزایش معنی‌دار سلامت غشاء بعد از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۴°C شد (P< ۰/۰۵).

جدول ٥: حداقل میانگین مربعات سلامت غشاء اسپرم خروس (HOST، درصد) طی نگهداری در دمای ٤°C (میانگین±انحراف خطا)

تیمار	مدت نگهداری (ساعت)		
	ساعت صفر	٢٤ ساعت	٤٨ ساعت
شاهد	۸۵/۳۵^{Aa}	۶۷/۸۷^{Bb}	۵۲/۵۲^{Cc}
تیمار ۱	۸۸/۴۴^{Aa}	۷۲/۵۱^{Bab}	۵۲/۶۸^{Cc}
تیمار ۲	۸۶/۹۵^{Aa}	۷۲/۸۹^{Bab}	۵۳/۹۱^{Cc}
تیمار ۳	۸۸/۵۵^{Aa}	۷۴/۱۴^{Bab}	۶۳/۶۲^{Cab}
تیمار ٤	۸۶/۶۳^{Aa}	۷۲/۲۳^{Bab}	۵۸/۹۸^{Cbc}
تیمار ٥	۸۷/۳۷^{Aa}	۷۳/۸۴^{Bab}	۶۶/۹۲^{Ca}
تیمار ٦	۸۸/۰۶^{Aa}	۷۸/۴۸^{Ba}	۶۷/۱۳^{Ca}
SEM	۱/۹۱	۱/۹۱	۱/۹۱

حروف بزرگ ABC در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در هر یک از زمان‌های آزمایشی است (P< ۰/۰۵).
حروف کوچک abc در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار هر یک از تیمارها در کل ازمایش است (P< ۰/۰۵).

تأثیر افزودن سطوح مختلف ترکیب آنتی اکسیدان‌های هدفمند و غیرهدفمند بر کاهش درصد اسپرم‌های ناسالم و کاهش میزان غلظت مالون‌دی‌آلدهید پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۴°C در جدول ۶ آمده است. افزودن تیمار ۶ باعث کاهش معنی‌دار اسپرم‌های ناسالم پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۴°C نسبت به گروه شاهد شد (P< ۰/۰۵) و همچنین تیمارهای ۳، ۴، ۵ و ۶ باعث کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید بصورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد شد (P< ۰/۰۵).

جدول ٦: اثراستفاده ترکیبی آنتی اکسیدان‌های هدفمند ٤،٢-دی نیتروفنل و لوتئولین بر کاهش درصد اسپرم‌های با مورفولوژی ناسالم و غلظت مالون‌دی‌آلدهاید موجود در منی ٤٨ ساعت پس از سردسازی

متغیر	اسپرم با ریخت شناسی ناسالم	غلظت مالون‌دی‌آلدهید
شاهد	۱۹/۲۶[a]	۲/۹۱[a]
تیمار ۱	۱۸/۴۸[ab]	۲/۷۱[ab]
تیمار ۲	۱۸/۱۷[ab]	۲/۵۴[abc]
تیمار ۳	۱۶/۴۵[ab]	۱/۵۴[d]
تیمار ٤	۱۶/۶۷[ab]	۲/۲۲[bcd]
تیمار ٥	۱۶/۶۷[ab]	۲/۰۰[cd]
تیمار ٦	۱۵/۶۷[b]	۱/۹۲[cd]
SEM	۰/۶۵	۰/۱۴
P value	<۰/۰۱	<۰/۰۱

حروف غیرمشابه (a,b.c,d) در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (p<0.05).

بحث

آسیب‌های بیوشیمیایی و ساختاری اسپرم که در هنگام سردسازی ذخیره سازی اسچرم به وجود می‌آید سبب کاهش کیفیت و پتانسیل باروری منی سردسازی شده می‌شود (Safari و همکاران ۲۰۱۸). استرس اکسیداتیو از مهم‌ترین عواملی است که به دلیل تولید ROS و پراکسیداسیون لیپید در طول نگهداری منی بر کیفیت اسپرم تأثیر می‌گذارد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که رقیق کننده‌ها به همراه آنتی اکسیدان می‌تواند یک راه‌کار مفید و مناسب برای کاهش آسیب‌های ذکر شده باشند.

در مطالعه حاضر ما دریافتیم که افزودن ۴،۲-دی نیتروفنول و لوتئولین اثرات معنی‌داری روی جنبایی، زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی و لیپیدپراکسیداسیون داشته است. افزودن ۴،۲-دی نیتروفنول و لوتئولین سبب کاهش معنی‌دار لیپیدپراکسیداسیون و افزایش زنده‌مانی در اسپرم‌های سردسازی شده خروس گردید. این نشان می‌دهد که لیپیدپراکسیداسیون به طور قابل توجهی در القای آسیب‌های سردسازی اسپرم کمک می‌کنند و روش‌هایی که می‌توانند به طور موثری از تولید ROS جلوگیری کنند یا لیپید پراکسیداسیون را کاهش دهند می‌توانند سبب کاهش آسیب‌های سرد سازی و متعاقب آن سبب بهبود زنده‌مانی در اسپرم طی نگهداری شده در دمای 4 درجه سانتی‌گراد گردند. مطالعه ما برای اولین بار پتانسیل مفید اثرات افزودن ۴،۲-دی نیتروفنول و لوتئولین در سرد سازی اسپرم خروس را نشان می‌دهد.

تنش اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی و سیستم زیستی مهارکننده رادیکال‌های آزاد، هنگام فرآوری اسپرم بوجود آمده و موجب تخریب دیواره سلولی و کل ترکیبات ساختمانی سلول اسپرم می‌شود (Bilodeau و همکاران ۲۰۰۰). مهم‌ترین پیامد تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدها است. بدلیل وجود مقادیر سرشار لیپیدهای اشباع و غیراشباع در غشاء پلاسمایی اسپرم، پراکسیداسیون لیپیدی سبب

نابودی غشاء پلاسمایی می‌شود که این امر زنده‌مانی، تحرک و سلامت غشاء را کاهش می‌دهد. نتایج این مطالعه بهبود معنی‌داری از نظر فرآسنجه‌های حرکتی، سلامت غشاء و زنده‌مانی در اکثر تیمارها بغیر از تیمار ۲ نشان داد و همچنین بهترین نتایج را در گروه تیمار ۳، ۵ و ۶ در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از نشان داد که موافق با مطالعه (Fang و همکاران ۲۰۱۴) است که گزارش کردند افزودن ۱ میکرومول ۴،۲-دی نیتروفنول به محیط انجماد اسپرم ماهی زرد موجب افزایش جنبایی اسپرم نسبت به گروه کنترل شد. گزارش (Dong و همکاران (۲۰۱۰) حاکی از افزایش جنبایی اسپرم بعد از یخ‌گشایی در نتیجه افزودن ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار آنتی‌اکسیدان ۴،۲-دی نیتروفنول به اسپرم میمون رزوس نسبت به گروه کنترل می‌باشد. همچنین افزودن یک میکرومولار ۴،۲-دی نیتروفنول به اسپرم ماهی زرد سبب افزایش تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشا، در انجماد شد (Fang و همکاران ۲۰۱۴). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان دهنده یک ارتباط قوی بین سلامت غشاء و جنبایی اسپرم می‌باشد. بطوری که با افزایش سلامت غشاء، جنبایی اسپرم نیز افزایش می‌یابد.

بدلیل نبود مطالعه‌ای در مورد افزودن لوتئولین در اسپرم، برای مقایسه نتایج از سایر ترکیبات فنلی استفاده شد. نتایج حاکی از آن است که افزودن کریسین بعنوان فلاونویید به جیره موجب افزایش جنبایی‌کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم و افزایش باروری خروس‌ها شد (Altawash وهمکاران ۲۰۱۷). به‌وضوح مشخص است که جداکننده‌هایی مانند ۴،۲-دی نیتروفنول تولید H_2O_2 میتوکندری را کاهش می‌دهند. بنابراین جداکننده‌های میتوکندری یک مکانیسم طبیعی برای کاهش تولید ROS از طریق زنجیره تنفسی می‌باشند (Brand and Esteves ۲۰۰۵). نتایج حاصل از مطالعه حاضرنشان داد که افزایش جنبایی و بهبود تحرک کل با وجود استفاده از ۲،۴-دی‌نیتروفنول حفظ می‌گردد. انرژی مورد نیاز برای جنبایی اسپرم از طریق گلیکولیز تأمین می‌گردد پس کاهش در تولید ATP از طریق مسیر فسفریلاسیون اکسیداتیو تاثیری روی جنبایی اسپرم نخواهد گذاشت.

بر اساس نتایج دقیق‌کیا و همکاران (۱۳۹۵) افزودن عصاره مرزنجوش به اسپرم قبل از انجماد نه تنها موجب بهبود فراسنجه‌های حرکتی، بلکه موجب بهبود سلامت غشاء شد که دلیل آنرا وجود ترکیبات مختلف فنولیک از جمله لوتئولین دانستند، همچنین Yahyazadeh and Altunkaynak (۲۰۱۹). گزارش کردندکه در هنگام قرار دادن بیضه موش در میدان مغناطیسی ۹۰۰ مگاهرتز، در گروه تیمار شده با لوتئولین افزایش تعداد اسپرماتوزییدهای اولیه مشاهده شد و همچنین تعداد اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی در گروه تیمار شده با آنتی‌اکسیدان لوتئولین بیشتر از بقیه گروه‌های تیماری بود که علت آن را نقش محافظتی لوتئولین بیان کردند. ترکیب آنتی‌اکسیدان هدفمند ۴،۲-دی‌نیتروفنل و غیرهدفمند لوتئولین می‌تواند بوسیله کاهش لیپید پراکسیداسیون در نمونه‌های اسپرم ذخیره‌شده، تولید ROSرا بطور غیرمستقیم در طی ۴۸ ساعت کاهش دهد. با اینحال مطالعه حاضر نشان می‌دهد که کاهش لیپیدپراکسیداسیون سبب افزایش زنده‌مانی اسپرم‌های ذخیره‌شده در ۴۸ ساعت پس از نگهداری در $4^{o}C$ شد؛ که این یافته‌ها مطابق با مطالعات پیشین است (Masoudi و همکاران ۲۰۲۰). استفاده از چهار سطح (۱/۱، ۰/۱، ۰/۰۱ میکرومولار (از ۴،۲-دینیتروفنول در انجماد اسپرم گربه ماهی زرد نشان داد که افزودن ۱ میکرومولار ۴،۲-دی نیتروفنول موجب کاهش معنی‌دار تولید ROS، MDA و افزایش معنی‌دار زنده‌مانی اسپرم‌های یخ‌گشایی شده نسبت به گروه کنترل گردید (Fang و همکاران ۲۰۱۴). افزودن ۱۵۰ میکرولیتر عصاره مرزنجوش به اسپرم قبل از انجماد موجب کاهش معنی‌دار سطح غلظت مالون‌دی‌آلدهید نسبت به گروه کنترل شد (دقیق‌کیا و همکاران، ۱۳۹۵). برخی از محققین گزارش کردند که برخی ترکیبات پلی‌فنولیک موجب مهار لیپید پراکسیداسیون، حفظ درصد تحرک و یکپارچگی غشاء اسپرم می‌شود (Sapanidou و همکاران ۲۰۱۴). اثرات مطلوب آنتی‌اکسیدان‌های موردمطالعه بدلیل محافظت از عملکرد میتوکندری بعلت وجود آنتی‌اکسیدان هدفمند ۴،۲-دی نیتروفنول بر روی میتوکندری و همچنین بعلت وجود لوتئولین است که

موجب محافظت از لیپیدهای غشاء در برابر تنش اکسیداتیو و محافظت از DNA است. همچنین بعلت خاصیت ضدمیکروبی و ضدویروسی آن، محیط نگهداری را از آلودگی‌های احتمالی پاک می‌کند.

نتیجه‌گیری

تمامی دوزهای افزوده شده باعث بهبود فراسنجه‌های مورد ارزیابی شده نسبت به گروه کنترل، مستقل از زمان شد با اینحال نتوانست مانع از کاهش فراسنجه‌های حرکتی و حیاتی اسپرم در طی ۴۸ ساعت شود. بنظر می‌رسد که هرکدام از آنتی‌اکسیدان هدفمند و غیرهدفمند که بصورت ترکیبی استفاده شد، اثرات مفید خود را گذاشته و ترکیب دو آنتی‌اکسیدان‌های هدفمند و غیرهدفمند اثرات هم افزایی مفیدی را نشان دادند. نتایج حاکی از آن بود که افزودن تیمارهای ۳،۵ و ۶ توانست فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم خروس را بهبود ببخشد، همچنین تیمار ۶، درصد اسپرم‌هایی با مورفولوژی ناهنجار و تیمارهای ۳، ۴، ۵ و ۶ میزان مالون‌دی‌آلدهید منی را کاهش داد

منابع

دقیق‌کیا، ح. صادقی‌صادق‌آباد، ف. محمدزاده، ح. واثقی‌دودران، ح. و اشرفی، ا. (۱۳۹۵). اثر عصاره مرزنجوش به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ. پژوهش‌های علوم دامی. شماره۲۶،۱ص ص. ۲۰-۱۱۱.

صفا، س.، مقدم، غ.، جعفری جوزانی، ر.، دقیق‌کیا، ح.، جانمحمدی، ح. و نعمتی، ذ،ا. (۱۳۹۵). بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامین E و نانوسلنیوم بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس نژاد لگهورن طی نگهداری در دمای ۴°C. پژوهش‌های علوم دامی. شماره۲۶، ص ص.۷۰-۵۹.

محمدی، ن. و دقیق‌کیا، ح. (۱۳۹۸). مهار تولید ROS از طریق افزودن آنتی اکسیدان هدفمند ۲-۴-دی‌نیتروفنول و تأثیر آن بر عملکرد اسپرم منجمد-یخ‌گشایی خروس. علوم دامی. شماره۳۲، ص ص.۱۶-۳.

Agarwal, A. and Anandh Prabakaran, S. (2005). Oxidative stress and antioxidants in male infertility: a difficult balance. *International Journal of Reproductive BioMedicine.* 3 (1): 1-0.

Altawash, A.S.A., Shahneh, A.Z., Moravej, H., Ansari, M. (2017). Chrysin-induced sperm parameters and fatty acid profile changes improve reproductive performance of roosters. Theriogenology. 104: 72-79.

An, F., Wang, S., Yuan, D., Gong, Y. and Wang, S. (2016). Attenuation of oxidative stress of erythrocytes by plant-derived flavonoids, orientin and luteolin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016.

Bilodeau, J.F., Chatterjee, S., Sirard, M.A. and Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research.* 55 (3): 282-288.

Brand, M.D. and Esteves, T.C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell metabolism*. 2 (2): 85-93.

Cheng, H.Y., Hsieh, M.T., Tsai, F.S., Wu, C.R., Chiu, C.S., Lee, M.M., Xu, H.X., Zhao, Z.Z. and Peng, W.H. (2010). Neuroprotective effect of luteolin on amyloid β protein (25–35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons. *Phytotherapy research*. 24 (S1): S102-S108.

Daghigh Kia, H., Jafari, S., Moghaddam, G., Ebrahimi, M. and Najafi, A. (2018). Effects of Different Concentrations of L-Carnitine in Lecithin-Based Semen Extender on Semen Quality of Ghezel Ram after Freeze Thawing Process. *Research On Animal Production (Scientific and Research)*. 9 (19): 48-53.

Dong, Q., Tollner, T.L., Rodenburg, S.E., Hill, D.L. and VandeVoort, C.A. (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 (6): 2359-2361.

Fang, L., Bai, C., Chen, Y., Dai, J., Xiang, Y., Ji, X., Huang, C. and Dong, Q. (2014). Inhibition of ROS production through mitochondria-targeted antioxidant and mitochondrial uncoupling increases post-thaw sperm viability in yellow catfish. *Cryobiology*. 69 (3): 386-393.

Gallon, F., Marchetti, C., Jouy, N. and Marchetti, P. (2006). The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. Fertility and sterility. 86 (5): 1526-1530.

Harper, J., Dickinson, K. and Brand, M. (2001). Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obesity Reviews*. 2 (4): 255-265.

Hernández, M., Roca, J., Gil, M.A., Vázquez, J.M. and Martínez, E.A. (2007). Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology*. 67 (9): 1436-1445.

Jamshidi, M., Ahmadi Ashtiani, H., Rezazadeh, S., Fathi Azad, F., Mazandarani, M. and Khaki, A. (2010). Study and comparison of phenolic compounds and antioxidant activity of some native plant species of Mazandaran. *Quarterly J. Med. Plants*. 9 (34): 178-183.

Lin, Y., Shi, R., Wang, X. and Shen, H.-M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current cancer drug targets*. 8 (7): 634-646.

Liu, R., Meng, F., Zhang, L., Liu, A., Qin, H., Lan, X., Li, L. and Du, G. (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 (3): 2084-2096.

Long, J. and Kramer, M. (2003). Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. *Poultry science*. 82 (11): 1802-1807.

Masoudi, R., Asadzadeh, N.and Sharafi, M. (2020). The mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO conserves rooster's cooled semen quality and fertility potential. *Theriogenology*.156:236-241

Najafi, A., Kia, H.D., Mohammadi, H., Najafi, M.H., Zanganeh, Z., Sharafi, M., Martinez-Pastor, F. and Adeldust, H. (2014). Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. *Cryobiology*. 69 (1): 68-73.

Sapanidou, V.G., Margaritis, I., Siahos, N., Arsenopoulos, K., Dragatidou, E., Taitzoglou, I.A., Zervos, I.A., Theodoridis, A. and Tsantarliotou, M.P. (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 (1): 19.

Seifi-Jamadi, A., Zhandi, M. and Ansari, M. (2019). The effect of Chrysin inclusion to Beltsville extender on cooling storage of rooster sperm. *Journal of Animal Research.* 32 (1): 36-48.

Skulachev, V.P., Anisimov, V.N., Antonenko, Y.N., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Erichev, V.P., Filenko, O.F., Kalinina, N.I., Kapelko, V.I. and Kolosova, N.G. (2009). An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics.* 1787 (5): 437-461.

Yahyazadeh, A. and Altunkaynak, B. (2019). Protective effects of luteolin on rat testis following exposure to 900 MHz electromagnetic field. *Biotechnic & Histochemistry*. 94 (4): 298-307.

Yamada, Y., Akita, H., Kogure, K., Kamiya, H. and Harashima, H. (2007). Mitochondrial drug delivery and mitochondrial disease therapy–an approach to liposome-based delivery targeted to mitochondria. *Mitochondrion*. 7 (1-2): 63-71.

Yang, J., Kim, J.-S., Jeong, H.J., Kang, H.-H., Cho, J.-C., Yeom, H.-M. and Kim, M.J. (2011). Determination of antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities and luteolin contents of Chrysanthemum morifolium Ramat extracts. *African Journal of Biotechnology*. 10 (82): 19197-19202.