نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۳۰، بهـار ۱٤۰۰
ص‌ص: ۱۸۱~۱۹۰

تأثیر آنتی‌اکسیدان هدفمند ۴،۲–دی‌نیتروفنل بر بهبود فراسنجه‌های کمی و کیفی اسپرم قوچ قزل طی فرایند انجماد–یخ‌گشایی در فصل غیرتولیدمثلی

مهدی نظری[۱]، حسین دقیق کیا[۱](نویسنده مسئول)، مرضیه ابراهیمی[۱]، ابوذر نجفی[۲]، مهدیه مهدی‌پور[۱]

[۱] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
[۲] گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت : بهمن ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش : خرداد ۱۳۹۹
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۴۱۳۳۳۹۲۰۶۲
Email: hdk6955@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2020.341911.2035

چکیده

میتوکندری به‌عنوان موتور تأمین‌کننده انرژی اسپرم دارای خواص منحصر به فردی از جمله عدم نفوذپذیری آنتی‌اکسیدانت‌ها است، به همین خاطر غلظت ROS موجود در این اندامک ۵ الی ۱۰ برابر غشاء پلاسمایی است. بنابر این محققین آنتی‌اکسیدانی طراحی کردند که توانایی عبور از غشاء میتوکندری را داشته باشد و بتواند ROS موجود در این اندامک را مهار نماید تا آسیب‌های اکسیداتیو وارده بر این اندامک را به حداقل برساند. آنتی‌اکسیدان هدفمند ٤،۲-دی‌نیتروفنل توانایی عبور از غشاء میتوکندری را دارا است. هدف پژوهش حاضر افزودن سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان هدفمند به مایع منی جهت پاک‌سازی میتوکندری از گونه‌های فعال اکسیژن، کاهش آسیب‌های ناشی از اکسیداسیون جهت بهبود تحرک اسپرم، و زنده‌مانی اسپرم بود. در این مطالعه از ۸ رأس قوچ نژاد قزل با سن ۲ سال، بوسیله واژن مصنوعی در اوایل فصل بهار اسپرم‌گیری شد، پس از ارزیابی اولیه نمونه‌ها در صورت نرمال بودن باهم مخلوط شده و پس از رقیق‌سازی سطوح ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ نانومولار ٤،۲-دی‌نیتروفنل به نمونه‌ها افزوده‌شده و نمونه‌ها پس از ۲ ساعت سردسازی، منجمد شدند. پس از یک ماه نمونه‌ها یخ‌گشایی شده و فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی، سلامت غشاء، اسپرم ناسالم و میزان پراکسیداسیون لیپیدی اندازه‌گیری شدند. بر اساس نتایج بدست‌آمده افزودن آنتی اکسیدان با غلظت ۰/۵ نانومولار سبب افزایش معنی‌دار فراسنجه‌های حرکتی و کاهش اسپرم‌های ناسالم شد (P< ۰/۰۵). همچنین سطوح ۰/۵ و ۰/۷۵ نانومولار سبب افزایش معنی‌دار زنده‌مانی و افزایش معنی‌دار سلامت غشاء و کاهش میزان لیپید پراکسیداسیون شد (P< ۰/۰۵).

واژه‌های کلیدی: اسپرم، میتوکندری، ۴،۲-دی‌نیتروفنل، تنش‌اکسیداتیو.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 130 pp: 181-190

Effect of targeted antioxidant 2, 4 dinitrophenol on improving qualitative and quantitative parameters of *Ghezel* ram sperm after freeze-thawing process during non-breeding season.

By: Mahdi Nazari[1], Hossein Daghigh Kia[1*], Marzie Ebrahimi, Abouzar Najafi[2], Mahdieh Mahdipour[1]
[1]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
[2]Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran
*Corresponding Author: daghighkia@tabrizu.ac.ir

Received: February 2020 **Accepted: June 2020**

Mitochondria, as sperm energy supplier motors have unique properties including antioxidant non-permeability, so the ROS concentration in this organelle is 5 to 10 times more than that of the plasma membrane. Therefore, researchers have designed an antioxidant which can cross the mitochondrial membrane and is able to inhibit ROS in this organelle to minimize the oxidative damage in it. Targeted antioxidant 4, 2-dinitrophenol has the ability to cross the mitochondrial membrane. The purpose of this study was to add different levels of targeted antioxidant to semen to purify mitochondria from reactive oxygen species, reduce oxidative damage to improve sperm motility and viability. In this study, 8 Ghezel rams (2 years old) were used for semen collection by artificial vagina in early spring. After initial evaluation, the samples with normal properties were pooled and after dilution process, 0, 0.25, 0.5, 0.75, and 1 nM 4, 2-dinitrophenol were added to the samples and frozen after 2 hours of cooling. The samples were thawed after one month and evaluated for motility parameters, viability, membrane health, abnormal sperm and lipid peroxidation. Results showed that addition of 0.5 nM of the antioxidant significantly increased motility parameters and decreased abnormal sperm ($P < 0.05$). Also the levels of 0.5, 0.75 nM 4, 2-dinitrophenol significantly increased viability and membrane integrity and reduced the amount of lipid peroxidation ($P < 0.05$).

Key words: Sperm, Mitochondria, 2, 4-dinitrophenol, Oxidative Stress.

مقدمه

انجماد اسپرم و تلقیح مصنوعی یکی از متداول‌ترین روش‌ها برای بهبود پرورش حیوانات اهلی هستند. عمل انجماد حمل‌ونقل اسپرم را امکان‌پذیر ساخته، هزینه پرورش حیوانات را کاهش داده و تنوع ژنتیکی گونه‌ها را افزایش می‌دهد (Lecewicz و همکاران 2019). انجماد منی نقش به‌سزایی در پیشرفت و توسعه تکنیک‌های تولیدمثلی بخصوص تلقیح مصنوعی ایفاء می‌کند (Bucak و همکاران 2008). انجماد می‌تواند منجر به کاهش تحرک اسپرم، از بین رفتن یکپارچگی غشاء و ساختار اکروزوم و همچنین آسیب به DNA اسپرم شود (Karger و همکاران، 2017). عمل انجماد موجب تنش سرمایی و اکسیداتیو در غشاء اسپرم می‌شود که می‌تواند قدرت باروری اسپرم را کاهش داده، باعث مرگ آن شده و در نهایت باعث کاهش موفقیت تلقیح مصنوعی شود (Maxwell and Evans 1987). رادیکال‌های آزاد را می‌توان مهمترین عوامل تنش اکسیداتیو یا تنش شیمیایی طی مرحله انجماد و یخ‌گشایی دانست که به دو نوع ROS (Reactive Oxidative Species) و RNS Reactive (Nitrogen Species) تقسیم می‌شوند (Chatdarong و همکاران، 2012). میتوکندی از اصلی‌ترین اندامک‌هایی تولید ROSها است؛ این اندامک بعنوان موتور تأمین‌کننده انرژی و عامل حرکتی اسپرم شناخته می‌شود(Rui و همکاران، 2017).

میتوکندری‌ها بعلت ویژگی عدم نفوذپذیری نسبت به ورود آنتی‌اکسیدان‌ها و داشتن مقادیر ۵ الی ۱۰ برابر ROS نسبت به سیتوپلاسم، بیشتر در معرض تنش اکسیداتیو قرار دارند (Skulachev و همکاران، 2009). میتوکندری‌ها بوسیله آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسیدازدیسموتاز، و کاتالاز یا با کمک ویتامین E، گلوتاتیون، و کوانزیم Q10 رادیکال‌های آزاد را تعدیل می‌کند. در صورتی‌که این سیستم دفاعی از بین برود رادیکال‌های آزاد در میتوکندری تجمع یافته و سبب بروز جهش در ژنوم میتوکندریایی، پراکسیداسیون لیپیدی، اکسیداسیون پروتئین‌ها، آسیب به DNA، اختلال در عملکرد میتوکندری و در نهایت مرگ سلول می‌شوند (محمدی و دقیق‌کیا، ۱۳۹۸). در سال‌های اخیر محققین تلاش زیادی در رابطه با حذف رادیکال‌های آزاد از محیط انجماد و یخ‌گشایی کردند؛ آنها به این نتیجه رسیده‌اند که افزودن انواع آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط انجماد و یخ‌گشایی اسپرم می‌توان سبب بهبود فراسنجه‌های حرکتی، میزان باروری و کاهش آسیب‌های وارده بر اسپرم شود (Roca و همکاران، 2005). آنتی‌اکسیدان‌ها با مهار واکنش‌های زنجیرهای اکسیداتیو و ایجاد تعادل بین مواد اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی موجب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شوند. در حالت طبیعی پلاسمای منی دارای مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی برای مهار ROS و محافظت علیه هر نوع آسیب وارده به اسپرم است. برای جلوگیری از تنش اکسیداتیو ناشی از استرس‌های وارده در جریان فرآیند انجماد-یخ‌گشایی و مراحل مختلف نگهداری اسپرم انواع آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده شده است (شهباززاده و همکاران، 2015) با این‌حال با توجه به نوع و مقدار آنتی‌اکسیدان مصرفی و گونه تیمارشده، نتایج متفاوتی بدست آمده است (Grossfeld و همکاران، 2008). به‌تازگی محققین بر این باورند که باید میتوکندری مستقیماً مورد هدف آنتی‌اکسیدان‌ها قرار بگیرد (Jin و همکاران، 2014).

۴،۲-دی‌نیتروفنل یک ترکیب مشتق از نیتروژن آلی با فرمول شیمیایی $C_6H_4N_2O_5$ و جرم مولکولی است. این ماده در دمای اتاق به شکل بلورهای زرد جامد بوده و در آب کمی محلول است. مکانیسم اصلی آن بر اساس گرادیان پروتون شکل‌گرفته در فضای داخلی میتوکندری و جلوگیری از تشکیل ATP است. زنجیره انتقال الکترون بدون تولید ATP نیز می‌تواند فعالیت خود را ادامه داده و باعث افزایش متابولیسم پایه شود (Silva و همکاران، 2016). ۴،۲-دی‌نیتروفنل یک جفت جداکن سنتتیک از فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی است (Jovanovic و همکاران، 2019). جفت‌جداکن کانال‌هایی در داخل غشاء میتوکندری بوده و اولین مکانیسم دفاع آنتی‌اکسیدانی میتوکندری است، که بوسیله کاهش پتانسیل غشاء و افزایش میزان مصرف اکسیژن باعث کاهش تولید ROSها می‌شوند(Fang و همکاران، 2016).

نتایج آزمایش هرناندز و همکاران بیانگر اثرات سودمند افزودن ۴،۲-دی‌نیتروفنل بر اسپرم‌های با زنده‌مانی پایین پس از یخ گشایی است(Hernández و همکاران، 2007). افزودن سطوح مختلف ۴،۲-دی‌نیتروفنل در اسپرم خروس باعث بهبود فراسنجه‌های عملکرد اسپرم و کاهش میزان لیپید پراکسیداسیون شد (محمدی و دقیق‌کیا، ۱۳۹۸). هدف این مطالعه بررسی اثر افزودن سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان هدفمند ۴،۲-دی‌نیتروفنل بر کاهش میزان لیپید پراکسیداسیون، افزایش سلامت غشاء پلاسمایی و افزایش کیفیت فراسنجه‌های حرکتی اسپرم قوچ قزل در خارج از فصل تولیدمثلی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام گرفت. جمع‌آوری منی از هشت رأس قوچ قزل با میانگین سن ۱/۵ الی ۳ سال در شرایط تغذیه‌ای و محیطی یکسان با استفاده از واژن مصنوعی، دو بار در هفته و در اواسط فصل بهار انجام شد. نمونه‌های منی هر یک از قوچ‌ها از نظر حجم، رنگ، تحرک، عدم آلودگی به ادرار و خون و میزان اسپرم با مرفولوژی طبیعی بررسی شده و سپس نمونه‌های منی با رنگ کرمی، تحرک بیشتر از ۷۰ درصد و کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیرطبیعی بعنوان منی نرمال در نظر گرفته شده؛ در غیر این صورت، نمونه حذف گردید. برای از بین بردن اثرات فردی و احتمالاً اثرات متقابل بین

نمونه‌ها، نمونه‌های نرمال در مقادیر مساوی از هر قوچ باهم مخلوط شدند. در این تحقیق از رقیق‌کننده تـریس (تریس ۲۷/۱ گرم در لیتر، اسیدسیتریک ۱۴ گرم در لیتر، گلوکز ۱۰ گرم در لیتر)، ۷ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین بعنوان محافظت‌کننده از سرما استفاده شد (Najafi و همکاران، 2014). تمامی مواد مورد استفاده از شرکت مرک و سیگما آلمان تهیه شده است. ابتدا به ۵ لوله آزمایشی (هرکدام ۲ سی‌سی) محلول تریس اضافه شد. علاوه بر آن به هرکدام از لوله‌های آزمایشی به ترتیب مقادیر صفر(تیمار شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ نانومولار آنتی‌اکسیدان اضافه شد. در ادامه اسپرم به نسبت۱:۲۰ به هرکدام از لوله‌ها اضافه‌شد. سپس لوله‌ها در داخل ظرف حاوی آب ۳۷°C قرارگرفته و به یخچال که قبلاً دمای آن روی ۴°C تنظیم‌شده بود، منتقل گردیدند. پس از دو ساعت سردسازی و تعادل و رسیدن دمای نمونه‌ها به ۴°C، نمونه‌های منـی در پایوتهای ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شدند.

انجماد و یخ‌گشایی

پایوت‌ها به‌مدت ۷ دقیقـه بـه فاصـله ۴ سـانتی‌متـر از سـطح نیتروژن مایع قرارگرفته و پس از انجماد در نیتروژن مایع غوطه‌ور شـده و تـا زمان ارزیابی در داخل تانک ازت مایع (۱۹۶°C-) نگهداری شدند. برای انجام ارزیابی‌ها، پایوت‌ها از ازت مایع خارج نموده و در داخل بن ماری با دمای ۳۷°C بمدت ۳۰ ثانیه یخ‌گشایی شدند (Najafi و همکاران، 2014).

تحرک اسپرم

پس از یخ‌گشایی مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی را روی لام از قبل گرم شده قرار داده و بعد از پوشاندن با لامل، روی صفحه گرم میکروسکوپ گذاشته و با استفاده از نرم‌افزار کاسا[1] (CASA, Video Test Sperm 3.1 Russia) با کمک میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی×۲۰۰ و شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم، فراسنجه‌های تحرک کل[2]، تحرک پیش‌رونده[3] و ویژگی‌های کینتیکی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند (مهدی‌پور و دقیق‌کیا، ۱۳۹۸).

زنده‌مانی (رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین)

بـرای تعیـین درصـد اسـپرم‌هـای زنـده از رنـگ‌آمیـزی ائـوزین-نیگروزین استفاده شد. بدین منظور پس از یخ‌گشـایی نمونـه‌هـا، ۱۰ میکرومولار نمونه منی رقیق‌شده از هر گروه بر روی یک لام قرارگرفتـه و بـا ۲۰ میکرومـولار از رنـگ ائـوزین-نیگـروزین مخلوط گردیدند. سپس توسط یک لام دیگر نمونه رنگ‌شده بر روی لام گسـترش‌یافتـه و پـس از خشـک شـدن توسـط میکروسـکوپ فازکنتراسـت بـا بزرگنمـایی×۴۰۰ و شـمارش ۲۰۰حداقل اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده (رنگ نشده) و مرده (رنگ‌شده) تعیین شدند (دقیق‌کیا و همکاران، ۱۳۹۷).

ارزیابی مورفولوژی اسپرم

برای ارزیابی اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی ، ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه یخ‌گشایی‌شده به میکروتیوب‌های حاوی ۱۵۰ میکرولیتر محلول هانکوک که شامل فرمالین ۳۷ درصد (۶۲/۵میلی‌لیتر)، محلول نمکی (محلول سالین) (۱۵۰) میلی‌لیتر، محلول بافر فسفات (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دو بار تقطیر (۵۰۰ میلی‌لیتر)، افزوده شده و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شد. با شمارش حداقل۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ×۴۰۰ درصد اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه گردید (دقیق‌کیا و همکاران، ۱۳۹۷).

سلامت غشاء پلاسمایی اسپرم

برای ارزیابی سلامت غشاء اسپرم از آزمون هاست (HOST)[4] استفاده شد(Revell and Mrode, 1994). برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از مایع منی به ۱۰۰ میکرولیتر محیط هایپواسموتیک هاست (۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات سدیم، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی اسمول) اضافه گردید. با توجه به اینکه فشار اسمزی موردنیاز برای اسپرم فوچ ۳۱۰ میلی اسمولار بوده، بنابر این قرار گرفتن در محیطی با فشار اسمزی پایین‌تر (هایپواسمول) می‌تواند باعث تمایز اسپرم‌های با غشاء سالم از اسپرم‌هایی با غشاء آسیب‌دیده گردد. بدین‌صورت که دم اسپرم‌های سالم پس از مواجهه با این محیط متورم شده و به شکل پیچ‌خورده درمی‌آید. بمنظور انجام این آزمایش، ۱۰

[1] Computer Assisted Sperm Analysis
[2] Total Motility
[3] Progressive Motility
[4] Hypo-Osmotic Swelling Test

میکرومولار از نمونه اسپرم یخ‌گشایی‌شده با ۱۰۰ میکرومولار از محلول هایپواسمول فوق درون یک میکروتیوب مخلوط شده و بمدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس۵ میکرومولار از محلول فوق بر روی یک لام قرارگرفته و درصد اسپرم‌های با دم متورم و پیچ‌خورده با شمارش ۲۰۰ اسپرم و بزرگنمایی ×۴۰۰ با میکروسکوپ فازکنتراست تعیین گردید(Najafi و همکاران، 2014).

مالون‌دی آلدهید

به‌منظور تعیین میزان پر اکسیداسیون لیپیدهای اسپرم از آزمودن TBARsاستفاده شد (Esterbauer and Cheeseman 1990). در این آزمون، میزان مالون‌دی‌آلدهید بعنوان شاخصی از میزان پراکسیداسیون لیپیدها از طریق واکنش با اسید تیوباربیتوریک اندازه‌گیری شد. بدین منظور، ابتدا به‌منظور رسوب پروتئین‌ها، ۱ میلی‌لیتر از محلول هر گروه تیماری بعد از یخ‌گشایی در دمای ۳۷°C با ۲ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک، در یک لوله استریل مخلوط شده و سپس جهت جلوگیری از وقوع پراکسیداسیون لیپیدی در طی زمان انجام آزمایش، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول هیدروکسی تولوئن بوتیله شده یا (BHT دو درصد در اتانول) به همراه ۱ میلی‌لیتر EDTA به محلول موردنظر افزوده شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور g× ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی را برداشته و با ۱ میلی‌لیتر از محلول اسید تیوباربیتوریک ۰/۶۷ درصد در یک فالکن مخلوط کرده و بمدت ۲۰ دقیقه در آب ۹۵°C قرار گرفتند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) اندازه‌گیری شدند (مهدی‌پور و دقیق‌کیا، ۱۳۹۸).

آنالیز آماری

این طرح دارای ۵ تیمار در ۵ تکرار بود. داده‌های بدست‌آمده برای فراسنجه‌های درصد تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، پاسخ به محلول HOST، هانکوک و سطح مالون‌دی‌آلدهید با رویه GLM نرم‌افزار (۹.۳) SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آنالیز قرار گرفتند. سطح معنی‌داری(P< ۰/۰۵) در نظر گرفته شد، برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی استفاده شد.

نتایج

در این آزمایش اثر افزودن سطوح مختلف (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵و ۱ ناومول) آنتی‌اکسیدان هدفمند ۴،۲-دی‌نیتروفنل بر رقیق‌کننده بر پایه تریس بر فراسنجه‌های عملکردی و کیفیت اسپرم قوچ نژاد قزل در فصل غیرتولیدمثلی طی مرحله انجماد و یخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم قوچ

جدول ۱ مقادیر به‌دست‌آمده از آنالیز فراسنجه‌های حرکتی اسپرم قوچ قزل در فصل غیرتولیدمثلی پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی را نشان می‌دهد؛ افزودن ۰/۵ و ۰/۷۵ نانومول ۴،۲-دی‌نیتروفنل باعث افزایش معنی‌دار تحرک کل نسبت به گروه شاهد شد (۰/۰۵ >P)، همچنین افزودن ۰/۵ نانومولار سبب افزایش معنی‌دار فراسنجه‌های حرکت مستقیم، جلو رونده، حرکت خطی و سرعت در مسیر مستقیم اسپرم شد (۰/۰۵ >P).

جدول ۱- مقایسه میانگین ویژگی‌های حرکتی اسپرم منجمد شده قوچ در بین سطوح مختلف تیماری (میانگین± انحراف معیار)

متغیر	TM (%)	PM (%)	STR (%)	BCF (Hz)	ALH (%)	LIN (µm)	VAP (µm.sec)	VCL (µm.sec)	VSL (µm.sec)
شاهد	۵۹/۲۰^{c}	۲۶/۲۰^{b}	۷۸/۹۳^{ab}	۱۵/۶۰	۱/۳۷	۲۴/۱۴^{b}	۱۶/۵۱	۵۴/۶۲	۱۳/۰۶^{b}
۰/۲۵ nM	۵۹/۴۰^{c}	۲۷/۶۰^{b}	۷۹/۷۷^{ab}	۱۴/۹۴	۱/۵۰	۲۶/۱۲^{ab}	۱۸/۰۷	۵۵/۵۳	۱۴/۴۹^{ab}
۰/۵ nM	۸۵/۸۰^{a}	۴۵/۴۰^{a}	۸۲/۲۲^{a}	۱۵/۶۶	۱/۶۷	۳۳/۲۵^{a}	۲۳/۶۱	۵۸/۷۲	۱۹/۵۶^{a}
۰/۷۵ nM	۷۲/۸۰^{ab}	۳۷/۴۰^{ab}	۸۰/۱۳^{ab}	۱۵/۰۴	۱/۷۰	۲۷/۸۵^{ab}	۱۹/۳۲	۵۵/۳۸	۱۵/۴۶^{ab}
۱ nM	۶۹/۰۰^{bc}	۳۷/۲۰^{b}	۷۱/۵۹^{b}	۱۴/۸۴	۱/۵۸	۲۲/۶۳^{b}	۱۷/۱۰	۵۳/۶۷	۱۲/۱۶^{b}
SEM	۳/۱۶	۲/۷۲	۲/۵۱	۱/۱۴	۰/۱۷	۲/۰۱	۱/۷۷	۳/۰۴	۱/۴۵
	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۴	۰/۴۶	۰/۹۶	۰/۹۸	۰/۱۲	۰/۰۷	۰/۸۱	۰/۰۱۶

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

TM: جنبایی کل، PM: جنبایی پیش‌رونده، STR: حرکت مستقیم، BCF: فرکانس حرکت جانبی، ALH: حرکت جانبی سر، LIN: حرکت خطی، VAP: سرعت متوسط مسیر، VCL: سرعت منحنی، VSL: سرعت در خط مستقیم.

زنده‌مانی، سلامت غشاء، اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی

نتایج حاصل از تجزیه‌وتحلیل داده‌ها نشان می‌دهد که افزودن ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵و ۱ نامومول از ۴،۲-دی‌نیتروفنل سبب بهبود فراسنجه‌های اسپرم شد. بطوریکه در سطوح ۰/۵ و ۰/۷۵ نانومولار این افزایش معنی‌دار بود. همچنین این سطوح باعث افزایش معنی‌دار درصد اسپرم‌هایی با غشاء سالم وکاهش درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی نسبت به گروه کنترل شد (P< ۰/۰۵). افزودن ۰/۵ ، ۰/۷۵ و ۱ نانومولار باعث کاهش معنی‌دار غلظت پراکسیداسیون لیپیدی شد (P< ۰/۰۵).

جدول ۲- تأثیر آنتی‌اکسیدان‌های ٤،۲-دی‌نیتروفنل بر صفات زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء پلاسمایی، میزان مورفولوژی غیرطبیعی و سطح مالون دی‌آلدهید اسپرم قوچ (میانگین± انحراف معیار)

متغیر	زنده‌مانی(%)	سلامت غشا(%)	درصد اسپرم غیرطبیعی(%)	مالون‌دی‌آلدهاید(nmol/dl)
شاهد	۶۳/۱۹^{c}	۴۱/۲۷^{b}	۲۶/۲۹^{a}	۲/۸۵^{a}
۰/۲۵ nM	۶۴/۵۷^{c}	۴۴/۱^{ab}	۲۵/۸۹^{a}	۲/۶۵^{ab}
۰/۵ nM	۸۸/۰۸^{a}	۵۶/۲۲^{a}	۲۰/۴۴^{b}	۱/۷۳^{c}
۰/۷۵ nM	۷۸/۴۴^{ab}	۵۵/۰۶^{a}	۲۲/۸۹^{ab}	۱/۸۱^{c}
۱ nM	۷۲/۷۳^{bc}	۵۱/۲۲^{ab}	۲۳/۲۸^{ab}	۲/۳۲^{b}
SEM	۲/۸۵	۲/۹۷	۰/۹۴	۰/۲۴
P-value	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۵۸	۰/۰۰۱۷	۰/۰۰۸۶

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

بحث

تحرک اسپرم از مهمترین فراسنجه‌هایی است که با توانایی اسپرم برای انتقال در سراسر مجاری تناسلی ماده، واکنش و بارور کردن اووسیت مرتبط است. میتوکندری بعنوان یک احیاءکننده تحرک شناخته می‌شود. میتوکندری واقع در قسمت میانی اسپرم انرژی لازم برای تولید و انتشار امواج تاژکی را بوجود می‌آورد. تحرک اسپرم طی انجماد به‌شدت تحت تأثیر قرار گرفته و کاهش می‌یابد (پویا و همکاران ۱۳۹۶). در سال‌های اخیر پژوهشگران سعی در حذف رادیکال‌های آزاد از محیط انجماد-یخ‌گشایی داشته‌اند که اغلب این روش‌ها تدافعی بوده‌اند(Pribenszky و همکاران، 2010). محققین در تلاش برای یافتن روشی برای جلوگیری از تولید ROS ها هستند. جلوگیری از تولید ROS در میتوکندری بوسیله جفت‌جداکن‌ها ممکن است راهکار مناسب‌تری نسبت به تلاش برای از بین بردن ROS ها با آنتی‌اکسیدان‌ها باشد(Dong و همکاران، 2010). نتایج حاصل از مطالعه در اسپرم موش نشان داد که جلوگیری از تولیدROS بوسیله ترکیبات جفت‌جداکن [5] بهتر از تلاش برای حذف ROSها با استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی است (Dong و همکاران، 2010).

تحقیقات پیشین نشان داده است که افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها تا حدی می‌تواند از اسپرم در برابر گونه‌های فعال اکسیژن محافظت کند (پویا و همکاران، ۱۳۹۶). از آنجائیکه اکثر آنتی‌اکسیدان‌ها توانایی نفوذ به میتوکندری را ندارند و در صورت آسیب خط دفاعی در طی انجماد، میتوکندری آسیب‌پذیرترین اندامک در برابر ROS ها است. میتوکندری اندامکی مهم در سلول است که باعث جنبایی، زنده‌مانی، بلوغ اسپرم و باعث حفظ کیفیت در باروری اسپرم می‌شود. بدلیل تولید مقادیر زیاد ROS در میتوکندری و عدم نفوذپذیری اکثر آنتی‌اکسیدان‌ها به این اندامک، باعث شده که میتوکندری حساس‌ترین و آسیب‌پذیرترین اندامک نسبت به ROS ها و تنش اکسیداتیو باشد (Skulachev و همکاران، 2009؛ Fang و همکاران، 2014). آسیب به میتوکندری می‌تواند باعث اختلال در عملکرد اسپرم و کاهش باروری آن شود (Ford، 2006).

نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که افزودن سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان هدفمند ۴،۲-دی‌نیتروفنل سبب کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید و افزایش درصد زنده‌مانی و تحرک اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل شد که این نتایج موافق با مطالعات پیشین است (Fang و همکاران، 2014؛ Silva و همکاران، 2016؛ محمدی و دقیق‌کیا، ۱۳۹۸).

محمدی و دقیق‌کیا (۱۳۹۸) گزارش کردند که افزودن آنتی‌اکسیدان ۴،۲-دی‌نیتروفنل به محیط رقیق‌کننده خروس طی انجماد و یخ‌گشایی باعث کاهش میزان ROS اسپرم و بهبود فراسنجه‌های تحرک و زنده‌مانی و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیددر سطح ۰/۷۵ نانومولار شد. Fang و همکاران (2014) گزارش کردند که ۴،۲-دی‌نیتروفنل سبب کاهش میزان ROS و پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش زنده‌مانی در محیط انجماد یخ-گشایی در اسپرم گربه‌ماهی زرد شد. تحقیقات بر روی موش نشان داد ممانعت از تولید ROS بوسیله جفت جداکن‌ها راهکاری مفید و مؤثرتر نسبت به حذف یا خنثی‌کردن گونه‌های فعال اکسیژن است (Fang و همکاران، 2014). Macháty و همکاران (2001) گزارش کردند که القاء جداکننده‌های میتوکندری با استفاده از ۴،۲-دی‌نیتروفنل اثر مثبتی در کشت جنین خوک و گاو داشت. استفاده از ۴،۲-دی‌نیتروفنل در انجماد اسپرم میمون رزوس باعث افزایش فراسنجه‌های حرکتی بعد از یخ‌گشایی شد (Dong و همکاران، ۲۰۱۰). تحقیقات نشان داده است که مالون دی آلدهید بعنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی، می‌تواند باعث تخریب کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها گردد (Zhang و همکاران، 2019).

افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدها سبب اختلال در غشاء میتوکندری، کاهش میزان ATP و آسیب آکسونم اسپرم شده و در نهایت باعث کاهش حرکت پیش‌رونده اسپرم خواهد شد(Sanocka وKurpisz، ۲۰۰۴). در این مطالعه افزودن ۲،۴-دی‌نیتروفنل سبب کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید شد که متعاقباً آن سبب بهبود تحرک نسبت به گروه کنترل شد.

[5] Uncoupling Protein 2

همچنین افزودن این ماده سبب افزایش درصد اسپرم‌هایی با غشاء سالم و کاهش اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی نسبت به گروه کنترل شد که این نتایج موافق با گزارش محمدی و دقیق‌کیا (۱۳۹۸) است. کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید سبب افزایش یکپارچگی غشای سلولی شده و همچنین باعث حفظ پیام‌رسان‌های مولکولی می‌گردد که این امر یکی از ضروری‌ترین فراسنجه‌ها برای افزایش میزان باروری است (Wang و همکاران، ۲۰۱۵).

مطالعات نشان دادند که پتانسیل پروتونی بالا سبب فعال شدن تولید ROSها در تنفس سلولی می‌شود. میتوکندری‌ها مجهز به مکانیسم خاص (جداکننده‌ها) برای جلوگیری از پتانسیل زیاد میتوکندری هستند، که این کاهش باعث مهار تولید H_2O_2 در زنجیره تنفسی میتوکندری می‌شود (Korshunov و همکاران، 1997) پروتئین‌های جفت‌جداکن ناقل‌های میتوکندریایی هستند که در غشاء داخلی میتوکندری حضور داشته و متعلق به خانواده‌ای از ناقل‌های آنیونی هستند که بوسیله ROS ها یا محصولات آنها فعال‌شده و در نتیجه سبب القای نشت پروتون و کاهش تولید ROS می‌گردند(Rousset و همکاران، 2004). جفت‌جداکن میتوکندریایی اولین خط دفاع آنتی‌اکسیدانی میتوکندری در برابر ROS هستند که با کاهش اندک در پتانسیل غشاء و افزایش مصرف اکسیژن سبب کاهش تولید ROSها می‌شوند. القای جداکننده‌های میتوکندری بوسیله ۴،۲ دی‌نیتروفنل در انجماد اسپرم میمون رزوس (Dong و همکاران، 2010) و گربه‌ماهی زرد (Fang و همکاران، 2014) مفید بوده است. ۴،۲دی‌نیتروفنل جداکننده میتوکندری است که به پروتون‌ها اجازه عبور از غشاء داخلی میتوکندری را می‌دهد به‌گونه‌ای که سبب جدا شدن اکسیداسیون از فسفریلاسیون می‌گردد که نتیجه آن افزایش انتقال الکترون و افزایش میزان مصرف اکسیژن است (Harper و همکاران، 2001).

جداکننده‌ها می‌توانند از طریق بسیاری از مکانیسم‌ها تولید ROS میتوکندری را کاهش دهند. نتایج حاصل از مطالعه اثرات فعال‌سازی پروتئین جفت‌جداکن در مواجهه با سرمای شدید روی تولید ATP, ROS, MDA[6]، فراسنجه‌های حرکتی اسپرم، باروری و ارتباط آن با آسیب اکسیداتیو و کیفیت اسپرم در اسپرم تازه و یخ‌گشایی گورخر ماهی نشان دهنده افزایش جنبایی پس از یخ‌گشایی، کاهش پراکسیداسیون لیپید، افزایش تولید ATP و در نهایت موفقیت در باروری بود. افزایش تحرک پس از یخ‌گشایی سبب افزایش باروری می‌گردد که بیانگر آن است که تحرک یک‌شاخص بسیار حساس نسبت به‌سرعت اسپرم در ارزیابی کیفیت اسپرم است؛ کاهش لیپید پراکسیداسیون و افزایش تولیدATP همبستگی معنی‌داری باکیفیت اسپرم گربه ماهی زرد نشان داد (Fang و همکاران، 2014).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که افزون آنتی‌اکسیدان ۴،۲ دی‌نیتروفنل سبب بهبود فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی افزایش میزان سلامت غشاء، کاهش میزان غلظت مالون‌دی‌آلدهید و کاهش اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی طی انجماد-یخ-گشایی می‌شود. سطح ۰/۵ نانومولار بهترین عملکرد را نسبت به بقیه تیمارهای آزمایشی داشت، نتایج این مطالعه نشان داد که جلوگیری از تولید ROS ممکن است راهکار مناسبتری نسبت به تلاش برای حذف ROSها باشد.

منابع

پویا، م .، خدایی مطلق، م .، خلت آبادی فراهانی، ا.، و میرزایی، م. (۱۳۹۶). تاثیر سطوح متفاوت سولفات روی به رقیق کننده منی بر کیفیت اسپرم قوچ نژادفراهانی پس از انجماد-ذوب .*مجله سلول و بافت شماره:* ۸ (۴)، ص۳۷۴-۳۸۶.

شهباززاده، ر.، دقیق‌کیا، ح .، مقدم، غ.، دهقان، غ.، حسینخانی، ع.، و اشرفی، ا. (۲۰۱۵). تاثیر سطوح مختلف عصاره الکلی مرزه سهندی بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاو هلشتاین. پژوهش های علوم دامی (دانش کشاورزی). شماره ۲۵ (۱)، ص ص ۱۳-۲۴.

[6] Malondialdehyde

دقیق‌کیا، ح .، جعفری، س .،مقدم؛ غ.، ابراهیمی، م.، و نجفی، ا. (۱۳۹۷). تأثیر مکمل سازی رقیق‌کننده با سطوح مختلف ال-کارنیتین بر کیفیت منی قوچ قزل بعد از فرآیند انجماد یخ گشایی در خارج فصل تولیدمثلی. پژوهشهای تولیدات دامی. شماره ۹ (۱۹)، ص ص ۴۸-۵۳.

محمدی، ن. و دقیق‌کیا، ح. (۱۳۹۸). مهار تولید ROS از طریق افزودن آنتی اکسیدان هدفمند ۲-۴-دی‌نیتروفنول و تاثیر آن بر عملکرد اسپرم منجمد-یخ‌گشایی خروس. علوم دامی (پژوهش و سازندگی). شماره ۳۲ (۱۲۳)، ص ص ۳-۱۶

مهدی پور، م.، دقیق‌کیا، ح. (۱۳۹۸). بهبود کیفیت اسپرم خروس با افزودن غلظت‌های مختلف نارینژنین بعد از فرآیند انجماد-یخ-گشایی. پژوهش‌های تولیدات دامی. شماره ۱۰ (۲۵)، ص‌ص ۶۱-۶۸

Bucak, M.N., Ateşşahin, A. and Yüce, A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Ruminant Research*, 75 (2-3): 128-134.

Chatdarong, K., Chaivechakarn, A., Thuwanut, P. and Ponglowhapan ,S. (2012). Effects of cold storage prior to freezing on superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities, level of total reactive oxygen species and sperm quality in dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, 47: 274-277.

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.

Evans, G. and Maxwell, W. (1987). Frozen storage of semen, Salamon's artificial insemination of sheep and goats, Butterworths Wellington,. 122-141.

Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, Methods in enzymology, *Elsevier*, 186;. 407-421

Fang, L., Bai, C., Chen, Y., Dai, J., Xiang, Y., Ji, X., Huang, C. et al. (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.

Ford, W. (2006). Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Human Reproduction Update*. 12 (3): 269-274.

Grossfeld, R., Sieg, B., Struckmann, C., Frenzel, A., Maxwell, W., Rath, D. (2008). New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*. 70 (8): 1225-1233.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., Martínez, E.A. (2007). Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology*. 67 (9): 1436-1445.

Jin, H., Kanthasamy, A., Ghosh, A., Anantharam, V., Kalyanaraman, B. and Kanthasamy, A.G. (2014). Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: preclinical and clinical outcomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1842 (8): 1282-1294.

Jovanovic, O., Gille, L., Vazdar, M. and Pohl, E.E. (2019). Membrane Lipids Alter Uncoupling Effect of 2, 4 Dinitrophenol. *Biophysical Journal*. 116 (3): 511a.

Karger, S., Geiser, B., Grau, M., Heuwieser, W. and Arlt, S. (2017). Progressive motility of frozen–thawed canine semen is highest five minutes after thawing. *Reproduction in Domestic Animals*. 52 (2): 350-352.

Korshunov, S.S., Skulachev, V.P. and Starkov, A.A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS letters*. 416 (1): 15-18.

Rui, B.R., Angrimani, D.S., Losano, J.D.A., de Cássia Bicudo, L., Nichi, M. and Pereira, R.J. (2017). Validation of simple and cost-effective stains to assess acrosomal status, DNA damage and mitochondrial activity in rooster spermatozoa. *Animal reproduction science.* 187 133-140.

Revell, S.G. and Mrode, RA. (1994) An osmotic resistance test for bovine semen. Animal *Reproduction Science* 36: 77-86.

Sanocka, D. and Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2 (1): 12.18

Silva, E.F., Junior, A.S.V., Cardoso, T.F., Stefanello, F.M., Kalb, A.C., Martínez, P.E. and Corcini, C.D. (2016). Reproductive toxicology of 2, 4 dinitrophenol in boar sperm. *Toxicology in Vitro.* 35 31-35.

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): 43.٤٦١-٧

Wang, G., Kang, N., Gong, H., Luo, Y., Bai, C., Chen, Y., et al. (2015). Upregulation of uncoupling protein Ucp2 through acute cold exposure increases post-thaw sperm quality in zebrafish. *Cryobiology.* 71 (3): 464-471.

Zhang ,J., Bao, X., Zhang, M., Zhu, Z., Zhou, L., Chen, Q., Zhang, Q. and Ma, B. (2019). MitoQ ameliorates testis injury from oxidative attack by repairing mitochondria and promoting the Keap1-Nrf2 pathway. *Toxicology and applied pharmacology.* 370 78-92.

Lecewicz, M., Strzeżek, R., Majewska, A.M., Purpurowicz, P.S. and Kordan ,W. (2019). The effect of different concentrations of caffeine, pentoxifylline and 2'-deoxyadenosine on the biological properties of frozen-thawed canine semen. *Annals of Animal Science.* 19 (3): 733-746.

Macháty, Z., Thompson, J.G., Abeydeera, L.R., Day ,B.N. and Prather, R.S. (2001). Inhibitors of mitochondrial ATP production at the time of compaction improve development of in vitro produced porcine embryos. *Molecular reproduction and development.* 58 (1): 39-44.

Najafi, A., Kia, H.D., Mohammadi, H., Najafi, M.H., Zanganeh, Z., Sharafi, M., Martinez-Pastor, F. et al. (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.

Pribenszky, C., Vajta, G., Molnar, M., Du, Y., Lin, L ,.Bolund, L. and Yovich, J. (2010). Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. *Biology of reproduction.* 83 (5): 690-697.

Roca, J., Rodríguez, M.J., Gil, M.A., Carvajal, G., Garcia, E.M., Cuello, C., Vazquez, J.M. and Martinez, E.A. (2005). Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *Journal of andrology.* 26 (1): 15-24.

Rousset, S., Alves-Guerra, M.-C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A.-M., Bouillaud, F. and Ricquier, D. (2004). The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes.* 53 (suppl 1): S130-S135.

.