

DOI: 10.22034/AS.2020.11511

تأثیر مخلوط آنتی‌اکسیدان هدفمند MitoQ و غیرهدفمند پنتوکسی‌فیلین در رقیق‌کننده لیک بر کیفیت اسپرم خروس طی نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

مهدی نظری^۱ و حسین دقیق‌کیا^{۲*}

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۹۹/۹/۱۱

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

^۲ استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبه: Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: در زمینه نگهداری اسپرم به صورت کوتاه و طولانی مدت پیشرفت‌های قابل توجهی صورت گرفته است. این فرآیند از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عملکرد و کیفیت اسپرم را متأثر می‌کند. **هدف:** در این تحقیق از ترکیب آنتی‌اکسیدان هدفمند و غیرهدفمند به منظور کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود عملکرد اسپرم طیور استفاده شد. **مواد و روش‌ها:** بدین منظور نمونه‌های منی از ۱۵ خروس سویه راس با سن ۳۰ هفته به روش مالش پشتی-شکمی جمع‌آوری شدند. پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها و افزودن تیمار ۱: ۰/۱ نانومولار MitoQ + ۰/۵ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین، تیمار ۲: ۰/۱ نانومولار Mito Q + ۰/۷۵ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین، تیمار ۳: رقیق‌کننده لیک + ۰/۱ نانومولار MitoQ + ۱ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین، تیمار ۴: ۰/۲ نانومولار MitoQ + ۰/۵ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین، تیمار ۵: ۰/۲ نانومولار MitoQ + ۰/۷۵ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین، تیمار ۶: ۰/۲ نانومولار MitoQ + ۱ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در یخچال نگهداری شده و در زمان‌های ۱، ۲۴ و ۴۸ ساعت نمونه‌ها از نظر ویژگی‌های تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، و در زمان ۴۸ ساعت، میزان پراکسیداسیون لیپید و درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی ناسالم مورد ارزیابی قرار گرفتند. **نتایج:** تیمار ۱ در یک ساعت پس از سردسازی باعث افزایش زنده‌مانی اسپرم نسبت به گروه شاهد شد ($P < 0/05$). در ۲۴ ساعت پس از سردسازی تیمار ۱، ۴ و ۵ باعث افزایش حرکت پیش‌رونده اسپرم شد. تیمار ۴ و ۵ باعث افزایش معنی‌دار تحرک کل و تیمار ۵ باعث افزایش زنده‌مانی و تیمار ۴ باعث افزایش معنی‌دار سلامت غشای اسپرم نسبت به گروه شاهد شد ($P < 0/05$). در ۴۸ ساعت پس از سردسازی تیمار ۴ و ۵ باعث کاهش معنی‌دار غلظت مالون دآلدئید و تیمارهای ۱، ۳، ۴، ۵ و ۶ باعث کاهش معنی‌دار اسپرم‌های ناسالم نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0/05$). **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن تیمار ۵ به نمونه منی طی ۴۸ ساعت سردسازی بهترین عملکرد را داشت.

واژگان کلیدی: میتوکندری، پراکسیداسیون لیپید، آنتی‌اکسیدان هدفمند، پنتوکسی‌فیلین، اسپرم خروس

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در اسپرم‌گیری و تکنیک تلقیح-مصنوعی پرندگان، به نظر می‌رسد حفظ کیفیت اسپرم‌ها تا زمان تلقیح، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد. درک

تلقیح مصنوعی از جمله روش‌های مدیریتی برای افزایش راندمان تولیدمثل در گله مرغ مادر است. با توجه به

بهتر از روش‌های نگهداری منی، شرایط مناسب برای حفظ آن به مدت ۲۴ ساعت بدون کاهش در باروری را فراهم نموده است. این امر برای مراکز پرورش مرغان مادر گوشتی که در فاصله‌ای کمتر از ۲۴ ساعت از مراکز تهیه منی قرار دارند، می‌تواند بسیار مفید و اقتصادی باشد. در این صورت، بجای حمل خروس‌ها و هزینه پرورش آن‌ها می‌توان تنها به حمل مایع منی اکتفا نمود (اختر و همکاران ۲۰۱۴). از روش‌های نگهداری برون‌تنی اسپرم‌پرندگان، نگهداری منی به صورت مایع است که همواره سعی شده است با افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدان به رقیق‌کننده‌ها، باروری اسپرم‌ها در مدت نگهداری به صورت مایع حفظ شود. از رقیق‌کننده‌هایی که به طور گسترده در تحقیقات مربوط به نگهداری برون‌تنی منی پرندگان به صورت مایع مورد استفاده قرار گرفته است، می‌توان به رقیق‌کننده لیک اشاره کرد. عوامل متعددی در کاهش باروری اسپرم به هنگام ذخیره برون‌تنی منی نقش دارند، اما یکی از مواردی که همواره مورد توجه بوده است تغییرات غیرقابل برگشت غشای فسفولیپیدی اسپرم در اثر پراکسیداسیون است. فسفولیپیدها از ترکیبات اصلی غشا بوده و عامل اصلی سیالیت آن می‌باشند؛ این خصوصیت در فرایندهای اکسیداسیون، ظرفیت‌پذیری، واکنش آکروزومی در پستانداران و تحرک اسپرم‌های انسان، خوک و خروس بسیار حائز اهمیت است (مارگارت تارویش و همکاران ۲۰۱۳). از جمله معایب این روش، کاهش سریع قدرت باروری به دلیل اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع و تشکیل رادیکال‌های آزاد طی ذخیره‌سازی منی بصورت مایع و یخ زده است (احمدی و ضمیری ۱۳۸۵). از آنجا که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گوناگون از طریق سازوکارهای مختلفی عمل می‌کنند، واضح است که تنها یک روش نمی‌تواند پیش‌بینی جامعی از تأثیر تمام شاخص‌های درگیر در ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی را نشان دهد (پالگری و همکاران ۲۰۰۰). به نظر می‌رسد که پنتوکسی‌فیلین و cAMP طول مدت فعالیت اسپرم‌ها را افزایش می‌دهند. تیمارهایی که سبب افزایش سطوح cAMP می‌شوند، اغلب منجر به افزایش تحرک و سرعت اسپرم و همچنین

آگونیست القای واکنش آکروزومی هستند. پنتوکسی‌فیلین خاصیت جاروب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد را دارا می‌باشد (استیو و همکاران ۲۰۰۷). در اکثر گونه‌ها، cAMP در کنترل تحرک اسپرم دخالت می‌کند (بانی هانی و ابوالحاجا ۲۰۱۶). پنتوکسی‌فیلین یک متیل‌گزانتین است که در درمان ناباروری مردان استفاده می‌شود (هربمونت و سیفر، ۲۰۱۵). در نمونه‌های منی افراد (اسپرم‌های با تحرک کم) در صورت افزودن پنتوکسی‌فیلین درصد اسپرم‌های با تحرک پیش‌رونده افزایش می‌یابد (یوویچ ۱۹۹۳). وظیفه اصلی پنتوکسی‌فیلین، مهار آنزیم فسفودی استراز نوکلئوتید حلقوی است که منجر به افزایش سطوح cAMP می‌شود (لوسوویز و همکاران ۲۰۱۹). نوکلئوتید سبب بالا رفتن میزان گلیکولیز و تولید ATP داخل سلولی می‌شود با این وجود دیگر اثرهای شناخته شده را نمی‌توان نادیده گرفت؛ به عنوان مثال تغییر در نقل و انتقالات کسیم (سیدر و همکاران ۱۹۹۲) آنتاگونیسم عمل آدنوزین اندوژنوس (لوسوویز و همکاران ۲۰۱۹) یا مهار تولید گونه‌های فعال اکسیژن (گاستی و همکاران ۲۰۱۷). هم‌زمان با این اتفاق، پاسخ خوب اسپرم‌ها به شوک هیپواسموتیکی، نشان دهنده این است که پنتوکسی‌فیلین در حفظ یکپارچگی غشاء بهتر عمل می‌کند (گاستی و همکاران ۲۰۱۷). آنتی‌اکسیدان هدفمند MitoQ برای انتقال بخش آنتی‌اکسیدانی یوبی‌کینول به میتوکندری طراحی شده است (اسمیت و همکاران ۱۹۹۹). عملکرد MitoQ در پیشگیری از آسیب‌های اکسیداتیو عبارت‌اند از مسدود کردن آپوپتوز، بلوکه کردن H_2O_2 ، مهار آزاد شدن سیتوکروم C، کاهش تولید ROS و کاهش لیپید پراکسیداسیون می‌باشد (اسمیت و مورفی ۲۰۱۰). MitoQ به‌صرفه‌تر از پالمیتی کارنتین یا مشتقات کاتیونی، ویتامین E است، زیرا شکل اکسید آن احیاء شده و در طول فرآیند آنتی‌اکسیدانی می‌تواند با پذیرفتن الکترون از زنجیره تنفسی دوباره احیاء گردد. به عبارت دیگر MitoQ یک آنتی‌اکسیدان با قابلیت بازسازی است (اسکالچو و همکاران ۲۰۰۹). آنتی‌اکسیدان هدفمند MitoQ از طریق افزایش تولید ATP، کاهش تولید ROS

نمونه‌های تأیید شده از نظر حجم، تحرک، ریخت‌شناسی و غلظت و عدم وجود آلودگی با یکدیگر مخلوط شدند. به منظور رقیق‌سازی اسپرم‌ها از رقیق‌کننده لیک (فروکتوز ۰/۸ گرم، پتاسیم‌سیترات ۰/۵ گرم، سدیم‌الکوتامات ۱/۹۲ گرم، پلی‌وینیل ۰/۳ گرم، منیزیم‌استات ۰/۰۷ گرم، لستین ۰/۱ گرم، گلیسرول ۱۱ درصد، آب دو بار تقطیر ۱۰۰ سی‌سی) با کمی تغییرات استفاده شد. پس از آماده‌سازی رقیق‌کننده، ۲ میلی‌لیتر از محلول را داخل ۷ لوله استریل ریخته و به هر لوله بر اساس گروه‌های آزمایشی، آنتی‌اکسیدان مورد نظر اضافه شد. گروه‌های آزمایشی عبارت بودند از:

گروه شاهد: رقیق‌کننده لیک^۱

تیمار ۱: رقیق‌کننده لیک + ۰/۱ نانومولار MitoQ + ۰/۵ میکرومولار پنتوکسی فیلین

تیمار ۲: رقیق‌کننده لیک + ۰/۱ نانومولار MitoQ + ۰/۷۵ میکرومولار پنتوکسی فیلین

تیمار ۳: رقیق‌کننده لیک + ۰/۱ نانومولار MitoQ + ۱ میکرومولار پنتوکسی فیلین

تیمار ۴: رقیق‌کننده لیک + ۰/۲ نانومولار MitoQ + ۰/۵ میکرومولار پنتوکسی فیلین

تیمار ۵: رقیق‌کننده لیک + ۰/۲ نانومولار MitoQ + ۰/۷۵ میکرومولار پنتوکسی فیلین

تیمار ۶: رقیق‌کننده لیک + ۰/۲ نانومولار MitoQ + ۱ میکرومولار پنتوکسی فیلین

مواد شیمیایی مورد استفاده در مطالعه حاضر از شرکت مرک و سیگما تهیه شدند. پس از مخلوط‌سازی آنتی-اکسیدان‌ها با رقیق‌کننده، نمونه اسپرم به نسبت ۱ به ۲۰ به داخل هر لوله اضافه شده و پس از بستن درب لوله‌ها به داخل یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. سپس در زمان‌های ۱، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مخلوط‌سازی، نمونه‌های مورد نظر، مورد ارزیابی قرار گرفتند. درصد اسپرم‌های متحرک و نیز با حرکت پیش‌رونده، اسپرم‌های زنده، درصد اسپرم‌های با غشاء سالم، در همه زمان‌ها اندازه گرفته شده و همچنین درصد خصوصیات مورفولوژیک اسپرم‌ها (اسپرم‌های سالم و

، افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش خود را اعمال می‌کند. آزمایش‌ها به وضوح نشان دادند که MitoQ انباشته شده در میتوکندری می‌تواند بعد از اکسید شدن توسط زنجیره الکترونی دوباره احیاء شده و سلول را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت نماید (اسکالچو و همکاران ۲۰۰۹). در این مطالعه برای اولین بار از ترکیبی از مخلوط دو آنتی‌اکسیدان هدفمند و غیرهدفمند در محیط رقیق‌کننده اسپرم خروس طی سردسازی استفاده شده است.

مواد روش‌ها

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

حیوانات و طراحی پژوهش

بدین منظور از ۱۵ خروس بالغ سویه راس با سن ۳۰ هفته استفاده شد. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی به ابعاد ۷۰×۷۰×۸۵ سانتی‌متر و تحت شرایط ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی قرار داشته که با جیره یکسان و به میزان ۱۵۰ گرم در روز برای هر خروس (دانه ذرت ۵۰/۸ درصد، دانه سویا ۸/۹۵ درصد، گندم ۲۰ درصد، سبوس گندم ۱۷ درصد، کلسیم‌فسفات ۰/۷۴ درصد، کربنات‌کلسیم ۰/۳۸ درصد، نمک ۰/۳۸ درصد، لایزین ۰/۰۸ درصد، میتونین ۰/۱۷ درصد و مکمل‌های ویتامینی و معدنی ۰/۵ درصد)، تغذیه شدند و خروس‌ها دسترسی آزاد به آب داشتند.

اسپرم‌گیری به روش مالش پشتی-شکمی انجام شد. خروس‌ها به مدت یک ماه عادت دهی شده و اسپرم‌گیری در هر هفته دو بار انجام گرفت. نمونه‌های اسپرم بلافاصله توسط فلاسک حاوی آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند (بوروس و کوئین ۱۹۳۷). پس از رسیدن نمونه‌ها به آزمایشگاه، ابتدا اسپرم‌ها از نظر حجم، غلظت، تحرک و ریخت‌شناسی بررسی شده و تنها نمونه‌هایی با حجم ۰/۲ تا ۰/۷ میلی-لیتر، تحرک بیش از ۸۰ درصد، اسپرم‌های با ظاهر سالم بیش از ۹۰ درصد و غلظت 3×10^6 در میلی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفتند. برای از بین بردن اثرات انفرادی،

غشای آسیب دیده شد. بدین صورت که دم اسپرم‌های سالم پس از مواجهه با این محیط متورم شده و به شکل پیچ خورده در می‌آید. به‌منظور انجام این آزمایش، ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم (در زمان‌ها ۱، ۲۴ و ۴۸ ساعت) با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول هایپواسمول فوق درون یک میکروتیوب مخلوط شده و بمدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ۵ میکرولیتر از محلول فوق بر روی یک لام قرار گرفته و درصد اسپرم‌های با دم متورم و پیچ خورده با شمارش ۲۰۰ اسپرم و بزرگنمایی $40\times$ با میکروسکوپ فازکنتراست تعیین شدند (ریول و مروود ۱۹۹۴).

ارزیابی ریخت شناسی

برای ارزیابی ریخت شناسی اسپرم از محلول هانکوک (Hankok) 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 $40\times$ درصد اسپرم‌های غیرطبیعی محاسبه شدند (هانکوک و همکاران، ۱۹۵۶).

لیپید پراکسیداسیون

بمنظور تعیین مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای اسپرم از تست TBARS^۲ استفاده شد. در این تست، مقدار مالون دی آلدئید به عنوان شاخصی از مقدار پراکسیداسیون لیپیدها از طریق واکنش با تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد. بدین منظور، ابتدا به منظور رسوب پروتئین‌ها ۱ میلی‌لیتر از محلول هر گروه تیماری بعد از ذوب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۲ میلی‌لیتر اسیدتری کلرواستیک در یک لوله استریل مخلوط کرده و سپس برای جلوگیری از وقوع پراکسیداسیون لیپیدی طی زمان انجام آزمایش، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول

ناسالم) و مقادیر مالون‌دی آلدئید نمونه‌ها (برای تعیین مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم) پس از ۴۸ ساعت نگهداری اسپرم‌ها، مورد سنجش قرار گرفتند.

تحرك اسپرم

برای ارزیابی پارامترهای تحرك کل و پیش‌رونده، ۵ میکرولیتر از نمونه منی را روی لام قرار داده شد و بعد از پوشاندن با لامل در زیر میکروسکوپ از هر نمونه حداقل ۱۰ فیلد به طور کاملاً تصادفی انتخاب شده و پارامترهای تحرك حداقل ۲۰۰ اسپرم بوسیله سیستم کامپیوتری ارزیابی اسپرم CASA, Video Test (Sperm 3.1, Russia) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

زنده‌مانی

برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ آمیزی حیاتی ائوزین-نیگروزین استفاده گردید. بدین منظور در همه زمان‌ها (۱، 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 شد. سپس توسط یک لام دیگر نمونه رنگ شده بر روی لام گسترش یافته و پس از خشک شدن، توسط میکروسکوپ Labomed LX400; labomed Inc., (Culver City, CA, USA) فازکنتراست با بزرگنمایی $40\times$ و شمارش ۲۰۰ اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده (رنگ نشده) و مرده (رنگ شده) تعیین شدند (ایوانز و مکس ول ۱۹۸۷).

سلامت غشاء پلاسمایی اسپرم

برای ارزیابی سلامت غشا اسپرم از آزمون هاست (HOST) استفاده شد (بالریکا و همکاران ۲۰۱۷). برای این منظور از محیط هایپواسموتیک هاست (۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات سدیم، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی اسمول) استفاده گردید. با توجه به اینکه فشار اسمزی مورد نیاز برای اسپرم خروس ۳۱۰ میلی اسمولار بوده، بنابر این قرارگرفتن در محیطی با فشار اسمزی کم تر (هایپو اسمول) می‌تواند باعث تمایز اسپرم‌های با غشای سالم از اسپرم‌هایی با

² Thiobarbituric acid reactive substances

اکسیداتیو می شود. همه اجزای سلولی شامل لیپیدها، پروتئین ها، اسیدنوکلئیک و قندها از اهداف احتمالی تنش اکسیداتیو هستند (لوکازویس و همکاران ۲۰۰۸). افزایش تولید رادیکال های آزاد و یا کاهش ظرفیت و فعالیت آنتی اکسیدانی سلول ها هر دو از عوامل اصلی به وجود آمدن تنش اکسیداتیو و آسیب های ناشی از آن می باشند. ترکیب لیپیدی غشای اسپرم خروس نقش تعیین کننده ای در کیفیت و نرخ باروری آن ایفا می کند (بلسبویز و همکاران ۲۰۱۱). اثرات استفاده از مخلوط آنتی اکسیدان های MitoQ و پنتوکسی فیلین بر فراسنجه های حرکت پیش رونده، تحرک کل، زنده ماندن و سلامت غشا در ساعت ۱ در جدول ۱ آورده شده است. نتایج به دست آمده از بررسی سطوح مختلف نشان می دهد تیمار ۱ باعث افزایش معنی دار درصد زنده ماندن نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.05$). همچنین افزودن همه تیمارها به منی طی فرآیند سردسازی باعث بهبود غیرمعنی دار پارامترهای حرکتی آنها شد که با نتایج کواکیک و همکاران (۲۰۰۶) در توافق بود که گزارش دادند افزودن ۱/۷۶ میلی مول پنتوکسی فیلین به مدت ۲۰ دقیقه به اسپرم، مقدار تحرک اسپرم را به طور قابل ملاحظه ای افزایش داد.

بررسی نتایج (جدول ۲) ۲۴ ساعت پس از سردسازی نشان می دهد که افزودن تیمار ۱ (۰/۱ نانومولار MitoQ + ۰/۵ میکرومولار پنتوکسی فیلین)، تیمار ۴ (۰/۲ نانومولار MitoQ + ۰/۵ میکرومولار پنتوکسی فیلین) و تیمار ۵ (۰/۲ نانومولار MitoQ + ۰/۷۵ میکرومولار پنتوکسی فیلین) در زمان ۲۴ ساعت باعث افزایش معنی دار حرکت پیش رونده اسپرم نسبت به گروه شاهد شد ($P < 0.05$). همچنین سطوح تیمار ۵ و ۶ باعث افزایش معنی دار تحرک کل نسبت به تیمار شاهد شد ($P < 0.05$). البته بقیه سطوح نیز افزایش غیرمعنی داری در تحرک کل داشتند. همچنین تیمار ۴ (۰/۲ نانومولار MitoQ + ۰/۵ میکرومولار پنتوکسی فیلین) باعث افزایش معنی دار تعداد اسپرم های با غشاء سالم در نمونه منی شد ($P < 0.05$).

هیدروکسی تولوئن بوتیل ه شده (BHT) دو درصد در اتانول) به همراه ۱ میلی لیتر EDTA به محلول مورد نظر افزوده شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور $\times g$ ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، ۱ میلی لیتر از محلول رویی را برداشته و با ۱ میلی لیتر از محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷ درصد در یک فالكون مخلوط کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در آب ۹۵ سانتی گراد قرار گرفتند. پس از سرد شدن نمونه ها، میزان جذب نور نمونه ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK اندازه گیری شدند (استربار و کیزمان ۱۹۹۰).

آنالیز آماری

مطالعه حاضر با ۷ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. داده های به دست آمده برای پارامترهای درصد تحرک کل، تحرک پیش رونده زنده ماندن، پاسخ به محلول HOST در همه زمان ها و داده های مربوط به تست هانکوک و سطح مالوندی-آلد هاید در ساعت ۴۸ بوسیله رویه GLM نرم افزار (۹.۳) SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آنالیز قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی استفاده شد. مدل آماری این طرح عبارت است از:

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

$$j = (1-5), i = (1-10)$$

$$Y_{ij} = \text{شاهده } ij \text{ ام}$$

$$\mu = \text{میانگین جمعیت}$$

$$T_i = \text{اثر تیمارها}$$

$$e_{ij} = \text{اثر عوام ناشناخته } ij \text{ ام}$$

نتایج و بحث

برای بهبود تلقیح مصنوعی در صنعت پرورش طیور، بهبود روش های ذخیره سازی کوتاه مدت اسپرم برای حفظ باروری به مدت ۶ تا ۲۴ ساعت در شرایط مزرعه، حیاتی است (زندیه و شرفی ۲۰۱۵). یکی از علل اصلی کاهش کیفیت اسپرم در نگهداری برون تنی، تنش اکسیداتیو است. زمانی که تولید ROS از ظرفیت آنتی-اکسیدانی پلاسمای منی بیشتر شود، باعث تنش

Table 1- Effect of used combined antioxidants MitiQ and pentoxifylline on total motility, progressive motility, viability and plasma membrane integrity one hour after chilling storage

Variable	Total motility%	Progressive motility%	Viability%	Plasma membrane integrity%
Control	90.75	71.50	95.79 ^b	80.19
Treatment 1	97.50	72.75	97.68 ^a	83.25
Treatment 2	92.25	73.00	96.54 ^{ab}	81.93
Treatment 3	92.00	72.50	96.41 ^{ab}	81.50
Treatment 4	92.00	75.00	96.84 ^{ab}	84.63
Treatment 5	92.25	76.75	97.53 ^{ab}	82.40
Treatment 6	93.00	73.00	97.08 ^{ab}	85.43
SEM	0.80	1.24	0.41	1.35

Treatment1: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 0.5μM; Treatment2: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 0.75μM; Treatment3: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 1μM; Treatment4: MitoQ 0.2nM+pentoxifylline 0.5μM; Treatment5: MitoQ 0.2nM+ pentoxifylline 0.75μM; Treatment6: MitoQ 0.2nM+pentoxifylline 0.1μM.

The values with different superscript letters in a column are significantly different (P<0.05)

Table 2- Effect of used combined antioxidants MitiQ and pentoxifylline on total motility, progressive motility, viability and plasma membrane integrity 24h after chilling storage

Variable	Total motility%	Progressive motility%	Viability%	Plasma membrane integrity%
Control	72/00 ^b	55/50 ^c	73/53 ^b	61.89 ^b
Treatment 1	75.75 ^{ab}	63.25 ^{ab}	78.73 ^{ab}	66.19 ^{ab}
Treatment 2	72.25 ^b	56.00 ^{bc}	74.12 ^{ab}	62.19 ^b
Treatment 3	75.00 ^{ab}	58.25 ^{abc}	76.07 ^{ab}	65.12 ^{ab}
Treatment 4	74.50 ^{ab}	65.25 ^a	79.98 ^{ab}	69.64 ^a
Treatment 5	77.25 ^a	64.75 ^a	79.35 ^a	66.49 ^{ab}
Treatment 6	77.25 ^a	59.00 ^{abc}	76.32 ^{ab}	65.18 ^{ab}
SEM	0.93	1.68	1.21	1.22

Treatment1: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 0.5μM; Treatment2: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 0.75μM; Treatment3: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 1μM; Treatment4: MitoQ 0.2nM+pentoxifylline 0.5μM; Treatment5: MitoQ 0.2nM+ pentoxifylline 0.75μM; Treatment6: MitoQ 0.2nM+pentoxifylline 0.1μM.

The values with different superscript letters in a column are significantly different (P<0.05)

و کارپیزس (۲۰۰۴). مکانیسم آنتی‌اکسیدان هدفمند MitoQ و تمام آنتی‌اکسیدان‌های هدفمند دیگر از طریق افزایش تولید ATP، کاهش تولید ROS و افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (اسکالچیو و همکاران ۲۰۰۹). مکانیسم‌های اثرگذار پنتوکسی‌فیلین بر وضعیت اسپرم عبارتند از: مهار فسفو دی استراز، افزایش تبدیل ATP به cAMP، تأثیر بر نقل و انتقال داخل سلولی کلسیم و از بین بردن رادیکال‌های آزاد ناشی از دژنراسیون و نکرز اسپرم‌ها خلاصه کرد (یاوچی و همکاران، ۱۹۹۳). پنتوکسی‌فیلین یک مهارکننده فسفودی استراز از گروه متیل گزانتین است که باعث مهار تجزیه cAMP می‌شود. در اسپرم، cAMP پروتئین کیناز را فعال می‌کند که وظیفه تنظیم فسفوریلاسیون پروتئین تیروزین را بر عهده دارد که یک مسیر تنظیمی مهم در تعدیل وقایع مرتبط با ظرفیت‌پذیری اسپرم است؛ این باعث می‌شود که

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که افزودن تیمار ۴ (۰/۲) نانومولار MitoQ + ۰/۵ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین) و تیمار ۵ (۰/۲) نانومولار MitoQ + ۰/۷۵ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین) به منی باعث افزایش معنی‌دار حرکت پیش‌رونده اسپرم‌ها در ۴۸ ساعت بعد از سردسازی شد (P<۰/۰۵). افزودن تیمار ۵ (۰/۲) نانومولار MitoQ + ۰/۷۵ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین) باعث افزایش تحرک کل نسبت به گروه کنترل شد (P<۰/۰۵). تیمار ۵ (۰/۲) نانومولار MitoQ + ۰/۷۵ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین) باعث افزایش درصد اسپرم‌های زنده نسبت به گروه کنترل شد (P<۰/۰۵). همچنین افزایش مقدار گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون چربی‌ها سبب اختلال در غشاء میتوکندری، کاهش میزان ATP و آسیب آکسونم اسپرم شده و در نهایت باعث کاهش حرکت پیش‌رونده اسپرم خواهد شد (بلسبوییس و همکاران ۱۹۹۹؛ سانوکا

پنتوکسیفیلین یک محرک قوی برای تحرک اسپرم می-باشد که با تحقیق ما همخوانی داشت (بانی هانی و ابوالحاجا ۲۰۱۶). در انسان، پنتوکسیفیلین بعنوان یک محرک جنبایی اسپرم استفاده می شود (برای تکنولوژی تولیدمثلی) که اثرات مثبتی در نرخ باروری دارد (هریمونت و سیفر ۲۰۱۵).

آکروزوم اسپرم سالم بوده و از هاپیراکتیوشدن آن جلوگیری شود (گاستی و همکاران ۲۰۱۷). در نتیجه در این تحقیق، افزودن پنتوکسیفیلین باعث تأثیر مثبت بر روی جنبایی اسپرم شد. در یک تحقیق نشان داده شد که

Table 3- Effect of used combined antioxidants MitiQ and pentoxifylline on total motility, progressive motility, viability and plasma membrane integrity 48h after chilling storage

Variable	Total motility%	Progressive motility%	Viability%	Plasma membrane integrity%
Control	59.25 ^b	48.5 ^b	60.58 ^b	53.23 ^c
Treatment 1	63.50 ^{ab}	52.25 ^{ab}	66.07 ^{ab}	61.45 ^{ab}
Treatment 2	60.00 ^{ab}	49.25 ^{ab}	61.88 ^{ab}	53.93 ^{cb}
Treatment 3	61.00 ^{ab}	50.75 ^{ab}	63.56 ^{ab}	53.82 ^{cb}
Treatment 4	61.25 ^{ab}	54.75 ^a	65.90 ^{ab}	65.12 ^a
Treatment 5	67.50 ^a	54.50 ^a	68.99 ^a	65.79 ^a
Treatment 6	64.75 ^{ab}	51.50 ^{ab}	66.72 ^{ab}	61.14 ^{ab}
SEM	1.57	1.29	1.67	1.69

Treatment1: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 0.5μM; Treatment2: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 0.75μM; Treatment3: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 1μM; Treatment4: MitoQ 0.2nM+pentoxifylline 0.5μM; Treatment5: MitoQ 0.2nM+ pentoxifylline 0.75μM; Treatment6: MitoQ 0.2nM+pentoxifylline 0.1μM.

The values with different superscript letters in a column are significantly different ($P < 0.05$)

نانومولار MitoQ + ۰/۷۵ میکرومولار پنتوکسیفیلین) و ۶ (۰/۲ نانومولار MitoQ + ۱ میکرومولار پنتوکسیفیلین) باعث کاهش معنی دار تعداد اسپرم های ناسالم در ۴۸ ساعت پس از سردسازی می شود ($P < 0.05$) (شکل ۱).

نتایج به دست آمده نشان می دهد افزودن تیمارهای ۱ (۰/۱ نانومولار MitoQ + ۰/۵ میکرومولار پنتوکسیفیلین)، ۳ (۰/۱ نانومولار MitoQ + ۱ میکرومولار پنتوکسیفیلین)، ۴ (۰/۲ نانومولار MitoQ + ۰/۵ میکرومولار پنتوکسیفیلین)، ۵ (۰/۲

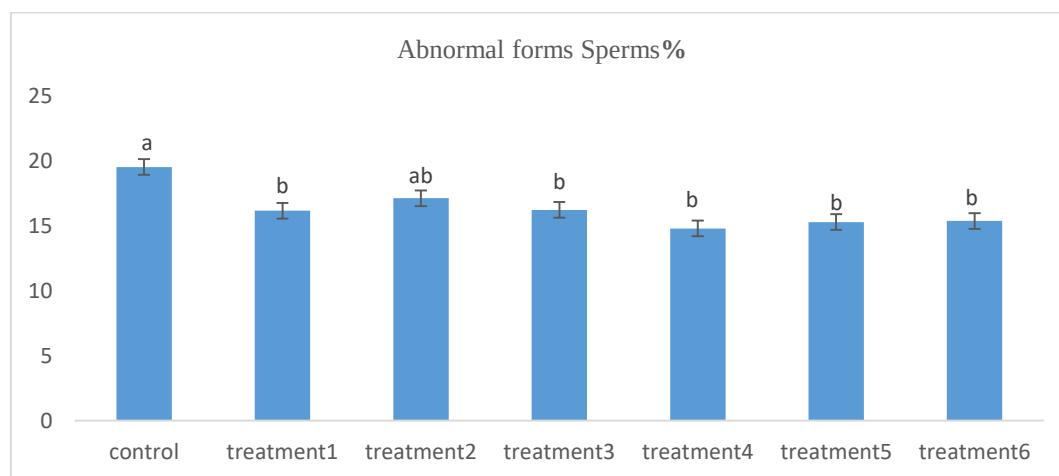


Figure 1-Effect of used combined antioxidants MitiQ and pentoxifylline on reducing of abnormal sperms 48h after chilling storage

Treatment1: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 0.5μM; Treatment2: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 0.75μM; Treatment3: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 1μM; Treatment4: MitoQ 0.2nM+pentoxifylline 0.5μM; Treatment5: MitoQ 0.2nM+ pentoxifylline 0.75μM; Treatment6: MitoQ 0.2nM+pentoxifylline 0.1μM.

باروری طی فرآیندهای نگهداری اسپرم می‌شود (سورای و همکاران ۱۹۹۸). این در حالیست که افزودن آنتی اکسیدانهای مناسب به محیط نگهداری اسپرم طیور می‌تواند تا حدی از شدت آسیبهای وارده به اسپرم کاسته و کیفیت اسپرم را طی فرآیندهایی نظیر سردسازی و انجماد افزایش دهد (میرزایی راد و همکاران ۲۰۱۵). تحقیقات نشان داده است که مالون دی آلدئید به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی، می‌تواند باعث تخریب کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها شود (ژانگ و همکاران ۲۰۱۹). تحت شرایط تسلط پراکسیدان‌ها بر آنتی اکسیدان‌ها، تعادل گلووتاتیون پراکسیداز بر گلووتاتیون، به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو مختل می‌شود (جونز ۲۰۰۲). ژانگ و همکاران (۲۰۱۹) در یک تحقیق نشان دادند که MitoQ بطور معنی‌داری باعث کاهش MDA و در نتیجه باعث افزایش نسبت گلووتاتیون پراکسیداز به گلووتاتیون شد که با تحقیق حاضر در توافق بود.

مقدار مالون‌دآلدئید به عنوان شاخصی از پراکسیداسیون غشای اسپرم‌ها در پایان آزمایش، در گروه تیمارهای ۴ (۰/۲ نانومولار MitoQ + ۰/۵ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین) و تیمار ۵ (۰/۲ نانومولار MitoQ + ۰/۷۵ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین) به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0.05$) (شکل ۲) که با نتایج سانکرسیلوا و همکاران (۲۰۱۸) در توافق بود. افزایش تولید رادیکالهای آزاد و یا کاهش ظرفیت فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها، هر دو از عوامل اصلی بوجود آمدن تنش اکسیداتیو و آسیب‌های ناشی از آن می‌باشند. ترکیب لیپیدی غشای اسپرم خروس نقش تعیین کننده‌ای در کیفیت و میزان باروری آن ایفا می‌کند (بلسبویز و همکاران ۲۰۱۱). اسپرم خروس نسبت به پستانداران دارای اسیده‌های چرب غیراشباع بیشتری در غشای خود بوده که این امر موجب افزایش حساسیت اسپرم خروس به پراکسیداسیون لیپیدها شده است (بلسبویز و همکاران ۱۹۹۳)؛ این امر سبب افزایش آسیب‌هایی نظیر کاهش زنده‌مانی، تحرک و قابلیت

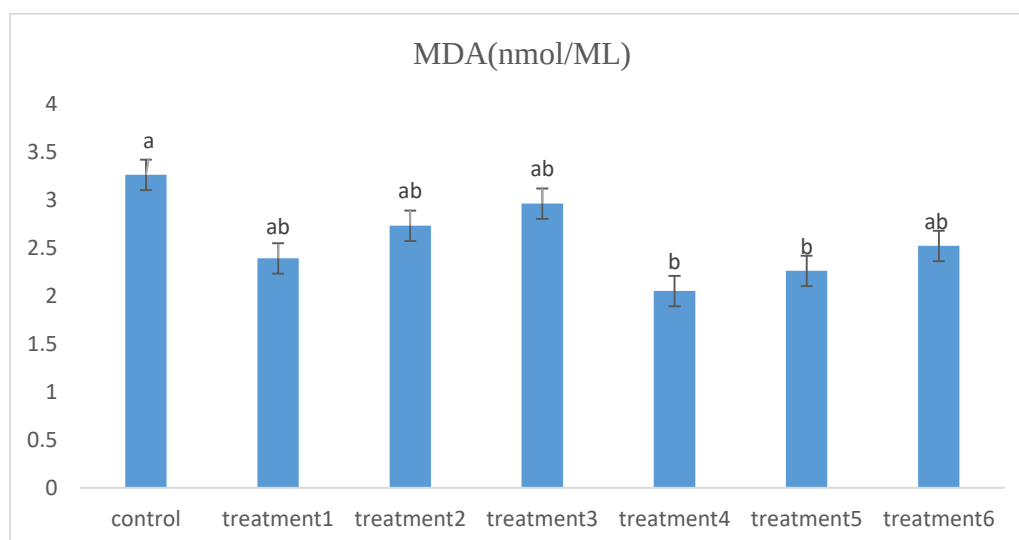


Figure 1-Effect of used combined antioxidants MitoQ and pentoxifylline on the amount of seminal plasma malondialdehyde 48h after chilling storage

Treatment1: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 0.5μM; Treatment2: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 0.75μM; Treatment3: MitoQ 0.1nM+pentoxifylline 1μM; Treatment4: MitoQ 0.2nM+pentoxifylline 0.5μM; Treatment5: MitoQ 0.2nM+ pentoxifylline 0.75μM; Treatment6: MitoQ 0.2nM+pentoxifylline 0.1μM.

همکاران ۱۳۹۶). سطوح زیاد ROS می‌تواند سبب آسیب DNA اسپرم شده و در نتیجه موجب کاهش زنده‌مانی اسپرم شود. همچنین تحرک اسپرم یکی از مهمترین

مطالعات مختلفی با استفاده از افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در رقیق‌کننده منی برای کاهش اثرات منفی پراکسیداسیون لیپیدی انجام شده است (خرم ابادی و

پارامترها در رابطه با انتقال در طول مجاری تناسلی ماده بوده و مرتبط با بارور کردن اووسیت ثانویه است. عملکرد میتوکندری به عنوان یک عامل احیا کننده تحرک اسپرم شناخته شده است و میتوکندری انرژی مورد نیاز برای تولید و انتشار امواج تازکی را فراهم می‌کند (ماکلود و کلد ۱۹۵۳). نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که اضافه کردن تیمار ۴ (۰/۲ نانومولار MitoQ + ۰/۵ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین) و تیمار ۵ (۰/۲ نانومولار MitoQ + ۰/۷۵ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین) باعث افزایش معنی‌دار حرکت پیش‌رونده نسبت به گروه کنترل در ساعات ۲۴ و ۴۸ پس از سردسازی شد.

نتیجه گیری: در مطالعه حاضر برای اولین بار پارامترهای مختلف مانند زنده‌مانی اسپرم‌ها، پراکسیداسیون چربی، ریخت شناسی، تحرک کل و تحرک پیش رونده اسپرم و یکپارچگی غشای پلاسمایی طی ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۴°C مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان دادند که استفاده ترکیبی از MitoQ و پنتوکسی‌فیلین در سطوح ۰/۲ نانومولار MitoQ و ۰/۵ میکرو مولار پنتوکسی‌فیلین سبب بهبود معنی‌دار پارامترهای عملکردی اسپرم‌های خروس طی سرد سازی شد.

منابع مورد استفاده

- Ahmadi H and Zamiri MJ, 2007. Effect of vitamins E and C on the kinetic and fertility of diluted native Fars rooster sperm at 4-5 °C. Second Iranian Congress of Animal and Aquatic Sciences 1479: 1-5.
- Akhter S, Rakha BA, Iqbal R and Ansari MS, 2014. Effect of bovine serum albumin on motility, plasmalemma, viability and chromatin integrity of buffalo bull spermatozoa. Pakistan Journal of Zoology 461:115-120.
- Balercia G, Gandini L, Lenzi A and Lombardo F, 2017. Antioxidants in Andrology. Springer International Publishing 1-82.
- Banihani SA and Abu-Alhayjaa RF, 2016. The activity of seminal creatine kinase is increased in the presence of pentoxifylline. Andrologia 48: 603-604.
- Blesbois E, 2011. Freezing avian semen. Avian biology research 4: 52-58.
- Blesbois E, Grasseau I and Hermier D, 1999. Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2-5°C. Theriogenology 52: 325-334.
- Blesbois E, Grasseau I and Blum J C, 1993. Effects of vitamin E on fowl semen storage at 4 °C. Theriogenology 39: 771-779.
- Burrows W and Quinn J, 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry sciences 16:19-24
- Chaudhry PS and Anand SR, 1975. Enzyme activities regulating adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate of buffalo, bull and goat spermatozoa. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 12: 290-297.
- Donoghue AM and Donoghue DJ, 1997. Effects of water-and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. Poultry Science, 76: 1440-1445.
- Esterbauer H and Cheeseman KH, 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol 186: 407-421.
- Esteves SC, Spaine DM and Cedenho AP, 2007. Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 40: 985-992.
- Evans G and Maxwell WMC, 1987. Handling and examination of semen. Salamon's artificial insemination of sheep and goats 20: 93-106.
- Fang u, Chenglian B, Yuanhong C, Jun D, Yang X, Xiaoping J, Changjiang H 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.

- Guasti PNGA, Monteiro RRD, Maziero MT, Carmo JA, Dell'Aqua Jr AM, Crespilho EA, Rifai F and Papa O, 2017. Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science* 179: 27-34.
- Hancock JL, 1956. The morphology of boar spermatozoa. *Journal of the Royal Microscopical Society* 76: 84-97.
- Herbement C and Sifer C, 2015. How to select the spermatozoon for intracytoplasmic sperm injection in 2015?. *Minerva Ginecologica* 67: 185-193.
- Jones DP, 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. In *Methods in enzymology* 348: 93-112
- KhoramAbadi F, Khodaei-Motlagh M and Moradi MH, 2017. Effect of in vitro selenium nanoparticles addition to the semen extender on the spermatozoa parameters after freezing in Farahani Ram 30(3): 301-307.
- Kovačić B, Vlasiavljević V and Reljić M, 2006. Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia. *Journal of Andrology* 27: 45-52.
- Leciewicz M, Strzeżek R, Majewska AM, Purpurowicz PS 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): 736-746
- Lewis SEM, McKinney, KA and Thompson W, 1994. Influence of pentoxifylline on human sperm motility in asthenozoospermic individuals using computer-assisted analysis. *Archives of Andrology* 32: 175-183.
- Liu L, Wang MJ, Yu TH, ChengZLi, M and Guo QW, 2016. Mitochondria targeted antioxidant mitoquinone protects post-thaw human sperm against oxidative stress injury. *Andrology* 22(3):205-215
- Łukaszewicz E, Jerysz A, Partyka A and Siudzińska A, 2008. Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. *Research in Veterinary Science* 85(3): 583-588.
- MacLeod J, and Gold RZ, 1953. The male factor in fertility and infertility. VI semen. Quality and certain other factors in relation to ease of conception. *Obstetrical and Gynecological Survey* 8(4): 604-606.
- Margaret Tarvis k, 2013. New methods for cryopreserving rooster spermatozoa. In partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science Colorado State University Fort Collins, Colorado.
- Mirzaei Rad H, Eslami M and GhanieA, 2015. Palmitoleate enhances quality of rooster semen during chilled storage. *Animal Reproduction Science* 165: 38-45.
- Pellegrini N, Simonetti P, Gardana C, Brenna O, Brighenti F, and Pietta P, 2000. Polyphenol content and total antioxidant activity of vini novelli (young red wines). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3): 732-735.
- Revell SG and Mrode RA, 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science* 36: 77-86.
- Sancler-Silva YF, Ball BA, Esteller-Vico A, Silva-Júnior ER, Freitas-Dell'aqua CP and Papa FO, 2018. Sperm quality of stallions treated with pentoxifylline after scrotal heat stress. *Journal of Equine Veterinary Science* 66: 87.
- Sanocka D and Kurpisz M, 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2: 1-7.
- Schäfer S, and Holzmann A, 2000. The use of transmigration and SpermacTM stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 59: 201-211.
- Seidler NW and Swislocki NI, 1992. The Effects of Pentoxifylline on the Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase in Age-Separated Rat and Human Erythrocytes. *The Journal of Clinical Pharmacology* 32: 332-337.
- Shahverdi A, Sharafi M, Gourabi H, Yekta AA, Esmaeili V, Sharbatoghli M, Janzamin E, Hajnasrollahi M, Mostafayi F, 2015. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology* 83: 78-85.
- Skulachev VP, Anisimov VN, AntonenkoYN, Bakeeva, LE, Chernyak, BV, Elichev, VP, Filenko, OF, Kalinina, NI, Kapelko, VI, Kolosova, NG, Kopnin, BP, Korshunova, GA, Lichinitser MR, Obukhova LA, Pasyukova EG, Pisarenko OI, Roginsky VA, Ruuge EK, Senin II, Severina II, Skulachev MV, Spivak IM,

- Tashlitsky N, Tkachuk VA, Vyssokikh MY and LSand Zorov DB, 2009. An attempt to prevent senescence: A mitochondrial approach. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787: 437–461.
- Smith RA. and Murphy MP, 2010. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201: 96-103.
- Smith RA, Porteous, CM, Coulter, CV and Murphy MP, 1999. Selective targeting of an antioxidant to mitochondria. *European Journal of Biochemistry* 263: 709-716.
- Surai PF, Cerolini S, Wishart GJ, Spake BK, Noble RC and Sparks NHC, 1998. Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Poult. Avian Biol* 9: 11-23.
- Yovich JL, 1993. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. *Human reproduction* 8: 1786-1791.
- Zhandi M and Sharafi M, 2015. Negative effect of combined cysteine and glutathione in soy lecithin-based extender on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and tissue banking* 16(3), 443-448.
- 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.
- Wang WH, Niwa K, and Okuda K, 1991. In-vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen–thawed ejaculated spermatozoa. *Reproduction and Fertility* 93: 491-496.

Determining the effect of combination of targeted MitoQ and non-targeted Pentoxifylline antioxidants in Lake based extender on improving functional quality of rooster sperm during refrigeration

M Nazari¹ and H Daghigh Kia^{2*}

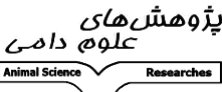
Received: January 27, 2020

Accepted: December 1, 2020

¹MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding Author: Email; daghighkia@tabrizu.ac.ir

 پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Researches	Journal of Animal Science/vol.30 No.3/ 2020/pp 71-83 https://animalscience.tabrizu.ac.ir	
© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/) DOI: 10.22034/AS.2020.11511		

Introduction: Refrigeration is a common method for the reduction of sperm metabolism to conserve the sperm quality during in-vitro storage. Numerous studies have attempted to optimize the quality of stored rooster semen for periods more than 24 h, but the obtained reproductive efficiency have not been satisfactory. Deleterious effects of chilling storage on the rooster sperm may cause a reduction in reproductive performance. It seems that improvement and enrichment of cooling storage methods are required in order to recover the highest quality of sperm before using in assisted reproductive technique (ART). Nonetheless, this process affects sperm function and quality by producing reactive oxygen species (ROS) and reducing antioxidant activity. The plasma membrane of sperm contains high amounts of unsaturated fatty acids prone to oxidation that would subsequently could reduce membrane integrity, decreasing its kinetic and fertility properties (Ahmadi and Zamiri 2007). The targeted antioxidant, MitoQ, exerts its antioxidant activity by increasing ATP production and reducing ROS production. Experiments have clearly shown that MitoQ accumulated in mitochondria can be restored after oxidation by the electron chain and protect the cell against oxidative stress (Skulachev et al 2009). On the one hand, MitoQ protects mitochondria from oxidative damage by protecting the mitochondrial membrane potential (Murphy and Smith, 2000). On the other hand, pentoxifylline conserves sperm function by other mechanisms: (1) inhibition of phosphodiesterase activity, (2) increasing in the conversion of ATP to cAMP, (3) regulating intracellular calcium transport and (4) scavenging free radicals, induced by spermatozoa, and decreasing oxidative activity (Esteves et al 2007).

Purpose: In this study, the effects of combined targeted and non-targeted antioxidants, MitoQ and pentoxifylline, on reduction of oxidative stress and improving rooster sperm quality were studied.

Material and methods: This study was carried out in the poultry unit of Tabriz University research station. For this purpose, 15 adult Ross breeds (30 weeks old) were used. The roosters were housed in individual cages 70×70×85 cm under 15 h light and 9 h dark conditions with the diet of 150 g per day for each rooster (50.8% corn, 8.95% soybean, 20% wheat, 14% wheat bran, 0.74% dicalcium phosphate, 1.8% limestone, 0.38% salt, 0.08% lysine, 0.17% methionine and 0.5% vitamin and mineral supplements) and ad-libitum water. Sperm collection was done by dorsal abdominal method. Sperm samples were transferred to the laboratory immediately after collection at 37°C. To eliminate individual differences and obtain sufficient sperm for analysis, in each replicate, the ejaculates of the 15 roosters were briefly inspected and ejaculates with $\geq 300 \times 10^6$ spermatozoa/mL, $\geq 90\%$ normal morphology and $\geq 80\%$ motility were then pooled. In this study, the combined antioxidant effects of

targeted MitoQ and non-targeted pentoxifylline antioxidants were evaluated in Lake extender based on lecithin. The treatments used in this experiment were: Treatment 1 (0.1 nm MitoQ +0.5 μ M Pentoxifylline), Treatment 2 (0.1 nm MitoQ +0.75 μ M Pentoxifylline), Treatment 3 (0.1 nm MitoQ + 1 μ M Pentoxifylline), Treatment 4 (0.2 nm MitoQ +0.5 μ M Pentoxifylline), Treatment 5 (0.2 nm MitoQ +0.75 μ M Pentoxifylline) and Treatment 6 (0.2 nm MitoQ +1 μ M Pentoxifylline). After diluting the samples and adding different levels of both antioxidants and cooling, the samples were stored in the refrigerator at 4°C for 48 hours. Samples were evaluated at different time points (1, 24 and 48 hours) for the selected sperm parameters (motility, viability, and plasma membrane integrity). Lipid peroxidation and percentage of sperms with normal morphology were evaluated at 48 hours.

Results and discussion: Accordign to our findings, treatment 1 increased sperm viability in the control group one hour after cooling ($P<0.05$). Treatments 1, 4 and 5 increased the progressive motility compared with the control group at 24 h after cooling ($P<0.05$). Treatments 4 increased this parameter 48 h after cooling ($P<0.05$). Treatment 4 and 5 significantly reduced malondialdehyde concentration at 48 h after cooling. Treatment 5 significantly increased viability and sperm with intact membrane integrity compared with control group ($P<0.05$). All treatments except for treatment 2 showed less unhealthy sperm compared with the control group ($P<0.05$). To improve artificial insemination in the poultry industry, improving short-term sperm storage methods is critical for maintaining fertility for 6 up to 24 hours under field conditions (Zhandi and sharafi 2016). Another main reason for loss of frozen sperm fertility, in addition to cold shock, is the occurrence of oxidative stress (Łukaszewicz et al 2008). Despite many advances in the field of sperm cryopreservation, this process has the potential to affect yield and function due to the introduction of mechanical and chemical damages (Wang et al., 1991), production of ROS, oxidative stress, and reduction of antioxidant activity (Ahmadi and Zamiri 2007). The freezing process leads to significant damage to the sperm subsequently resulting in the release of several compounds (e.g. cAMP) and loss of motility thus reducing the fertility of the specimen (Chaudhry et al., 1975). Due to the positive effect of targeted and non-targeted antioxidants on improving sperm motility parameters, this study was the first to use a combination of these antioxidants in semen cryopreservation.

Conclusion: The results of this study showed that the addition of treatment 5 (0.2 nm MitoQ +0.75 μ M Pentoxifylline) to the semen sample had the best performance during 48 h of refrigeration.

Keywords: Lipid peroxidation, Mitochondria, Pentoxifylline, Rooster sperm, Targeted antioxidants