اثر افزودن کریسین به رقیق‌کننده بلتسویل بر نگهداری اسپرم خروس در شرایط برون‌تنی

افشین سیفی، مهدی انصاری و مهدی ژندی*

ایران، کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، گروه علوم دامی

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

این مطالعه برای بررسی اثر افزودن کریسین در رقیق‌کننده منی بر ویژگی‌های کیفی اسپرم خروس در شرایط نگهداری برون‌تنی انجام شد. نمونه‌های منی از پنج قطعه خروس (سویه رأس ۳۰۸) در سن ۴۴ هفتگی جمع‌آوری شدند. پس از ارزیابی‌های اولیه (جنبایی بالای ۶۰ درصد) با یکدیگر مخلوط و به پنج قسمت مساوی تقسیم شده و هر قسمت با یکی از رقیق‌کننده‌های زیر رقیق شد: ۱) رقیق‌کننده شاهد منفی (بدون افزودنی)، ۲) رقیق‌کننده شاهد مثبت (حاوی ۴ درصد دی‌متیل سولفوکسید)، ۳) رقیق-کننده حاوی ۲۵ میکرومول کریسین (کریسین-۲۵) ، ۴) رقیق‌کننده حاوی ۵۰ میکرومول کریسین (کریسین-۵۰) و ۵) رقیق‌کننده حاوی ۷۵ میکرومول کریسین (کریسین-۷۵). فراسنجه‌های مختلف اسپرم شامل جنبایی کل و پیش‌رونده، یکپارچگی و فعالیت غشای پلاسمایی در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، ارزیابی شدند. براساس نتایج بدست آمده، سطوح مختلف کریسین نتوانست جنبایی کل و پیشرونده، یکپارچگی و فعالیت غشاء اسپرم‌ها طی نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد را تغییر دهد ($P>0/05$). همچنین، اثر زمان برای همه فراسنجه‌ها و اثر متقابل تیمار و زمان برای فعالیت غشاء پلاسمایی معنی‌دار بود. بنابراین، افزودن کریسین نتوانست اثرات منفی وابسته به زمان را طی نگه‌داری برون‌تنی اسپرم خروس تعدیل کند. به‌هرحال، به نظر می‌رسد برای تأیید این نتایج به مطالعات بیشتری نیاز است.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، کریسین، خروس، سردسازی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۶-۳۲۲۴۸۰۸۲، پست الکترونیکی:mzhandi@ut.ac.ir

مقدمه

در شرایط تلقیح مصنوعی، حفظ قابلیت زنده‌مانی و بارورسازی اسپرم در شرایط برون‌تنی به‌طور کوتاه یا بلندمدت اهمیت زیادی دارد. تلقیح مصنوعی در برخی از کشورهای غربی برای کمک به برخی سازمان‌ها برای حفظ نژادهای کمیاب و گونه‌های در حال انقراض توسعه‌یافته است (۷).

بسته به گونه، اسپرم تازه ممکن است در شرایط برون‌تنی و در دمای محیط بدون کاهش معنی‌دار در قابلیت بارورسازی به مدت ۵ تا ۱۵ دقیقه قابل نگهداری باشد. بااین‌وجود، حساسیت اسپرم تازه در برخی گونه‌ها بسیار بالا است. به همین دلیل از رقیق‌کننده‌های منی برای حفظ زنده‌مانی و پتانسیل بارورسازی اسپرم برای مدت کوتاهی پس از انزال استفاده می‌شود. بااین‌حال، به دلیل مطالعه ناکافی ذخیره درون‌تنی اسپرم در دستگاه تناسلی ماده، استفاده از ترکیبات حاضر در آنجا برای ساخت رقیق‌کننده میسر نبوده است (۱۶).

رقیق‌کننده‌های منی با حفظ شرایط ایزواسموتیک و pH تقریباً خنثی سبب پایداری فیزیکو-شیمیایی اسپرم طی ذخیره برون‌تنی می‌شوند. سوبستراهای ساده انرژی و همچنین آنتی‌اکسیدان‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها نیز ممکن است به رقیق‌کننده افزوده شود. استفاده از رقیق‌کننده نه‌تنها سبب کاهش اثر عوامل مضر (برای مثال مدفوع، ادرار) موجود در

پلاسمای منی می‌شود بلکه از حضور عناصر حفاظتی اطمینان حاصل می‌شود (۱۶).

دیگر جنبه ذخیره اسپرم در مدت‌زمان محدود (دمای بالاتر از صفر درجه سانتی‌گراد) نیاز به حفاظت از لیپیدهای غشای پلاسمایی در مقابل رادیکال‌های آزاد دارد. لیپیدها به‌عنوان مهم‌ترین اجزای غشای پلاسمایی اسپرم در فرایندهایی مانند بلوغ، ظرفیت‌پذیری و واکنش آکروزومی نقش دارند که سرانجام در باروری اسپرم تأثیر می‌گذارند (۱۲). از دیدگاه بیوشیمیایی، ترکیب لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم تفاوت معنی‌داری با غشای پلاسمایی سلول‌های سوماتیک دارد. فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم پرندگان از اسیدهای چرب غیراشباع n-۶ نظیر اسید آراشیدونیک و دوکوزاتترانوئیک تشکیل‌شده است. سطح بالای اسید چرب در غشای پلاسمایی اسپرم، آن‌ها را به پراکسیداسیون لیپیدی حساس می‌کند که این فرایند یکی از دلایل اصلی ناباروری در جنس نر می‌باشد. درنتیجه غشای پلاسمایی اسپرم باید توسط یک سامانه آنتی‌اکسیدانی بسیار کارآمد محافظت شود تا از آسیب اکسیداتیو طی ذخیره درون و برون‌تنی جلوگیری شود. گزارش‌هایی در ارتباط با پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم طیور طی ذخیره برون‌تنی گزارش‌شده است. در این راستا، بریک و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم خروس و بوقلمون در ساعت‌های اولیه ذخیره برون-تنی در دمای صفر و دمای بدن روی می‌دهد (۸). تشکیل پراکسیدها در نگهداری برون‌تنی اسپرم با تغییراتی در جنبایی، توانایی ادغام اسپرم–اووسیت و کاهش باروری همراه است (۶). در پرندگان گزارش‌شده است که تولید مالون‌دی‌آلدهید صرف‌نظر از تغییر در جنبایی، همبستگی بالایی با کاهش شدید باروری دارد (۲۰). براین اساس یک سامانه دفاعی سه لایه شامل سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و پروتئین‌های متصل شونده به فلز، به‌عنوان نخستین سطح مسئول جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد مطرح شده است. همچنین سطح دوم شامل آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی (ویتامین A، ویتامین C، ویتامین E، اسید اوریک، گلوتاتیون و کارتنوئیدها) است که همراه با گلوتاتیون پراکسیداز مانع از تشکیل و گسترش پراکسیدازها می‌شوند. سطح سوم بر پایه مشارکت چندین آنزیم (فسفاتازها، پروتئازها، ترانسفرازها) مسئول‌ترمیم و حذف مولکول‌های آسیب‌دیده در غشاهای سلولی است (۸). باوجود سازوکارهای دفاعی بسیار سازمان‌یافته علیه پراکسیداسیون چربی‌ها، سامانه آنتی‌اکسیدانی حاضر در اسپرماتوزوای طیور قادر به جلوگیری کامل از اثرات منفی پراکسیداسیون لیپیدی طی نگهداری برون‌تنی نیست، بنابراین استفاده از یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی در نگهداری برون‌تنی اسپرم طیور ضروری به نظر می‌رسد.

فلاونوئیدها ساختار کلی ۱۵ کربنی دارند که دارای دو حلقه فنیل (A و B) و یک حلقه هتروسیکلیک (C) ترکیبات پلی‌فنلی هستند که در عسل، میوه‌ها و بسیاری از گیاهان یافت می‌شوند (۱۷). کریسین، با اسم شیمیایی ۵ و ۷–دی‌هیدروکسی فلاون عضوی از این ابر خانواده است. اثرات حفاظتی در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو و آپوپتوز همراه با فعالیت‌های استروئیدوژنیک و مهار آروماتاز (۱۴)، کریسین را به گزینه مناسبی برای مطالعه اثر آن برسلول‌های جنسی تبدیل کرده است. گزارش‌شده است که تیمار با کریسین خوراکی سبب افزایش شمار اسپرم موش‌های صحرایی شده و هنگامی‌که این موش‌ها با ماده‌های فحل آمیزش کردند، نرخ باروری و بچه‌زایی بالاتری نشان دادند (۱۰). در پژوهشی دیگر سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون پس از تجویز کریسین بهبود یافت (۹).

باتوجه به اثرات گسترده فارماکولوژیکی کریسین و نبود مطالعه‌ای برای بررسی اثر آن بر اسپرم خروس طی فرایند سردسازی، هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر کریسین

بر برخی فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس طی نگهداری در شرایط سردسازی می‌باشد.

مواد و روشها

اختصاص تیمارها: این آزمایش برروی پنج قطعه خروس مادر گوشتی سویه رأس ۳۰۸ با میانگین وزنی ۴۹۰۶/۲۵±۶۹/۸۳ گرم و سن ۴۰ هفته انجام شد. خروس-ها در داخل قفس‌های انفرادی (با ابعاد ۱×۱/۲×۱/۲ متر) با برنامه نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی و دمای ۲۱ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. جیره پایه براساس توصیه مغایر مواد مغذی در کتابچه راهنمای شرکت "رأس ۳۰۸" (۲۰۱۳) تنظیم شد و آنالیز مواد خوراکی براساس جدول آنالیز مواد خوراکی NRC (۱۹۹۴) و با استفاده از نرم‌افزار جیره نویسی UFFDA انجام گرفت (۱۲ درصد پروتئین خام، ۲۷۵۰ کیلوکالری در کیلوگرم جیره انرژی قابل متابولیسم، کلسیم ۰/۷ درصد و فسفر ۰/۳۵ درصد). باتوجه به اینکه کریسین در آب نامحلول است بنابراین از DMSO به‌عنوان حلال کریسین استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل شاهد منفی (رقیق-کننده بلتسویل)، شاهد مثبت (رقیق‌کننده بلتسویل + ۴ درصد حجمی DMSO)، کریسین-۲۵ (رقیق‌کننده بلتسویل + ۲۵ میکرومول کریسین)، کریسین-۵۰ (رقیق‌کننده بلتسویل + ۵۰ میکرومول کریسین) و کریسین-۷۵ (رقیق-کننده بلتسویل + ۷۵ میکرومول کریسین) بود. فراسنجه‌های اسپرم شامل جنبایی کل و پیش‌رونده، فعالیت و یکپارگی غشای پلاسمایی در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از نگه‌داری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد.

ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم

جنبایی کل و پیش‌رونده: برای تعیین فراسنجه‌های جنبایی و جنبایی پیش‌رونده، یک قطره از منی رقیق‌سازی شده با سدیم سیترات ۲/۹ درصد (نسبت ۱ به ۱۰۰) روی لام گذاشته شد. برای جلوگیری از شوک سرمایی به اسپرم، محلول سیترات سدیم در حمام آب گرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده‌شده بود. جنبایی و جنبایی پیش-رونده با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed Inc., USA) با بزرگنمایی ۴۰۰× و به شیوه چشمی تعیین گردید (۴).

یکپارچگی غشای پلاسمایی: برای شناسایی اسپرم‌های زنده از مرده، از رنگ‌آمیزی حیاتی استفاده شد. برای این منظور یک قطره از مایع منی رقیق‌شده را روی لام قرارداده و سپس با یک قطره کوچک ائوزین- نیگروزین مخلوط گردید. پس‌ازآن گسترش تهیه‌شده با میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed Inc., USA) و بزرگنمایی ۴۰۰× بررسی شد. در این روش اسپرم‌های مرده به دلیل نقص در غشاء، رنگ را جذب کرده و قرمز می‌شوند درحالیکه اسپرم‌های زنده، رنگ را به خود نمی‌گیرند. برای هر تیمار تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش‌شده و درصد اسپرم‌های زنده و مرده مشخص شد (۱۳).

فعالیت غشای پلاسمایی: برای تعیین فعالیت غشای پلاسمایی از آزمون تورم هایپواسموتیک (Hypo-Osmotic Swelling Test) استفاده گردید (۱۱). برای انجام این تست، ۱۰ میکرولیتر از منی با ۴۰۰ میکرولیتر محلول هایپواسموتیک (۱۰۰ mOsm/kg) مخلوط گردید. سپس نمونه حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد انکوبه شد. درصد اسپرم‌های بادم و ناحیه میانی پیچ-خورده با شمارش ۲۰۰ اسپرم در بزرگنمایی ۴۰۰× تعیین گردید (۱۹).

آنالیز آماری: آزمایش حاضر در پنج تیمار و پنج تکرار (در ساعات مختلف) انجام شد. داده‌ها بااستفاده از طرح اندازه-گیری‌های تکرارشونده و با رویه MIXED تجزیه تحلیل شدند (SAS, 2003). مقایسه میانگین با LSmeans برای آزمون توکی و در سطح آماری ۵ ٪ انجام گرفت. معادله مدل آماری به‌قرار زیر بود:

$$Y_{ijk} = \mu+T_i+W_j+t_k+(T*t)_{ik}+e_{ijkl}$$

اثرات متقابل تیمار×زمان=$(T*t)_{ik}$

صفت موردمطالعه=Y_{ijklm}

اثر تصادفی تکرار آزمایش=W_j تیمار=T_i

اثر باقیمانده=e_{ijk} زمان=t_k

نتایج

اثرات تیمار، زمان و برهم‌کنش آن‌ها بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل جنبایی کل و پیش‌رونده، یکپارچگی و فعالیت غشای پلاسمایی در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهند که صفات مورد بررسی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر زمان قرارگرفتند (P<۰/۰۵). اما تیمارهای آزمایشی هیچ تفاوت معنی‌داری ازنظر جنبایی کل، جنبایی پیش-رونده، یکپارچگی و فعالیت غشای پلاسمایی نداشتند (P>۰/۰۵).

جدول ۱- فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس طی نگهداری برون تنی در رقیق‌کننده بلتسویل همراه با غلظت‌های متفاوت کریسین (Lsmeans ±SE).

صفات (درصد)	تیمارهای آزمایشی▪					P value		
	شاهد منفی	شاهد مثبت	کریسین-۲۵	کریسین-۵۰	کریسین-۷۵	تیمار	زمان	تیمار×زمان
جنبایی کل	۵۴/۲۱±۴/۵۳	۵۲/۰۱±۴/۶۳	۵۹/۰۱±۴/۱۹	۵۷/۴۳±۳/۶۹	۵۷/۲۸±۳/۶۲	۰/۳۲	<۰/۰۰۱	۰/۹۹
جنبایی پیش‌رونده	۳۵/۹۷±۳/۲۹	۳۲/۱۸±۴/۰۸	۴۳/۲±۳/۲۹	۴۰/۱۸±۴/۱۸	۳۴/۴۱±۲/۹۱	۰/۶۱	<۰/۰۰۱	۰/۴۳
یکپارچگی غشای پلاسمایی	۶۱/۲۳±۵/۰۹	۶۲/۴۸±۴/۵۸	۵۹/۷۱±۳/۸۹	۶۳/۸۲±۳/۶۸	۶۱/۴۱±۴/۰۳	۰/۴۳	<۰/۰۰۱	۰/۹۶
فعالیت غشای پلاسمایی	۵۸/۰۷±۳/۷۶	۵۰/۷۸±۵/۴۵	۵۸/۳۸±۳/۷۶	۵۸/۱۵±۳/۷۷	۵۷/۴۵±۳/۳۸	۰/۲۲	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۳

▪ تیمارها شامل کنترل منفی (رقیق‌کننده بلتسویل)، کنترل مثبت (رقیق‌کننده بلتسویل + ۴ درصد حجمی دی‌متیل‌سولفواکسید)، کریسین-۲۵، کریسین-۵۰، کریسین-۷۵ (رقیق‌کننده بلتسویل + ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرومول کریسین، به ترتیب).

a و b: در هر ردیف میانگین‌های با حروف غیرمشترک در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار دارند.

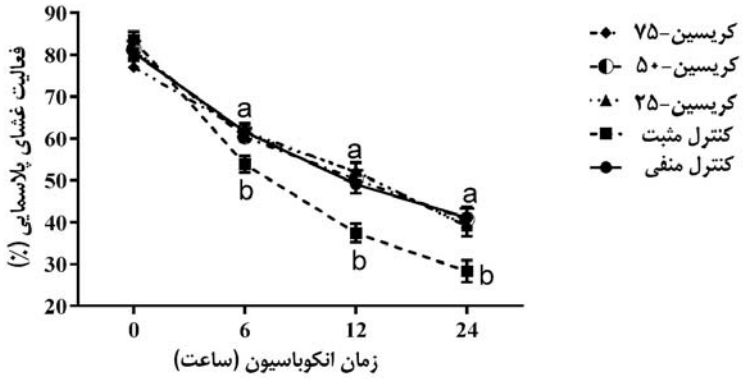
اثر زمان سردسازی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش زمان نگه‌داری میزان همه فراسنجه‌های کیفی اسپرم کاهش می‌یابد (P<۰/۰۱). یکپارچگی غشای پلاسمایی در زمان صفر بازمان ۱۲ ساعت تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵).

جدول ۲- تأثیر مستقل زمان‌های مختلف سردسازی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس طی نگهداری برون تنی در رقیق‌کننده بلتسویل (Lsmeans±SE).

صفات (درصد)	زمان▪ (ساعت)				P value
	صفر	۶	۱۲	۲۴	
جنبایی کل	۷۱/۰۶±۳/۸۶^{a}	۵۷/۰۶±۲/۴۳^{b}	۵۳/۱۷±۱/۶۷^{b}	۴۱/۵۹±۲/۹۲^{c}	۰/۰۰۱
جنبایی پیش‌رونده	۵۲/۲۰±۳/۱۱^{a}	۴۰/۸۰±۲/۲۱^{b}	۳۰/۳۳±۱/۷۸^{c}	۲۵/۴۷±۱/۳۶^{d}	۰/۰۰۱
یکپارچگی غشای پلاسمایی	۷۴/۴۷±۴/۰۶^{a}	۷۱/۳۶±۲/۰۲^{a}	۵۶/۸۶±۱/۵۷^{b}	۴۴/۲۳±۱/۸۰^{c}	۰/۰۰۱
فعالیت غشای پلاسمایی	۶۹/۸±۰/۷۲^{a}	۵۹/۷۵±۱/۲۳^{b}	۴۸/۱۸±۱/۵۵^{c}	۳۷/۶۶±۱/۳۶^{d}	۰/۰۰۱

▪ a، b، c و d: در هر ردیف میانگین‌های با حروف غیرمشترک در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار دارند.

اثر سطوح مختلف کریسین در زمان‌های مختلف برفعالیت غشای پلاسمایی اسپرم در نمودار۱ آورده شده است. براساس این نتایج، کاهشی در درصد اسپرم‌های با غشای فعال در طول زمان در گروه‌های تیماری مشاهده شد. این کاهش در گروه کنترل مثبت نسبت به سایر گروه‌ها شدیدتر و اختلاف آن با دیگر گروه‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۱).



نمودار ۱- درصد اسپرم‌های دارای غشای پلاسمایی فعال طی زمان‌های مختلف انکوباسیون در محیط پایه رقیق‌کننده بلتسویل به‌اضافه غلظت‌های مختلف کریسین. تیمارهای آزمایشی شامل کنترل منفی (رقیق‌کننده بلتسویل)، کنترل مثبت (رقیق‌کننده بلتسویل + ۴ درصد حجمی دی‌متیل-سولفواکسید)، کریسین-۲۵، کریسین-۵۰، کریسین-۷۵ (رقیق‌کننده بلتسویل + ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرومول کریسین، به ترتیب).

بحث

بهبود روش‌های ذخیره کوتاه‌مدت اسپرم طیور برای حفظ باروری به مدت ۶ تا ۲۴ ساعت در شرایط مزرعه برای توسعه تلقیح مصنوعی در طیور موردنیاز است. یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش کیفیت اسپرم در نگه‌داری برون‌تنی، تنش اکسیداتیو است (۶). تنش اکسیداتیو شرایط مربوط به افزایش آسیب سلولی براثر اکسیدان‌های مشتق از اکسیژن (ROS) است. زمانی که تولید ROS از ظرفیت آنتی-اکسیدانی پلاسمای منی فراتر رود، منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود. گزارش‌شده است که همه اجزای سلولی شامل لیپیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلوئیک و قندها از اهداف احتمالی تنش اکسیداتیو هستند (۳). از طرفی دیگر، یکی از اصلی‌ترین پیامدهای رایج تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدها است. باتوجه به اینکه غشای پلاسمایی اسپرم سرشار از لیپیدهای اشباع و غیراشباع می‌باشد، پراکسیداسیون لیپیدی باعث از بین رفتن ساختار غشای پلاسمایی شده و درنتیجه میزان زنده‌مانی و جنبایی اسپرم را کاهش می‌دهد. مطالعات مختلفی بااستفاده از افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در رقیق‌کننده منی برای کاهش اثرات منفی پراکسیداسیون لیپیدی انجام‌شده است (۱و ۲). ازجمله ترکیباتی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند، فلاوونوئیدها می‌باشند. آنها ترکیباتی هستند که از طریق سازوکارهای مختلف از لیپیدها در برابر آسیب اکسیداتیو حفاظت می‌کنند (۱۸) که شامل ۱) مهار تشکیل ROS با مهار آنزیم‌ها یا از طریق به دام انداختن ریز عناصر درگیر در تشکیل رادیکال‌های آزاد. ۲) حذف ROS و ۳) حفاظت از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی با افزایش میزان آن‌ها. در پژوهش حاضر، اثر افزودن کریسین به‌عنوان عضوی شناخته‌شده از خانواده فلاونوئیدها، به رقیق‌کننده بلتسویل بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس طی نگه‌داری در شرایط سردسازی بررسی شد. کریسین، اثر معنی‌داری بر فراسنجه‌های کیفی موردبررسی دراین آزمایش نداشت. سازوکار اصلی این نتایج را به‌سختی می‌توان پاسخ داد ولی به نظر می‌رسد کریسین از طریق سازوکارهای متفاوتی در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی عمل می‌نماید. اثر محرک آن در بهبود فراسنجه‌های اسپرم (۸و ۹) و کاهش تنش اکسیداتیو و آپوپتوز در تجویز خوراکی آن مشاهده‌شده است (۱۴). برخلاف نتایج پژوهش حاضر، الطواش و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که تجویز خوراکی کریسین باعث بهبود جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم و باروری خروس‌ها شد (۵). اما، مطابق بااین نتایج در پژوهشی دیگر افزودن کریسین به محیط کشت لاین سلولی آستروگلیا سبب

کاهش بیش از ۵۰ درصدی زنده‌مانی شده است (۱۵). کاهش فعالیت غشای پلاسمایی تیمار شاهد مثبت در پژوهش پیش‌رو احتمالاً به اثرات منفی دی‌متیل سولفوکسید که به‌عنوان حلالی برای کریسین استفاده‌شده است برمی‌گردد. اثری که در مورد سایر فراسنجه‌ها دیده نشد. دی‌متیل‌سولفوکسید به‌عنوان سرما محافظ و نیز در نقش حلال برای برخی مواد شیمیایی کاربرد دارد و توانایی نفوذ آن از غشای پلاسمایی به‌خوبی در پژوهش‌های قبلی گزارش‌شده است. بررسی اثر افزودن آن بر محیط برون تنی اسپرم خوک نشان داده است که باوجود افزایش دو برابری ناپایداری کروماتین در غلظت‌های پایین دی‌متیل-سولفوکسید، جنبایی اسپرم تغییر معنی‌داری نداشت (۱۳).

نتیجه‌گیری

دراین مطالعه افزودن کریسین به رقیق‌کننده بلتسویل نتوانست مانع از کاهش کیفیت اسپرم خروس طی نگه‌داری در دمای پایین شود. از دلایل احتمالی برای عدم مشاهده اثر معنی‌دار سازوکار متفاوت اثر در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی است، اما برای تأیید نتایج این آزمایش نیاز به پژوهش‌های بیشتری است.

منابع

۱- نارنجی ثانی، ر.، ۱۳۹۵. اثر ویتامین سی و گلیسرول بر مشخصات پس از ذوب منی قوچ سنگسری، مجله پژوهشهای جانوری، جلد ۲۹، شماره ۳، صفحات ۳۶۰-۳۶۸.

۲- خرم‌آبادی، ف.، خدایی مطلق، م.، و مرادی، م. ح.، ۱۳۹۶. اثر افزودن نانوذرات سلنیوم در محیط رقیق‌کننده منی در آزمایشگاه بر فراسنجه‌های اسپرم پس از انجماد قوچ فراهانی. مجله پژوهشهای جانوری، جلد ۳۰، شماره ۳، صفحات ۳۱۲-۳۲۲.

3- Agarwal, A., Makker, K., and Sharma, R., 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. American Journal of Reproductive Immunology, 59(1), PP: 2-11.

4- Akhlaghi, A., Jafari Ahangari, Y., Zhandi, M., and Peebles, E. D., 2014. Reproductive performance, semen quality, and fatty acid profile of spermatozoa in senescent broiler breeder roosters as enhanced by the long-term feeding of dried apple pomace. Animal Reproduction Science, 147(1–2), PP: 64-73.

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

6- 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), PP:443-448.

7- Blesbois, E., and Brillard, J. P., 2007. Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. Animal, 1(10), PP: 1472-1481.

8- Breque, C., Surai, P., and Brillard, J. P., 2003. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. Molecular Reproduction and Development, 66(3), PP: 314-323.

9- Ciftci, O., Ozdemir, I., Aydin, M., and Beytur, A., 2012. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. Andrologia, 44(3), PP: 181-186.

10- Dhawan, K., Kumar, S., and Sharma, A., 2002. Beneficial effects of chrysin and benzoflavone on virility in 2-year-old male rats. Journal of Medicinal Food, 5(1), PP: 43-48.

11- Jeyendran, R., Van der Ven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B., and Zaneveld, L., 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. Journal of Reproduction and Fertility, 70(1), PP: 219-228.

12- Kelso, K. A., Cerolini, S., Noble, R. C., Sparks, N. H. C., and Speake, B. K., 1996. Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. Journal of Reproduction and Fertility, 106(2), PP: 201-206.

13- Lukaszewicz, E., Jerysz, A., Partyka, A., and Siudzinska, A., 2008. Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. Research in Veterinary Science, 85(3), PP: 583-588.

14- Mantawy, E. M., El-Bakly, W. M., Esmat, A., Badr, A. M., and El-Demerdash, E., 2014. Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of

oxidative stress, inflammation and apoptosis. European Journal of Pharmacology, 728, PP: 107-118.

15- Markiewicz-Zukowska, R., Car, H., Naliwajko, S. K., Sawicka, D., Szynaka, B., Chyczewski, L., and Borawska, M. H., 2012. Ethanolic extract of propolis, chrysin ,CAPE inhibit human astroglia cells. Advances in Medical Sciences, 57(2), PP: 208-216.

16- Nabi, M. M., Kohram, H., Zhandi, M., Mehrabani-Yeganeh, H., Sharideh, H., Zare-Shahaneh, A., and Esmaili, V., 2016. Comparative evaluation of Nabi and Beltsville extenders for cryopreservation of rooster semen. Cryobiology, 72(1), PP: 47-52.

17- Nijveldt, R. J., Van Nood, E., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., and Van Leeuwen, P. A., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. American Journal of Clinical Nutrition, 74(4), PP: 418-425 .

18- Pandey, A. K., and Kumar, S., 2012. Antioxidant, lipo-protective and antibacterial activities of phytoconstituents present in Solanum xanthocarpum root. International Review of Biophysical Chemistry, 3(3), PP: 42-47 .

19- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Coloma, M. A., Gomez-Brunet, A., Toledano-Diaz, A., Lopez-Sebastian, A., and Campo, J. L., 2009. Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. Poultry Science, 88(12), PP: 2661-2669.

20- Wishart, G., 1984. Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility , ATP content and fertilizing ability. Journal of Reproduction and Fertility, 71(1), PP: 113-118 .

The effect of Chrysin inclusion to Beltsville extender on cooling storage of rooster sperm

Seifi A., Ansari M. and Zhandi M.

Animal Science Dept., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of Chrysin inclusion to semen extender on rooster sperm quality during in vitro storage. Semen samples were collected from five 44-week-old male broiler breeders (ROS 308). After primary evaluation (motility >60%), semen samples were pooled and divided into five equal part and each part was diluted with one of the following extenders: 1) control negative extender (without any additive), 2) control positive extender (with 4% DMSO), 3) extender containing 25 µg of Chrysin (Chrysin-25), 4) extender containing 50 µg of Chrysin (Chrysin-50) and 5) extender containing 75 µg of Chrysin (Chrysin-75). Semen quality parameters including total and forward motility, plasma membrane integrity and functionality were assessed in 0, 6, 12 and 24 hours after preservation at 4°C. Based on obtained results, different levels of Chrysin failed to alter total and forward motility, plasma membrane integrity and functionality of spermatozoa during preservation period at 4°C ($p \geq 0.05$). Also, the effect of time in all parameters and the effect of time and treatment interaction in sperm plasma membrane functionality were significant. Therefore, Chrysin inclusion failed to ameliorate the negative time-dependent detrimental effects on rooster sperm quality. However, further research is needed to confirm obtained results.

Key words: Chrysin, rooster, sperm, storage