نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۳، تابستان ۱۳۹۸
ص‌ص: ۳~۱۶

مهار تولید ROS از طریق افزودن آنتی‌اکسیدان هدفمند ۲-۴ دی‌نیتروفنول و تاثیر آن بر عملکرد اسپرم منجمد-یخ‌گشایی خروس

- **ناهید محمدی**
دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی، فیزیولوژی دام دانشگاه تبریز
- **حسین دقیق‌کیا** (نویسنده مسئول)
- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت : فروردین ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش : تیر ۱۳۹۷

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۰۸۹۴۳۱
Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.121379.1674

چکیده

میتوکندری‌ها مهمترین منبع تولید کننده ROS بوده و ویژگی‌های منحصر به فرد میتوکندری مانع از ورود آنتی‌اکسیدان‌ها به آن می‌شود. لذا، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی که بتوانند از غشای میتوکندری عبور کرده و ROSهای این قسمت را مهار نمایند، می‌تواند راهکار مناسبی در کاهش آسیب‌های ناشی از ROS و بهبود کیفیت اسپرم و باروری باشد. هدف از پژوهش حاضر استفاده از ترکیبات جفت‌جدا کن[1] میتوکندری به منظور کاهش صدمات ناشی از ROS و افزایش زنده‌مانی اسپرم بعد از یخ‌گشایی می‌باشد. استحصال منی با استفاده از روش مالش پشتی- شکمی از ۱۴ خروس نژاد راس با ۲۸ هفته سن انجام گرفت. بعد از ارزیابی اولیه، نمونه های منی با هم مخلوط و پس از رقیق‌سازی و افزودن ۲-۴-دی‌نیتروفنول (DNP) در پنج سطح (۰، ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۰/۷۵، ۱ نانومولار)، سردسازی شده و متعاقباً منجمد شدند. پس از دو ماه، نمونه‌های منی یخ‌گشایی شده از نظر درصد اسپرم‌های مرده و زنده، فراسنجه‌های حرکتی اسپرم، یکپارچگی‌غشای اسپرم و میزان لیپید پراکسیداسیون و مورفولوژی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن DNP در سطح ۰/۷۵ نانومولار سبب بهبود تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، اسپرم سالم، همچنین کاهش معنی‌دار غلظت MDA نسبت به گروه شاهد شد ($p<0/05$).

واژه‌های کلیدی: میتوکندری، جفت‌جداکن‌های میتوکندری، گونه‌های فعال اکسیژن

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 123 pp: 3-16

Effect of 2, 4-Dinitrophenol on reactive oxygen species production in mitochondria and improvement of sperm viability after freeze-thawing process of Rooster semen

By: Nahid Mohammadi[1], Hossein Daghigh Kia[2]*
1M.sc. Graduate student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
2Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.

Received: April 2018 **Accepted: July 2018**

Regarding the role of mitochondria in the quality of sperm motility and fertility, protection of mitochondrial function against Reactive Oxygen Species (ROS)-induced damage can be an important step in improving roster sperm fertility. The mitochondria are the most important source of ROS and the unique properties of mitochondria prevent antioxidants from entering, which results in poor antioxidant performance in protecting ROS-induced damage. Therefore, the use of antioxidants that can pass through the mitochondrial membrane and inhibit ROS in this region can be a good way to reduce the damage caused by ROS and improve the quality of sperm and thus improve fertility. The aim of the present study was to use mitochondrial mild uncoupling combinations to reduce the risk of ROS-induced injuries and increase the survival of sperm after freeze-thawing. For this purpose, 14 Ross breed rooster with 28 weeks of age were used. The semen was taken by massaging the abdomen-back procedure. After initial evaluation, semen samples were pooled After dilution of semen samples and addition of 2-4-dinitrophenol (DNP) at five levels (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 nM), they were cooled and then frozen. After two months, semen samples were thawed and evaluated for the percentage of dead and live sperm, sperm motility parameters, membrane integrity, lipid peroxidation and sperm morphology. The results of this study showed that the addition of DNP at 0.75 nM resulted in improvement in total and progressive motility, viability, plasma membrane integrity and sperm normality compared to the control group, and significantly decreased MDA concentration compared to control group ($p < 0.05$).

Key words: Mitochondria, Mitochondrial mild uncoupling, Reactive oxygen species

مقدمه

اسپرم پرندگان نسبت به انجماد بسیار حساس بوده و میزان باروری آن بعد از انجماد نسبت به پستانداران اهلی، بسیار پایین است؛ بنابراین بهبود باروری منی منجمد شده برای انجام تلقیح مصنوعی ضروری است (Madeddu و همکاران ۲۰۱۷؛ Mphaphathi و همکاران، ۲۰۱۶). گونه‌های اکسیژن فعال در زنجیره انتقال الکترون میتوکندری تولید شده و در سطوح پاتولوژیکی می‌توانند به شدت عملکرد سلول را مختل کرده و مرگ آن را القا کنند (De Plessis و همکاران، ۲۰۱۵؛ Amara و همکاران، ۲۰۱۳). یکی از محل های اصلی تولید ROS ها میتوکندری‌ها می‌باشند که در قسمت میانی اسپرم قرار داشته و به عنوان موتور تأمین انرژی برای حرکت اسپرم فعالیت می‌کنند (Rui و همکاران، ۲۰۱۷؛ Du Plessis و همکاران، ۲۰۱۵). در این راستا، در جریان عبور الکترون از زنجیره انتقال الکترون رادیکال‌های آزاد تولید می‌شوند که سبب ایجاد پدیده‌ای به نام تنش اکسیداتیو می‌گردند (Wang و همکاران، ۲۰۱۵؛ Antonenko و همکاران، ۲۰۰۸). میتوکندری با استفاده از ویتامین E، آسکوربیک اسید، کوآنزیمQ10، سیتوکرومC و گلوتاتیون یا با استفاده از آنزیم-هایی نظیر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد. اگر این سیستم دفاعی در معرض خطر قرار گیرد این رادیکال‌های آزاد می‌توانند در میتوکندری تجمع یافته و

منجر به بروز جهش در ژنوم میتوکندری mtDNA، پراکسیداسیون لیپیدها، اکسیداسیون پروتئین‌ها، آسیب به DNA، اختلال در عملکرد میتوکندری و مرگ سلولی شوند (Skulachev و همکاران، ۲۰۱۰؛ Smith and Murphy، ۲۰۱۰، Skulachev و همکاران، ۲۰۰۹؛ Mirzaei و همکاران، ۲۰۱۶). یکی از دلایل عدم اثر بخشی آنتی‌اکسیدان‌هایی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند این است که در محل اصلی تولید ROS که در میتوکندری است، تجمع نمی‌یابند (Fang و همکاران، ۲۰۱۴). میتوکندری‌ها به علت داشتن ویژگی‌های منحصر به فردی نظیر نفوذناپذیر بودن نسبت به آنتی‌اکسیدان‌ها، داشتن مقادیر بالای ۵ الی ۱۰ برابر ROS در داخل میتوکندری نسبت به سیتوپلاسم، حضور کاردیولیپین در غشای داخلی میتوکندری، بیشتر در معرض تنش اکسیداتیو باشند (Skulachevو همکاران، ۲۰۰۹؛ Mirzaei و همکاران، ۲۰۱۶). این موضوع سبب شده تا افق‌های تحقیقاتی حاضر در زمینه تولیدمثل، در جهت ورود آنتی‌اکسیدان‌ها به میتوکندری فعالیت نمایند. بدین منظور در این بررسی از ترکیب شیمیایی ۴-۲-دی-نیتروفنول[1] برای کاهش آسیب‌های ناشی از ROS استفاده گردید که یک ترکیب مشتق از نیتروژن آلی با فرمول شیمیایی C6H4N2O5 و جرم مولی g/mol ۱۸۴/۱۱ بوده، در دمای اتاق به شکل بلورهای زرد است. این ماده به طور گسترده در کشاورزی و صنایع استفاده شده و در غلظت‌های بالا به علت دخالت در متابولیسم سلول و جدا کردن فسفریلاسیون از اکسیداسیون برای انسان و حیوان سمی است (Silva و همکاران، ۲۰۱۶). مکانیزم عمل آن براساس گرادیان پروتون فضای داخلی میتوکندری و جلوگیری از تشکیل ATP می‌باشد. واقعیت این است که زنجیره انتقال الکترون می‌تواند بدون تولید ATP ادامه یافته و باعث افزایش میزان متابولیسم پایه شود به همین علت در سال ۱۹۳۰ به طور گسترده برای کاهش وزن افراد چاق مورد استفاده قرار گرفت (Silva و همکاران، ۲۰۱۶). استفاده از DNP به مقدار mg/kg ۳۰ وزن بدن در روز به مدت ۴۶ روز در موش سبب گردید تا بیشتر جنین‌های موش متولد شده مرده باشند و همچنین زنده‌مانی بعد از تولد و وزن بدن نوزادان را کاهش یابد (Silva و همکاران، ۲۰۱۶). تولید سوپراکسید بوسیله کمپلکس I و III زنجیره انتقال الکترون یک فرآیند غیرآنزیمی بوده و تحت شیب بالای الکتروشیمیایی به شدت فعال است (Karim and Echtay، ۲۰۰۷). این رابطه non-ohmic است می‌تواند تولیدROS را بدون کاهش زیاد در فسفریلاسیون اکسیداتیو محدود کند از این‌رو جفت‌جدا کن‌های میتوکندری نشان دهنده اولین خط دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو می باشند (Kudin وهمکاران، ۲۰۰۴). می‌توان با دستکاری میتوکندری در جهت کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری، تولید ROS را کاهش داد(Mailloux and Harper، ۲۰۱۱؛ Baffy، ۲۰۱۰؛ Azzu and Brand، ۲۰۱۰). القای جفت‌جداکن‌های میتوکندری به وسیله دی‌نیترو فنول در شرایط آزمایشگاهی کشت جنین خوک و گاو و انجماد اسپرم در میمون رزوس و گربه‌ماهی زرد، انسان و خوک مفید بوده است (Wang و همکاران، ۲۰۱۵). پژوهش حاضر به منظور بهبود کیفیت اسپرم خروس، کاهش تولید ROS و افزایش زنده‌مانی متعاقب یخ‌گشایی از طریق هدف قرار دادن میتوکندری با استفاده از اثرات آنتی‌اکسیدانی DNP انجام گرفته است. هدف از این آزمایش افزودن DNP بر منی خروس و بررسی تاثیر آن بر کاهش تولید ROS و حفظ و بهبود کیفیت و عملکرد اسپرم بود.

مواد و روش‌ها

پرندگان مورد استفاده و جمع‌آوری مایع منی

پژوهش حاضر، در ایستگاه تحقیقاتی و پژوهشی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز انجام پذیرفت. در این تحقیق از ۱۴ خروس بالغ راس۲۰۸ با ۲۸ هفته سن استفاده گردید خروس‌ها در قفس‌های انفرادی با ابعاد ۸۵ × ۷۰ × ۷۰ سانتی‌متر، دمای ۱۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد، و ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. خروس‌ها در طول دوره، روزانه ۱۴۰-۱۵۰ گرم جیره‌ی تجاری (حاوی ۲۷۴۰ کیلوکالری انرژی متابولیسمی و ۱۲/۵۶ پروتئین خام به ازای هر کیلوگرم ماده خشک) تغذیه شدند و دسترسی آزاد به آب داشتند. خروس‌ها به مدت ۲ هفته برای اسپرم‌گیری عادت‌دهی شدند. سپس به دو گروه هفت‌تایی تقسیم شده و نمونه منی هر روز از یک گروه از خروس‌ها با استفاده از روش مالش پشتی- شکمی جمع‌آوری و در یک فلاسک آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از

[1] 2-4-dinitrophenol (DNP)

ارزیابی اولیه از نمونه‌های منی، در صورت داشتن حجم ۰/۶-۰/۳میلی‌لیتر، غلظت اسپرم بیشتر از ۳×۱۰^{۹} در هر میلی‌لیتر، تحرک بالاتر از ۸۰٪ و میزان اسپرم غیرطبیعی کمتر از ۱۰ ٪ مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور حذف تفاوت‌های فردی، نمونه های منی بلافاصله پس از ارزیابی اولیه، با هم مخلوط شدند (Safa و همکاران، ۲۰۱۶).

آماده‌سازی رقیق‌کننده و انجماد اسپرم

به منظور رقیق‌سازی اسپرم‌ها از رقیق‌کننده بلستویل استفاده گردید مواد شیمیایی مورد استفاده برای تهیه رقیق‌کننده بلتسویل در مطالعه حاضر از شرکت مرک آلمان تهیه گردید (جدول ۱). پس از آماده‌سازی رقیق‌کننده به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول در داخل ۱۰ لوله استریل ریخته شده و به هر لوله براساس گروه آزمایشی، آنتی‌اکسیدان DNP افزوده شد. تیمارهای آزمایش مشتمل بر پنج سطح (۰، ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۰/۷۵، ۱ نانومولار)، از DNP بود که در پنج تکرار انجام شد. DNP از شرکت سیگما-آلدریچ (کد محصول: ۳۴۳۳۴) تهیه گردید. پس از افزودن آنتی‌اکسیدان به رقیق‌کننده، نمونه‌های اسپرم با نسبت ۱ به ۳۰ به داخل لوله‌ها اضافه گردید سپس فالکون‌های حاوی رقیق‌کننده حاوی ۲۰ گلیسرول، اسپرم و آنتی‌اکسیدان DNP، همچنین فالکون حاوی رقیق‌کننده حاوی ۲۰ گلیسرول به مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شده و بعد از ۲ ساعت یک میلی‌لیتر رقیق‌کننده حاوی ۲۰ گلیسرول به هر کدام از فالکون‌ها افزوده شد و یک ساعت دیگر در یخچال نگهداری شدند. سپس نمونه منی بلافاصله در داخل پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتر کشیده شد و در پنج سانتی‌متری بالای سطح ازت مایع به مدت ۷ دقیقه قرار گرفتند سپس به سرعت در ازت مایع غوطه‌ور کرده و برای نگهداری به داخل تانک ازت منتقل شدند. نمونه‌ها به مدت دو ماه در داخل تانک ازت نگهداری شدند. در این تحقیق، به ازای هر یک از گروه‌های تیماری ۵ بار تکرار انجام شد و در هر تکرار هشت پایوت منجمد و پس از یخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای یخ‌گشایی، پایوت ها به مدت ۳۰ ثانیه در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از یخ‌گشایی صفاتی مانند درصد اسپرم‌های متحرک، درصد اسپرم‌های زنده، سلامت غشای اسپرم، خصوصیات مرفولوژیکی اسپرم‌ها و همچنین مقادیر مالون دی آلدهید نمونه‌ها جهت تعیین میزان لیپیدپراکسیداسیون غشای پلاسمایی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۱: اجزای مقادیر رقیق‌کننده بلستویل

Table (1)- Blastville Extender components

Amount	Ingredient
۰/۷۵۸	Potassium phosphate dibasic trihydrate (g)
۰/۸۶۶	Sodium-L-glutamate (g)
۰/۰۶۴	Potassium citrate tribasic monohydrate (g)
۰/۰۷	Potassium phosphate monobasic (g)
۰/۰۳۱	Sodium acetate trihydrate (g)
۰/۰۳۴	Magnesium chloride anhydrous (g)
۰/۲۷	N-[Tris (hydroxymethyl) methyl]-2 (g)
۰/۵	D-(-)-Fructose (g)
۱	Soybean lecithin (%)
۲۰	Glycerol (%)

Safa و همکاران، ۲۰۱۶

آزمایشات اسپرم

ارزیابی تحرک اسپرم

پس از یخ‌گشایی نمونه منی، فراسنجه‌های حرکتی اسپرم (تحرک کل[2]، تحرک پیش‌رونده[3]، سرعت در مسیر میانگین[4]، سرعت در مسیرمنحنی[5]، سرعت در مسیر مستقیم[6]، جنبایی عرضی سر[7]، خطی بودن جنبایی[8]) با استفاده از سیستم CASA (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver city CA, USA) ارزیابی شدند. جهت ارزیابی فراسنجه‌های تحرک ۵ میکرولیتر از نمونه را روی لام از قبل گرم شده (۳۷°C) قرار داده و بعد از پوشاندن با لامل، روی صفحه گرم میکروسکوپ قرار داده شد. از هر نمونه حداقل ۱۰ میدان دید در زیر میکروسکوپ بطور کاملاً تصادفی انتخاب و فراسنجه های تحرک ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ۱۰۰× تجزیه و تحلیل شدند (Akhlaghi و همکاران، ۲۰۱۴).

درصد زنده‌مانی اسپرم

این ارزیابی بوسیله روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین انجام گرفت (Bakhshayesh Khiabani، ۲۰۱۷). در این روش اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را به خود جذب کرده ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ آمیزی ۱۰ میکرولیتر از رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین برداشته و بر روی لام قرار داده شد سپس ۱۰ میکرولیتر نمونه‌ی اسپرم برداشته و با سر سمپلر به آرامی به رنگ اضافه کرده، سپس به آرامی گسترش داده شد. پس از خشک شدن، لام را زیر میکروسکوپ قرار داده و از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شده و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) نسبت به رنگ نشده (زنده) محاسبه شد (Bakhshayesh Khiabani، ۲۰۱۷).

تست یکپارچگی غشاء پلاسمایی (HOST)[9]

یکپارچگی غشای پلاسمایی با استفاده از تست التهاب هیپواسموتیک (HOST) تعیین شد. مواد شیمیایی لازم برای تهیه محلول هاست از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. برای این‌منظور ۱۰ میکرولیتر از مایع منی را به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاست (حاوی ۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم تری‌سدیم سیترات دی‌هیدرات، ۱۰۰۰میلی‌لیتر آب مقطر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی‌اسمول) اضافه شد. سپس در بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت ۳۰ دقیقه گرم خانه گذاری کرده و پس از آن با تهیه حداقل ۳ قطره از نمونه انکوبه شده، ارزیابی و شمارش اسپرم با استفاده از میکروسکوپ صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌هایی با دم گره خورده (زنده) نسبت به گره نخورده (مرده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی دارای دم گره خورده دارای غشای پلاسمایی سالم بوده و با قرار گرفتن در محیط هایپواسموتیک واکنش نشان می‌دهند در حالی که اسپرم‌هایی که دم آنها بدون گره بوده غشای پلاسمایی آنها آسیب دیده است (Bakhshayesh Khiabani، ۲۰۱۷).

تست مورفولوژی اسپرم

برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه منی یخ‌گشایی شده به میکروتیوب‌های حاوی ۱۵۰ میکرولیتر از محلول هانکوک (۶۲/۵ میلی‌لیتر فرمالین ۳۷ درصد، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سالین، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر) افزوده شد. سپس یک قطره از این مخلوط را روی لام قرار داده و توسط لامل پوشانده شده و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ×۴۰، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی محاسبه شد.

[2] Total Motility (TM)

[3] Progressive Motility (PM)

[4] Curvilinear velocity (micron/sec) (VCL)

[5] Average path velocity (micron/sec) (VAP)

[6] Straight – line velocity (micron/sec) (VSL)

[7] Lateral head displacement (micron) (ALH)

[8] Linearity (%) (LIN= VSL/VCL×100)

[9] Hypo-osmotic swelling test

اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدهید

رایج‌ترین روش برای ارزیابی پراکسیداسیون غشای اسپرم، اندازه‌گیری سطح مالون دی‌آلدهید (MDA)[10] از طریق ارزیابی تیوباربیتوریک اسید می‌باشد (Balercia و همکاران، ۲۰۱۷). مالون‌دی‌آلدهید یک محصول نهایی پراکسیداسیون لیپید است و با تیوباربیتوریک اسید واکنش داده و تولید یک ترکیب اضافی مالون‌دی‌آلدهید- تیوباربیتوریک اسید را می‌کند که به راحتی می‌توان این ترکیب اضافی را اندازه‌گیری نمود. برای اندازه‌گیری غلظت MDA، ابتدا دو پایوت از هر تیمار از هر تکرار در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد، یخ گشایی شدند. سپس ۱سی‌سی از محلول EDTA[11]، ۱ سی‌سی از محلول BHT[12] و ۲ سی‌سی از محلول TAC[13] را با هم مخلوط کرده به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس به مقدار ۱ میلی‌لیتر از بالای هر نمونه برداشته و به یک فالکون تمیز ریخته و به آن یک میلی‌لیتر TBA اضافه شد سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، اجازه داده شد تا در دمای اتاق سرد شوند. سپس جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر (T80 UV/VIS ساخت شرکت PJ انگلستان) اندازه‌گیری شد (Mirzaei Rad و همکاران،۲۰۱۶؛ Frederick، ۲۰۱۰).

تجزیه و تحلیل آماری

این طرح با ۵ تیمار و در ۵ تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. داده‌های بدست آمده برای فراسنجه‌های درصد تحرک کل، تحرک پیش رونده، خطی بودن تحرک، زنده مانی، پاسخ به محلول HOST ، مورفولوژی اسپرم و سطح مالون‌دی‌آلدهید بوسیله رویه GLM نرم افزار SAS (۹.۳) مورد آنالیز قرار گرفتند. قبل از تجزیه و تحلیل داده ها ابتدا داده های حاصل نرمال‌سازی شدند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی استفاده شد.

مدل آماری این طرح عبارت است از:

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

Y_{ij} = مشاهده ij ام

μ= میانگین جمعیت

T_i = اثر تیمارها

e=اثر باقیمانده ناشی از عوامل ناشناخته ij ام

نتایج

بررسی فراسنجه‌های تحرک اسپرم

افزودن ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ نانومولار از ۲،۴دی‌نیتروفنول باعث افزایش غیرمعنی‌دار تحرک کل اسپرم‌ها شد (جدول ۲). بهبود تحرک پیش‌رونده در سطوح ۰/۷۵ نانو مولار نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($P<0/05$). نتایج نشان داد که افزودن انتی‌اکسیدان‌های هدفمند ۲،۴ دی‌نیتروفنول سبب بهبود غیرمعنی دار فراسنجه‌های حرکتی اسپرم (میانگین سرعت در مسیر، سرعت در مسیر مستقیم، تحرک عرضی سر، راستی مسیر طی شده، خطی بودن حرکت، سرعت در مسیر منحنی و تناوب عرضی زنش) شد.

زنده‌مانی، یکپارچگی غشای اسپرم، مورفولوژی اسپرم و پراکسیداسیون لیپید

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل اثرات سطوح مختلف (۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۰/۷۵ نانومولار) ۲،۴دی‌نیتروفنول به رقیق کننده، باعث بهبود معنی‌دار زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و اسپرم سالم بعد از یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد شد ($P<0/05$) (جدول ۳). زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و اسپرم سالم در نمونه‌های یخ‌گشایی شده در سطح ۰/۷۵ نانومولار بهبود قابل توجهی نسبت به گروه شاهد نشان دادند. مقایسه اثرات سطوح آنتی‌اکسیدان DNP نسبت به گروه شاهد نشان داد که استفاده از سطوح ۰/۷۵ نانومولار نسبت به سایر گروه‌های تیماری سبب بهبود زنده‌مانی سلول‌های اسپرم شده است. نتایج حاصل از استفاده از سطوح مختلف هر آنتی‌اکسیدان هدفمند DNP بر غلظت MDA نشان داد که افزودن ۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۰/۷۵ نانومولار موجب کاهش معنی‌دار غلظت MDA نسبت به گروه شاهد شد اما در سطح ۱ نانومولار افزایش معنی‌دار غلظت MDA نسبت به شاهد گردید.

[10]Malondialdehyde (MDA)

[11]Ethylennedinitrilotetraacetic acid

[12]Butylated hydroxytoluene

[13]Trichloressigsaure

جدول۲: مقایسه ویژگی‌های حرکتی اسپرم خروس در سطوح مختلف ۲،٤ دی‌نیتروفنول (میانگین ± خطای معیار)

متغییرها Variables	TM (%)	PM (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	ALH (µm)	STR (%)	LIN (%)	VCL (µm/s)	BCF (Hz)
شاهد	۷۱^{ab} ± ۲/۲	۲۶/۲۰^{b} ± ۰/۹۶	۲۶/۸۶ ± ۳/۳۳	۲۲/۹۰ ± ۲/۷۸	۳/۰۷^{ab} ± ۰/۲۴	۸۱/۷۶^{ab} ± ۱/۴۲	۳۲/۷۸ ± ۰/۹۱	۵۲/۳۰ ± ۱۳/۴۴	۱۱/۸۱ ± ۱/۴۶
./۲۵nM	۷۸/۶۰^{a} ± ۲/۲	۲۸/۰۰^{b} ± ۰/۹۶	۳۲/۲۴ ± ۳/۳۳	۲۴/۴۹ ± ۲/۷۸	۳/۹۵^{a} ± ۰/۲۴	۷۶/۲۴^{b} ± ۱/۴۲	۳۳/۸۶ ± ۰/۹۱	۷۱/۹۵ ± ۱۳/۴۴	۱۴/۰۹ ± ۱/۴۶
۰ /۵ nM	۷۶/۶۰^{a} ± ۲/۲	۲۶/۰۰^{cb} ± ۰/۹۶	۲۲/۹۰ ± ۳/۳۳	۱۷/۷۹ ± ۲/۷۸	۳/۰۴^{ab} ± ۰/۲۴	۸۰/۷۱^{ab} ± ۱/۴۲	۳۹/۳۳ ± ۰/۹۱	۶۰/۵۹ ± ۱۳/۴۴	۱۴/۹۷ ± ۱/۴۶
۰/۷۵ nM	۷۹/۶۰^{a} ± ۲/۲	۴۱/۲۰^{a} ± ۰/۹۶	۳۱/۰۸ ± ۳/۳۳	۲۵/۶۹ ± ۲/۷۸	۳/۲۹^{ab} ± ۰/۲۴	۸۲/۸۳^{a} ± ۱/۴۲	۳۴/۴۷ ± ۰/۹۱	۶۶/۴ ± ۱۳/۴۴	۱۴/۲۹ ± ۱/۴۶
۱ nM	۶۱/۸۰^{b} ± ۲/۲	۲۲/۰۰^{c} ± ۰/۹۶	۲۰/۴۷ ± ۳/۳۳	۱۷/۰۶ ± ۲/۷۸	۲/۵۸^{b} ± ۰/۲۴	۸۲/۳۵^{a} ± ۱/۴۲	۳۲/۹۷ ± ۰/۹۱	۵۱/۹۹ ± ۱۳/۴۴	۱۲/۰۵ ± ۱/۴۶

میانگین‌های با حرفهای ناهمسان (a, b, c) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

ALH: بیشترین دامنه حرکت‌های جانبی بر حسب میکرومتر ، **BCF:** فرکانس حرکت‌های جانبی بر حسب هرتز، **LIN:** معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد است، **PM:** جنبایی پیشرونده، **STR:** معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد، **TM:** جنبایی کل، **VAP:** میانگین سرعت در مسیر مستقیم، **VCL:** سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده، **VSL:** سرعت اسپرم در خط مستقیم

جدول۳: صفات زنده مانی، یکپارچگی غشاء، میزان اسپرم سالم و تولید مالون دی آلدهید در سطوح مختلف ۲،٤ دی‌نیتروفنول (میانگین ± خطای معیار)

متغییر	زنده مانی(٪)	یکپارچگی غشای پلاسمایی (٪)	اسپرم سالم (٪)	مالون دی آلدهاید
گروه شاهد	۷۰/۶۰^{c} ± ۰/۸۱	۴۸/۰۰^{d} ± ۰/۹۷	۵۸/۲۰^{c} ± ۰/۹۵	۲/۱۷^{ab} ± ۰/۰۶
0/25 nM	۷۵/۵۰^{b} ± ۰/۸۱	۶۱/۰۰^{c} ± ۰/۹۷	۶۶/۰۰^{b} ± ۰/۹۵	۲/۱۳^{ab} ± ۰/۰۶
0/50 nM	۷۸/۸۰^{ab} ± ۰/۸۱	۶۹/۷۰^{b} ± ۰/۹۷	۶۸/۶۰^{b} ± ۰/۹۵	۱/۹۴^{bc} ± ۰/۰۶
0/75 nM	۸۲/۲۰^{a} ± ۰/۸۱	۷۷/۸۰^{a} ± ۰/۹۷	۷۲/۸۰^{a} ± ۰/۹۵	۱/۸۳^{c} ± ۰/۰۶
1 nM	۶۱/۴۰^{d} ± ۰/۸۱	۴۴/۸۰^{d} ± ۰/۹۷	۵۸/۲۰^{c} ± ۰/۹۵	۲/۳۴^{a} ± ۰/۰۶

میانگین‌های با حرفهای ناهمسان (a, b, c, d) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

بحث

در پژوهش حاضر، اثرات جفت‌جدا کن ۲،۴-دی‌نیتروفنول بر پارامترهای حرکتی اسپرم، یکپارچگی غشای پلاسمایی، مورفولوژی اسپرم، زنده مانی و میزان لیپید پراکسیداسیون بررسی گردید. نتایج حاکی از بهبود قابل توجهی در زمان استفاده از DNP در سطح ۰/۷۵ نانومولار در متغیرهای زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، مورفولوژی، لیپید پراکسیداسیون، تحرک کل و پیش‌رونده اسپرم پس از یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد بود (جدول ۲ و۳). میتوکندری اندامک مهم و منحصر به فردی است که در جنبایی، زنده‌مانی، بلوغ اسپرم، باروری و کیفیت اسپرم نقش داشته و به علت دارا بودن ویژگی‌های منحصر به فرد، آسیب پذیرترین قسمت سلول نسبت به ROSها و شروع‌کننده استرس اکسیداتیو است (Choi و همکاران،۲۰۰۷؛ Skulachev و همکاران، ۲۰۰۹؛ Fang، ۲۰۱۴). اختلال در عملکرد میتوکندری سبب کاهش کیفیت اسپرم و مشکلات باروری می‌گردد (Ford، ۲۰۰۶). بنابراین محافظت از عملکرد میتوکندری می‌تواند نقش اساسی در بهبود کیفیت اسپرم و باروری داشته باشد. نتایج بررسی ما نشان داد که استفاده از DNP باعث کاهش لیپیدپراکسیداسیون، افزایش زنده‌مانی و بهبود کیفیت اسپرم در مقایسه با گروه شاهد گردید، این یافته‌ها مطابق با مطالعات پیشین (Fang و همکاران، ۲۰۱۴؛ Dong و همکاران، ۲۰۱۰؛ Silva و همکاران، ۲۰۱۶) است. القای جداکننده‌های میتوکندری به‌وسیله دی‌نیتروفنول در شرایط آزمایشگاهی کشت جنین خوک و گاو (Thompson و همکاران، ۲۰۰۰؛ Machaty و همکاران، ۲۰۰۱) مفید بوده است. استفاده از DNP در انجماد مایع منی میمون رزوس یک افزایش جنبایی متعاقب یخ گشایی را سبب گردید (Dong و همکاران، ۲۰۱۰). فانگ و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که این ترکیب مسئول کاهش تولید ROS، پراکسیداسیون لیپید و افزایش زنده‌مانی متعاقب یخ‌گشایی در گربه ماهی زرد بوده است با این حال اثرات DNP ممکن است در ارتباط با خصوصیات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گامت‌ها باشد زیرا در انزال‌هایی با زنده‌مانی پایین متعاقب یخ‌گشایی نسبت به اسپرم‌هایی با جنبایی بالا پس از یخ‌گشایی معمولا مؤثرتر می‌باشد (Dong و همکاران، ۲۰۱۰). نتایج حاصل از مطالعه بر روی موش نشان داد که جلوگیری از تولید ROS به وسیله ترکیبات شیمیایی جفت‌جداکن ممکن است یک استرتژی بسیار مؤثرتری نسبت به تلاش برای حذف یا خنثی کردن گونه‌های ROS با مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی باشد (Dong و همکاران، ۲۰۱۰). مطالعه اثرات فعال‌سازی پروتئین جفت جدا کن[14] در مواجهه با سرمای شدیدبر تولید ROS, MDA, ATP فراسنجه‌های حرکتی اسپرم، باروری و ارتباط آن با آسیب اکسیداتیو و کیفیت اسپرم در اسپرم تازه و یخ‌گشایی گورخر ماهی بررسی شد. نتایج حاصل از مطالعات آنها حاکی از افزایش جنبایی متعاقب یخ‌گشایی، کاهش لیپید پراکسیداسیون، افزایش تولید ATP و در نهایت افزایش موفقیت در باروری بود (Wang و همکاران، ۲۰۱۵). جفت‌جداکن‌های شیمیایی مانند DNP و کربونیل‌سیانید-P-تری‌فلورومتوکسی‌فنیل‌هیدرازین تولید H_2O_2 میتوکندری را کاهش می‌دهند که به شدت جالب توجه و شایسته بررسی می‌باشند (Mailloux and Harper، ۲۰۱۰). نتایج حاصل از مطالعه Silva و همکاران (۲۰۱۶) بر روی انجماد اسپرم خوک نشان داد که افزودن **DNP** تأثیری بر روی یکپارچگی غشای پلاسمایی، لیپید پراکسیداسیون و زنده مانی اسپرم خوک نداشت. Shabalina و همکاران (۲۰۱۰) مخالف با این نظریه هستند که جداکننده‌ها تولید ROS را کاهش می‌دهند و فقط کاهش تولید ROS در کمپلکس II و فقط در حضور سوبسترای سوکسینات وابسته به پتانسیل غشاء می‌دانند که می‌توانند تولید ROS را کاهش دهد و بیان کردند که برای انجام این عمل نیاز به سطوح بالایی از سوکسینات است که این سطوح بالای سوکسینات در حالت عادی وجود ندارد (Shabalina و همکاران، ۲۰۱۰). مهار UCP_2 به وسیله گنیپین منجر به افزایش سریع H_2O_2 می‌گردد. این شواهد بعدا بوسیله مشاهده کاهش تولیدROS به وسیله بیان بیش از حدUCP_2 حمایت گردید (Lee و همکاران، ۲۰۰۵). در موش‌های فاقد UCP_2 تولید و انتشار ROS

[14] Uncoupling Protein2(Ucp2)

میتوکندری افزایش می‌یابد (Mailloux and Harper، ۲۰۱۰؛ Lee و همکاران، ۲۰۰۹). با توجه به متناقض بودن نتایج حاصل از DNP در گونه‌های مختلف (Silva و همکاران، ۲۰۱۶؛ fang و همکـاران، ۲۰۱۶؛ Dong و همکـاران، ۲۰۱۰؛ Matsumoto و همکـــاران، ۲۰۰۸؛ Lanning و همکـــاران، ۲۰۰۲؛ Lardy و همکاران، ۱۹۴۸) می‌توان دلیل نتایج حاصل را اینگونه بیان نمود. تأثیر مطلوب آنتی‌اکسیدان هدفمند مورد مطالعه به علت محافظت از عملکرد میتوکندری می‌باشد (Murphy and Smith)، ۲۰۰۰). در نتیجه استفاده از آنتی‌اکسیدانی که توانایی نفوذ به میتوکندری و محافظت از آن در برابر آسیب‌های ROS را دارا می‌باشند می‌توانند سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم گردند. مطالعات در موش‌های تراریخت نشان داد که ژن کاتالاز، زمانی که میتوکندری را هدف قرار می‌دهد با کاهش آسیب‌های ناشی از ROS، طول عمر را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. در حالی که بیان بیش از حد آنزیم کاتالاز در هسته یا پراکسی‌زوم اثر قابل توجهی بر روی طول عمر نداشت (Mukhopadhyay and Weiner، ۲۰۰۷). پروتئین‌های جفت‌جداکن کانالهایی هستند که در غشای داخلی میتوکندری حضور داشته و متعلق به خانواده ناقل‌های آنیونی هستند اولین دفاع آنتی‌اکسیدانی میتوکندری در برابر ROS می‌باشند که با کاهش جزئی در پتانسیل غشاء و افزایش مصرف اکسیژن سبب کاهش تولید ROS می‌گردند (Fang و همکاران، ۲۰۱۴؛ Rousset و همکاران، ۲۰۰۴؛ Dong و همکاران، ۲۰۱۰؛ Harper، ۲۰۰۱؛ Echtay، ۲۰۰۷). ۴-هیدروکسی نونئال یک محصول لیپید پراکسیداسیون در استرس اکسیداتیو است که می‌تواند سبب فعال شدن UCP_2 و به دنبال آن سبب کاهش تولید ROS و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو گردد (Echtay and Brand، ۲۰۰۷). همچنین UCP_2 می‌تواند به طور مستقیم آنیون سوپراکسید را از سراسر غشای داخلی میتوکندری به سیتوپلاسم منتقل کرده و سبب حذف آنیون سوپراکسید از میتوکندری گردد (Azzu and Brand، ۲۰۱۰؛ Wojtczak و همکاران، ۲۰۱۱). از این رو فعال‌سازی UCP_2 ممکن است یک روش موثر برای کاهش تنش اکسیداتیو در انجماد اسپرم باشد (Mailloux and Harper، ۲۰۱۱).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که افزایش جنبایی و بهبود تحرک کل با وجود استفاده از ۲،۴-دی‌نیتروفنول حفظ می‌گردد. با توجه به این که ۲،۴-دی نیتروفنول در سطوح پایین مورد استفاده یک کاهش کوچک در پتانسیل غشاء ایجاد می‌کند که این کاهش جزئی باعث کاهش در تولید ATP نمی‌گردد. از سوی دیگر انرژی مورد نیاز برای جنبایی اسپرم از طریق گلیکولیز تامین می‌گردد پس کاهش در تولید ATP از طریق مسیر فسفریلاسیون اکسیداتیو تاثیری روی جنبایی اسپرم نخواهد گذاشت. بنابراین کاهش جزئی پتانسیل غشا با کاهش در تولید ROS سبب بهبود فراسنجه‌های حرکتی اسپرم گردید. جنبایی برآورد ساده و سریعی از کیفیت اسپرم است که به طور معمول در اسپرم یخ‌گشایی شده به علت همبستگی آن با باروری مورد توجه قرار می‌گیرد. افزایش تحرک پس از یخ‌گشایی سبب افزایش باروری موفق می‌گردد که بیانگر آن است که تحرک و سرعت اسپرم از شاخص‌های مهم در ارزیابی کیفیت اسپرم می‌باشد. ارتباط لقاح موفق با لیپید پراکسیداسیون قابل فهم است. اسپرم‌ها حاوی غلظت‌های بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشند بنابراین به پراکسیداسیون لیپیدها بسیار حساس می‌باشند. کاهش لپید پراکسیداسیون به حفظ غشای پلاسمایی اسپرم و یکپارچگی غشای میتوکندری، حفظ سیگنالینگ مولکولی که برای باروری موفقیت آمیز ضروری می‌باشد کمک می‌کند (Wang و همکاران، ۲۰۱۵). حرکت اسپرم نیاز به مقدار زیادی انرژی برای دستگاه فلاژلوم اسپرماتوزوئید دارد. آدنوزین تری فسفات مورد نیاز برای حمایت از فعالیت‌های حیاتی اسپرم بوسیله دو مسیر متابولیکی، گلیکولیز و فسفریلاسیون اکسیداتیو تامین می‌شود. در میتوکندری‌ها تولید انرژی از طریق فسفریلاسیون اکسیداتیو و در قسمت سر و قطعه اصلی تاژک از طریق گلیکولیز می‌باشد. گلیکولیز انرژی مورد نیاز برای ظرفیت‌پذیر شدن، پرتحرک شدن و واکنش‌های آکروزومی را تامین می‌کند. فسفریلاسیون اکسیداتیو انرژی مورد نیاز برای تمایز و بلوغ و جنبایی را تامین می‌کند؛ مسیرهای متابولیکی تامین انرژی در اسپرم‌ها یک حالت مختص به گونه می‌باشد. فعالیت

اسپرم موش و گرزه در محیط‌های فاقد گلوکز متوقف می‌گردد. گلوکز برای ظرفیت پذیری، افزایش تحرک و اتصال اسپرم به تخمک در بعضی از پستانداران مانند انسان، موش، گرزه و همستر ضروری است. اما اضافه کردن گلوکز، ظرفیت پذیری اسپرم گاو، سگ و خوکچه هندی را متوقف می‌کند (Ferramosca، ۲۰۱۴؛ Amaral و همکاران، ۲۰۱۳؛ Du Plessis و همکاران، ۲۰۱۵). اما نباید فراموش کرد که عملکرد صحیح میتوکندری برای باروری ضروری بوده و نقص در عملکرد آن می‌تواند سبب ایجاد ناباروری گردد (Amaral و همکاران، ۲۰۱۱؛ Mukai and Okuno، ۲۰۰۴). مطالعات نشان داده‌اند که گلیکولیز یک نقش بسیار مهم در جنبایی اسپرم دارد. ATP تولید شده در میتوکندری برای انتشار در طول تاژک کافی نبوده و برای انتشار در طول تاژک مدت زمان بیشتری نیاز دارد. بخصوص در گونه‌هایی مانند جوندگان که اسپرم آنها دارای دم طویل می‌باشند. اگر چه این دلیل هنوز مورد مناقشه است (Ford، ۲۰۰۶؛ Mukai and Okuno، ۲۰۰۴؛ Hansford، ۱۹۹۷). علاوه بر این مطالعات در موش نشان داد، نقص در فسفریلاسیون اکسیداتیو مهار کننده جنبایی اسپرم نیست (Ferramosca، ۲۰۱۴). آنزیم‌های گلیکولیتیک در قطعه میانی دم اسپرم پستانداران شناسایی شده‌اند که شامل هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز و گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز می‌باشد (Du Plessis و همکاران، ۲۰۱۵). با این حال چندین دلیل وجود دارند که بیان می‌کند گلیکولیز منبع تولید ATP برای جنبایی اسپرم است. در تعدادی از موش‌های نر تعدادی از آنزیم‌های مرتبط با گلیکولیز مثل انولاز۴ (Du Plessis و همکاران، ۲۰۱۵)، گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز، فسفوگلیسرات کیناز، لاکتات دهیدروژناز را از بین بردند و مشاهده کردند که عملکرد اسپرم دچار اختلال شده (بویژه از نظر تحرک) و باروری خود را از دست داده‌اند. نتایج حاصل از مطالعات نشان داده است که برخی از سویه‌ها بیشتر از سویه‌های دیگر به گلیکولیز متکی هستند. استفاده از لیزر توئیزر[15] نشان داد که جنبایی اسپرم انسان وابسته به پتانسیل غشاء میتوکندری[16] نیست. اسپرم گراز دارای بالاترین فعالیت گلیکولیتیک است (Du Plessis و همکاران، ۲۰۱۵). در صورتی که جنبایی اسپرم گاو به چرخه کربس و جنبایی اسپرم موش به گلیکولیز وابسته می‌باشد (Ferramosca، ۲۰۱۴).

نتیجه‌گیری

پیشرفت‌های اخیر در فناوری‌های بهبود دهنده عملکرد باروری بیان نموده‌اند که میتوکندری‌ها اهداف اصلی برای تحویل آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشند. نتایج حاصل نشان داد که افزودن DNP در سطح ۰/۷۵ نانومولار سبب بهبود، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و اسپرم سالم گردید همچنین موجب کاهش معنی‌دارغلظت MDA نسبت به گروه شاهد شد. یافته‌های ما از این نظریه حمایت می‌کند که کاهش تولید ROS به وسیله ترکیبات جفت‌جداکن میتوکندری ممکن است استراتژی بسیار موثرتری نسبت به تلاش برای حذف یا خنثی کردن ROS با مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاران محترم مرکز تحقیقاتی خلعت‌پوشان تبریز که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند قدردانی می‌شود.

[15] Laser tweezers

[16] Mitochondrial membrane potential (MMP)

منابع

Amaral, A., Lourenco, B., Marques, M. and Ramalho-Santos, J. (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, 146: 163-174.

Amaral, A., Paiva, C., Baptista, M., Sousa, AP. and Ramalho-Santos, J. (2011). Exogenous glucose improves long-standing human sperm motility, viability, and mitochondrial function. *Fertility and Sterility*, 96: 848–850.

Antonenko, Y.N., Avetisyan, A.V., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Chertkov, V.A., Domnina, L.V et al. (2008). Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of an aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies. *Biochemistry*, 73: 1273–1287.

Azzu, V. and Brand, M.D. 2010. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 35: 298-307.

Akhlaghi A, Jafari Y, Zhandi M and Peebles ED. (2014). Reproductive performance, semen quality, and fatty acide profile of spermatozoa in senescent broiler breed rooster as enhanced by the long-term feeding of dried apple pomace. *Animal Reproduction Science*. 147: 64-73

Baffy, G. (2010). Uncoupling protein-2 and cancer. *Mitochondrion*, 10:243–252

Bakhshayesh Khiabani, A., Moghaddam, G. and Daghigh Kia, H. (2017). Effects of adding different levels of Glutamine to modified Beltsville extender on the survival of frozen rooster semen. *Animal Reproduction Science*, 184: 172–177

Balercia G, Gandini L, and Lenzi A. (2017). Antioxidants in andrology. *Thends in Andrology and sexual medicin* . Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland.

Choi, S.Y., Gonzalvez, F., Jenkins, G.M., Slomianny, C., Chretien, C., Arnoult, D., et al. (2007). Cardiolipin deficiency releases cytochrome c from the inner mitochondrial membrane and accelerates stimuli-elicited apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 14: 597–606.

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: 2359-2361.

Echtay, K.S. (2007). Mitochondrial uncoupling proteins—What is their physiological role? *Free Radical Biology and Medicine*, 43: 1351-1371.

Echtay, K.S. and Brand, M.D. (2007). 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production. *Redox Report*, 12: 26-29.

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

Karim, S. and Echtay, M.D. (2007). 4-Hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production. *W. S. Maney and Son Ltd*, 12: 26-29.

Kudin, A.P., Bimpong-Buta, N.Y., Vielhaber, S., Elger, C.E. and Kunz,W.S. (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 4127- 4135.

Lanning, L.L., Creasy, D.M., Chapin, R.E., Mann, P.C., Barlow, N.J., Regan, K.S et al. (2002). Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30, 507-520.

Lardy, H.A. and Phillips, P.H. (1945). Studies of fat and carbohydrate oxidation in mammalian spermatozoa. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 6: 53-61.

Lee, S.C., Robson-Doucette, C.A. and Wheeler, M.B. (2009). Uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species formation in islets and influences susceptibility to diabetogenic action of streptozotocin. *Journal of Endocrinology*, 203:33–43.

Machaty, 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: 39-44.

Madeddu, M., Mosca, F., Abdel Sayed, A., Zaniboni, L., Mangiagalli, MG., Colombo, E et al. (2016). Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: Comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen. *Animal Reproduction Science*, 171: 58-64.

Ferramosca, A. (2014). Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *Biomed Resarch International*, 1-8.

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

Frederick, S. (2010). *Hep G2Hepatocyte Lipid Peroxidation Assay*. NCL Method GTA- 4. Version1.1.

Hansford, R.G., Hogue, B.A. and Mildaziene, V.J. (1997). Dependence of H2O2 formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 29: 89-95

Harper, JA., Dickinson, K. and Brand, M.D. (2001). Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obesity Reviews*, 2:255-65.

Herrero, A. and Barja, G. (1998). H2O2 production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: sites of free radical generation and mechanisms involved. mech. *Mechanisms of Ageing and Development*, 103 133-146.

Hirst, J., King, MS. and Pryde, K.R. (2008). The production of reactive oxygen species by complexI. *Biochemical Society Transactions*, 36: 976-980.

Hoffman, D.L., Salter, J.D. and Brookes, P.S. (2007). Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory*, 292: 101-108.

Safa, S., Moghaddam, G., Jozani, R.J., Daghigh Kia, H. and Janmohammadi, H. (2016). Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. *Animal Reproduction Science*, 174, 100–106.

Shabalina, O.N., Shekarova, M.V., Skulachev, T.V., Titova, V.A., Vygodin, M.Y., Vyssokikh, M.N et al. (2011). Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents. *Aging (Albany)*, 3: 1110–1119

Silva, E.F., Junior, A.S.V., Cardoso, T.F., Stefanello, F.M., Kalb, A.C., Martínez, P.E et al. (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 et al. (2009). An attempt to prevent senescence: A mitochondrial approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787: 437–461.

Smith, R.A. and Murphy, M.P. (2011). Mitochondria-targeted antioxidants as therapies. *Discovery medicine*, 11: 106–114.

Thompson, J., McNaughton, C., Gasparrini, B. and McGowan, L. (2000). Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. *Reproduction Fertility*, 118: 47-55.

Venditti, P., Di Stefano, L. and Di Meo, S. (2013). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*, 13: 71-82.

Mailloux, R.J. and Harper, M.E. (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radical Biology and Medicine*, 51:1106–1115.

Mirzaei Rad, H., Eslami, M. and Ghanie, A. (2016). Palmitoleate enhances quality of rooster semen during chilled storage. *Animal Reproduction Science*, 165: 38–45.

Mphaphathi, M.L., Seshoka, M.M., Luseba, D., Sutherland, B. and Nedambale, T.L. (2016). The characterisation and cryopreservation of Venda chicken semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5: 132–139

Mukai, C. and Okuno, M. (2004). Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction*, 71:540–547.

Mukhopadhyay, A. and Weiner, H. (2007). Delivery of drugs and macromolecules to mitochondria. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 729–738.

Murphy, M.P. and Smith, R.A.J. (2000). Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 41: 235–250.

Rousset, R., Alves-Guerra, M.C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A.M., Bouillaud, F.R et al. (2004). The Biology of Mitochondrial Uncoupling ProteinS. *Diabetes*, 53(1): 130-135.

Rui, B.R., Angrimani, D.S.R., Losano, J.D.A., Bicudo, L.D.C., Nichi, M., and Pereira, R.J.G. (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.

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

Wojtczak, L., Lebiedzi_nska, J.M., Suski, M.R. and Wie ckowski, P. (2011). Sch€onfeld, Inhibition by purine nucleotides of the release of reactive oxygen species from muscle mitochondria: indication for a function of uncoupling proteins as superoxide anion transporters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407: 772-776.