Archive of SID

بررسی اثر اسید لینولنیک روی کیفیت منی خروس نگه‌داری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

محسن اسلامی[۱*]، ابوالفضل غنی‌ئی[۲]، الهام زاده هاشم[۳]، سعید نوروزی[۴]

۱. استادیار، گروه تریوژنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.
۳. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۴. دانشجوی دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه- ایران.

دریافت: ۱۷ شهریور ماه ۹۵ **پذیرش:** ۱۸ تیر ماه ۹۶

چکیده

در پژوهش حاضر اثر اسید لینولنیک روی کیفیت منی خروس که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره شده، بررسی گردید. برای این منظور، جمع‌آوری منی از خروس‌ها (تعداد= ۱۰) ۲ نوبت در هفته انجام گرفت؛ سپس نمونه‌های با کیفیت خوب، رقیق شدند و اسید لینولنیک با غلظت‌های صفر (کنترل)، ۴۰ (L۴۰)، ۸۰ (L۸۰) و ۱۶۰ (L۱۶۰) میکرومولار به آن‌ها افزوده شد. به منظور بررسی اثر اسید لینولنیک بر اسپرم، حرکت پیش‌رونده رو به جلو، قابلیت زنده‌مانی، همچنین غلظت مالون دی‌آلدهید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در محیط نگه‌داری و اسپرم در ساعت‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ آزمایش اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج این پژوهش، حرکت پیش‌رونده رو به جلو در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ پژوهش در گروه‌های L۸۰ و L۱۶۰ و نیز درصد زنده‌مانی اسپرم در گروه‌های L۸۰ و L۱۶۰ در ساعت ۴۸ پژوهش بالاتر از گروه کنترل بود ($p < ۰/۰۵$)؛ علاوه بر این، غلظت مالون دی‌آلدهید در ساعات ۲۴ و ۴۸ پژوهش درگروه‌های L۸۰ و L۱۶۰ در محیط نگه‌داری و اسپرم کمتر از گروه کنترل بود ($p < ۰/۰۵$). گروه‌های ذکر شده در ساعات ۲۴ و ۴۸ پژوهش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به گروه کنترل نشان دادند ($p < ۰/۰۵$)؛ در نتیجه، غنی‌سازی با غلظت‌های ۸۰ و ۱۶۰ میکرومولار اسید لینولنیک می‌تواند باعث بهبود کیفیت منی خروس ذخیره‌سازی شده در دمای یخچال شود.

واژه‌های کلیدی: اسید لینولنیک، خروس، اسپرم، منی.

مقدمه

باروری جنس نر در صنعت مرغداری یکی از عوامل مهم و تأثیرگذار در بازدهی گله‌های مولد محسوب می‌شود. حفظ باروری اسپرم در حد اعلا در هنگام ذخیره خارج از بدن منی یکی از مهم‌ترین اهداف در تلقیح مصنوعی طیور است. اسیدهای چرب و متابولیت‌های آن‌ها عملکردهای بیولوژیک متفاوتی در بافت‌های بدن دارند. این ترکیبات نه تنها به‌عنوان منابع انرژی عمل می‌کنند، بلکه در ساختار سلولی و بین سلولی و سیگنال‌های آندوکرین نیز نقش دارند (۳۰). محتوای لیپیدی منی پرندگان یک فاکتور تأثیرگذار در کیفیت و باروری اسپرم است (۱۵). غشای پلاسمایی اسپرماتوزوآی خروس به پراکسیداسیون لیپید حساس است (۳۶). هرچند منی دارای سیستم آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز بوده، که این‌ها در روندهای جلوگیری از پراکسیداسیون نقش مهمی دارند (۱ و ۱۹)، منتها این مجموعه آنتی‌اکسیدانی اغلب برای نگه‌داری منی در محیط خارج از بدن کفایت لازم در جلوگیری از بروز پراکسیداسیون لیپید را ندارد (۴). برای جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید و کاهش عملکرد اسپرم

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: M.eslami@urmia.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

سیستم آنتی‌اکسیدانی موثر در حد مطلوب لازم است (۲ و ۲۱). اثرات پراکسیداسیون لیپید منی خروس روی کاهش حرکت و باروری اسپرم مشخص شده است، به طوری که مشخص شده است که استرس اکسیداتیو منجر به آسیب به غشای سلولی اسپرم (۷)، کاهش حرکت اسپرم (۲۰)، کاهش تعداد سلول‌های زنده و در نهایت کاهش باروری (۷) خواهد شد. پژوهش‌ها نشان دادند که اسیدهای چرب غیراشباع اثرات محافظتی بیشتری در مقایسه با اسیدهای چرب اشباع روی اسپرم گونه‌های مختلف حیوانی دارند (۱۶). در این راستا، اثرات مثبت غنی‌سازی با اسید پالمیتولئیک و اولئیک روی منی خروس در شرایط نگه‌داری سرد گزارش شده است (۱۷ و ۳۴). پیشرفت در روش‌های نگه‌داری هرچه بهتر منی در محیط خارج از بدن (به خصوص نگه‌داری در دمای یخچال) از اهداف مهم در تولید مثل و تلقیح مصنوعی طیور است. تاکنون اثر اسید لینولنیک به‌عنوان یک اسید چرب غیراشباع واجد سه باند دوگانه روی اسپرم خروس ارزیابی نشده است؛ بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر اسید لینولنیک روی حرکت و زنده‌مانی اسپرم خروس طی نگه‌داری منی در شرایط یخچال بود؛ علاوه براین، غلظت مالون دی‌آلدهید (به‌عنوان شاخص اکسیدانی) و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های اسپرم و محیط نگه‌داری اسپرم به طور جداگانه اندازه‌گیری شد.

مواد و روش کار

تعداد ۱۰ خروس نژاد راس ۳۰۸ با سن ۳۹ هفته از مزرعه مرغ مادر برای انجام این پژوهش تهیه شد. خروس‌ها هر روز صبح یک مرتبه و به میزان استاندارد توصیه شده برای خروس‌های بارور (۱۱۰ گرم در روز) با پلت آماده تغذیه شدند (۲۶) و آب نیز به‌صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده شد. منی با روش غیرتهاجمی مالش شکمی دوبار در هفته (مجموعاً ۴۶ نمونه) جمع‌آوری شد (۲۵). بعد از اخذ منی، نمونه‌ها (اردیبهشت تا خرداد سال ۱۳۹۵) به آزمایشگاه منتقل شدند و بلافاصله ارزیابی شدند. در آزمایشگاه ابتدا درصد حرکت پیش‌رونده رو به جلو در تک‌تک نمونه‌ها با میکروسکوپ (Olumpus, BX 41, Japan) ارزیابی شد؛ سپس نمونه‌هایی که تحرک بیش از ۸۰ درصد داشتند (تعداد ۴۲ نمونه، ارزیابی همیشه توسط یک فرد انجام شد و طبق رفرانس (۳۱) اسپرم‌هایی که حرکت رو به جلو متوسط تا شدید را داشتند به‌عنوان اسپرم‌های متحرک در نظر گرفته شدند) با هم مخلوط و سپس نمونه منی با رقیق کننده فسفات (۳۷) حاوی ۰/۴٪ فروکتوز به میزانی رقیق شد که در هر سی‌سی ۲×۱۰^{۹} اسپرم متحرک قرار داشته باشد (ترکیبات رقیق کننده در هر ۵۰ میلی‌لیتر شامل: مونو هیدروژن فسفات دی سدیم ۰/۸۱۷ گرم، دی هیدروژن فسفات مونو سدیم ۰/۲۵۸ گرم، فروکتوز ۰/۲ گرم و سفیده تخم‌مرغ ۵ میلی‌لیتر). بعد از شمارش تعداد اسپرم (با لام هموسیتومتر) و رقیق‌سازی، منی به چهار قسمت مساوی تقسیم شد. گروه اول گروه کنترل بود که صرفا آلبومین سرم گاوی غیر کنژوگه با اسید لینولنیک را دریافت کرد. گروه‌های درمانی ۲ تا ۴ به ترتیب اسید لینولنیک کنژوگه شده با آلبومین سرم گاوی با غلظت ۴۰ (L40)، ۸۰ (L80) و ۱۶۰ (L160) میکرومولار را دریافت کردند. انتخاب مقادیر بر اساس مطالعه قبلی بوده است (۳۸). میزان آلبومین سرم گاوی در تمام گروه‌ها یکسان و به میزان سه درصد استفاده شد. بعد از این مرحله نمونه‌ها در داخل یخچال به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده رو به جلو و درصد اسپرم‌های زنده در ساعت‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ پژوهش، ارزیابی شد؛ همچنین غلظت مالون دی‌آلدهید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در محیط نگه‌داری و اسپرم به طور جداگانه در ساعت‌های مذکور اندازه‌گیری شد. برای تعیین تعداد اسپرم‌های زنده و مرده، رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین (۵) روی نمونه‌های تیمار شده در ساعت‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ پژوهش انجام گرفت. بعد از ارزیابی حرکت و

www.SID.ir

Archive of SID

زنده‌مانی در ساعت‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ پژوهش، نمونه‌ها با دور ۱۵۰۰g ، ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا اسپرماتوزوآ از محیط نگه‌داری اسپرم جدا شود. پلت در مرحله اول سانتریفیوژ، اسپرماتوزوآ تلقی شد. مایع رویی دو بار به مدت ۱۵ دقیقه در g ۵۵۰ مجددا سانتریفیوژ شد تا محیط نگه‌داری نیز جدا شود (۶). به لوله حاوی پلت اسپرم یک میلی‌لیتر بافر فسفات اضافه شد و به خوبی مخلوط شد تا به‌صورت همگن در آمد؛ به‌دلیل اینکه بعد از سانتریفیوژ و جداسازی پلاسمای منی، اسپرم باقی مانده در ته لوله به‌صورت غیرمحلول بود و قابلیت برداشت با سمپلر به منظور اندازه‌گیری تست‌های مذکور را نداشت، به منظور همگن‌سازی نمونه پلت اسپرم برای اندازگیری غلظت مالون دی‌آلدهید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی، به آن یک میلی‌لیتر محلول فسفات بافر اضافه شد؛ سپس نمونه‌های حاوی اسپرماتوزوا و محیط نگه‌داری تا زمان اندازه‌گیری مالون دی‌آلدهید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در فریزر ۲۲- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. غلظت مالون دی‌آلدهید در نمونه‌های اسپرم و محیط نگه‌داری با روش اسپکتروفتومتری اندازگیری شد (۱۸). برای انجام آزمایش مذکور ابتدا معرف تیو باربیتوریک اسید با استفاده از تری کلرو استیک اسید، تیوباربیتوریک اسید و هیدروکلریک اسید تهیه شد؛ سپس ۴۰۰ میکرولیتر از نمونه را با ۲ میلی‌لیتر از معرف مخلوط شد و در ادامه آب مقطر به مخلوط یاد شده، اضافه شد و کاملاً مخلوط شد. لوله‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه داخل بن‌ماری جوش قرار داده شدند. پس از خنک کردن، لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. در نهایت جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر در مقابل لوله بلانک قرائت گردید. غلظت مالون دی‌آلدهید به‌صورت میکرو مول در گرم پروتئین در نمونه‌های محیط نگه‌داری و اسپرم گزارش شد.

ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (Total antioxidant capacity: TAC) در نمونه‌های محیط نگه‌داری و اسپرم در ساعت‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ آزمایش طبق پروتکول Koracevic و همکاران در سال ۲۰۰۱ ارزیابی گردید (۲۴). به طور خلاصه، ۱۰ میکرولیتر نمونه به ۴۹۰ میکرولیتر فسفات بافر اضافه شد و در ادامه به‌ترتیب محلول بنزوات سدیم، اسید استیک و آب اکسیژنه نیز به لوله‌ها اضافه شد، سپس لوله‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و در نهایت پس از اضافه کردن محلول تیوباربیتوریک اسید و قرار دادن لوله‌ها در آب جوش (۱۰ دقیقه) جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید. اگرچه تعداد اسپرم اختصاص داده شده بین گروه‌های آزمایش در هر آزمایش یکسان بود ولی با این وجود میزان پروتئین که یک آیینه‌ای از سلول است نیز در طرح حاضر اندازه‌گیری شد تا غلظت مالون دی‌آلدهید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی بر اساس میزان پروتئین گزارش شود. میزان پروتئین در نمونه‌های مورد بررسی بر اساس روش Bradford اندازه‌گیری شد (۸). به طور خلاصه، ابتدا معرف برادفورد تهیه شد و سپس ۲ میلی‌لیتر از این معرف به ۱۰۰ میکرولیتر نمونه اضافه و مخلوط شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانو متر قرائت شد. غلظت پروتئین در نمونه‌ها با منحنی استاندارد تعیین گردید.

داده‌ها با نرم‌افزار SigmaStat آنالیز آماری شدند. اختلاف بین گروه‌های آزمایش در یک زمان با آزمون آنالیز واریانس و تست تکمیلی توکی ارزیابی شدند؛ همچنین اختلاف بین زمان‌های مختلف در یک گروه آزمایش با آزمون اندازگیری تکراری آنالیز واریانس آنالیز آماری شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد. ارزش P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

حرکت پیش‌رونده رو به جلو بین گروه‌های مختلف در ساعت صفر آزمایش تفاوت معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱)، در حالیکه در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ پژوهش در گروه‌های L۸۰ و L۱۶۰ بالاتر از گروه کنترل بود زمان ۲۴ کمتر از زمان ۰، و در زمان ۴۸ کمتر از زمان ۲۴ است (P<۰/۰۵، جدول ۱).

درصد زنده‌مانی بین گروه‌های مختلف در ساعت صفر و ۲۴ پژوهش تفاوت معنی‌دار نشان نداد (جدول ۱)، در حالیکه زنده‌مانی اسپرم در گروه‌های L۸۰ و L۱۶۰ در (P<۰/۰۵، جدول ۱)؛ همچنین آنالیز درون گروهی نشان داد که حرکت پیش‌رونده رو به جلو در تمامی گروه‌ها در ساعت ۴۸ پژوهش بالاتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵، جدول ۱)؛ همچنین آنالیز درون گروهی نشان داد که درصد زنده‌مانی اسپرم در تمامی گروه‌ها در ساعت‌های ۲۴ و ۴۸ پژوهش کمتر از زمان صفر است (P<۰/۰۵، جدول ۱).

جدول ۱– حرکت پیش‌رونده رو به جلو و زنده‌مانی اسپرم (میانگین ± انحراف معیار) خروس متعاقب غنی‌سازی منی با غلظت‌های مختلف اسید لینولنیک و ذخیره سازی در دمای یخچال به مدت ۴۸ ساعت

پارامتر	گروه‌های درمانی	زمان (ساعت)		
		۰	۲۴	۴۸
حرکت پیش‌رونده رو به جلو (درصد)	کنترل	۹۳/۳۳ ± ۰/۸۸ ^{Aa}	۶۶/۳۳ ± ۲/۰۲ ^{Ab}	۴۱/۳۳ ± ۲/۰۳ ^{Ac}
	L۴۰	۹۰/۶۶ ± ۰/۶۶ ^{Aa}	۷۳/۳۳ ± ۱/۲۰ ^{ABb}	۵۰/۶۶ ± ۲/۶۰ ^{ABc}
	L۸۰	۹۱/۶۶ ± ۱/۷۶ ^{Aa}	۷۹/۰۰ ± ۲/۳۰ ^{Bb}	۵۸/۰۰ ± ۲/۵۰ ^{Bc}
	L۱۶۰	۹۲/۶۶ ± ۰/۸۸ ^{Aa}	۷۷/۶۶ ± ۲/۰۲ ^{Bb}	۵۶/۳۳ ± ۲/۰۴ ^{Bc}
زنده‌مانی (درصد)	کنترل	۹۶/۶۶ ± ۰/۸۸ ^{Aa}	۸۲/۶۶ ± ۰/۸۸ ^{Ab}	۷۰/۳۳ ± ۱/۶۶ ^{Ac}
	L۴۰	۹۶/۶۶ ± ۱/۲۰ ^{Aa}	۸۵/۶۶ ± ۰/۸۹ ^{Ab}	۷۶/۶۶ ± ۱/۲۰ ^{ABc}
	L۸۰	۹۴/۳۳ ± ۱/۷۵ ^{Aa}	۸۶/۰۰ ± ۱/۷۳ ^{Ab}	۸۱/۰۰ ± ۱/۵۲ ^{Bb}
	L۱۶۰	۹۵/۳۳ ± ۰/۳۳ ^{Aa}	۸۵/۰۰ ± ۲/۳۰ ^{Ab}	۸۱/۶۶ ± ۱/۲۰ ^{Bb}

^{A,B} حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (p < ۰/۰۵) بین گروه‌های آزمایش در هر زمان است.
^{a,b,c} حروف کوچک متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (p < ۰/۰۵) بین زمان‌های مختلف در یک گروه آزمایش است.

غلظت مالون دی‌آلدهید در محیط نگه‌داری اسپرم در ساعت صفر بین گروه‌های آزمایش تفاوت معنی‌دار نشان نداد (شکل ۱)، درحالی‌که مقدار مالون دی‌آلدهید در ساعت‌های ۲۴ و ۴۸ پژوهش درگروه‌های L۸۰ و L۱۶۰ کمتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵، شکل ۱)؛ همچنین آنالیز درون گروهی نشان داد که غلظت مالون دی‌آلدهید در گروه‌های کنترل و L۴۰ در ساعت ۲۴ و ۴۸ پژوهش بالاتر از زمان صفر بود (P<۰/۰۵، شکل ۱).

غلظت مالون دی‌آلدهید در اسپرم خروس در ساعت صفر بین گروه‌های آزمایش تفاوت معنی‌دار نشان نداد (شکل ۲)، در حالیکه مقدار مالون دی‌آلدهید در ساعت ۲۴ و ۴۸ پژوهش درگروه‌های L۸۰ و L۱۶۰ کمتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵، شکل ۲)؛ همچنین آنالیز درون گروهی نشان داد که غلظت مالون دی‌آلدهید در گروه‌های کنترل، L۴۰ و L۸۰ در ساعت ۴۸ پژوهش بالاتر از ساعت صفر بود (شکل ۲).

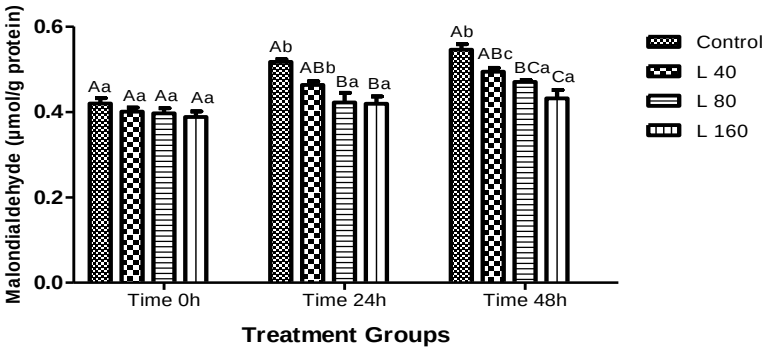
ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در محیط نگه‌داری اسپرم در ساعت صفر بین گروه‌های آزمایش تفاوت معنی‌دار نشان نداد (شکل ۳)، در حالیکه مقدار ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در ساعت ۲۴ و ۴۸ پژوهش در گروه‌های L۸۰ و L۱۶۰ بیشتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵، شکل ۳)؛ همچنین آنالیز درون گروهی نشان داد که ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های کنترل و L۴۰ در ساعت ۲۴ و ۴۸ پژوهش کمتر از زمان صفر بود (P<۰/۰۵، شکل ۳).

ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در اسپرم خروس در ساعت صفر بین گروه‌های آزمایش تفاوت معنی‌دار نشان نداد (شکل ۴)، در حالیکه ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در ساعت ۲۴ و ۴۸ پژوهش درگروه‌های L۸۰ و L۱۶۰ بیشتر از

www.SID.ir

Archive of SID

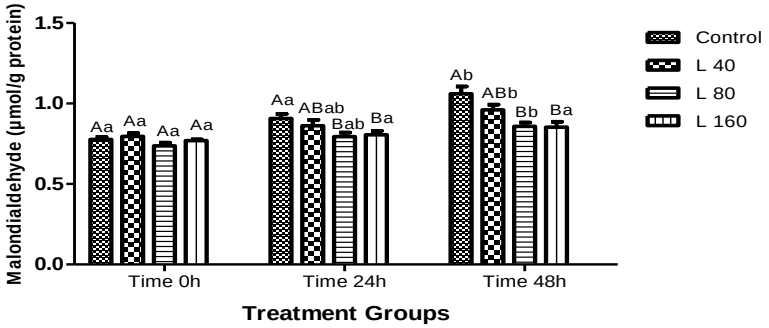
گروه کنترل بود (P<۰/۰۵، شکل ۴)؛ همچنین آنالیز درون گروهی نشان داد که ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های کنترل، L۴۰ و L۸۰ در ساعت ۴۸ پژوهش کمتر از زمان صفر بود (P<۰/۰۵، شکل ۴).



شکل ۱- غلظت مالون دی‌آلدهید (میکرومول در گرم پروتئین) در محیط نگه‌داری اسپرم خروس متعاقب غنی‌سازی منی با غلظت‌های مختلف اسید لینولنیک و نگه‌داری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت

^{A,B,C} حروف بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش در هر زمان است.

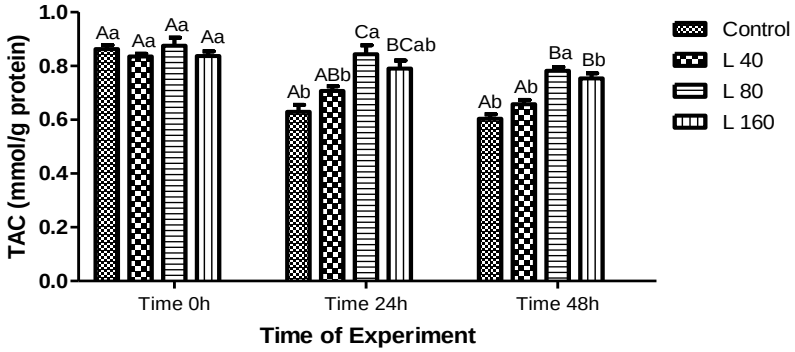
^{a,b,c} حروف کوچک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های مختلف در یک گروه آزمایش است.



شکل ۲- غلظت مالون دی‌آلدهید (میکرومول در گرم پروتئین) در اسپرم خروس متعاقب غنی‌سازی منی با غلظت‌های مختلف اسید لینولنیک و نگه‌داری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت

^{A,B} حروف بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش در هر زمان است.

^{a,b} حروف کوچک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های مختلف در یک گروه آزمایش است.



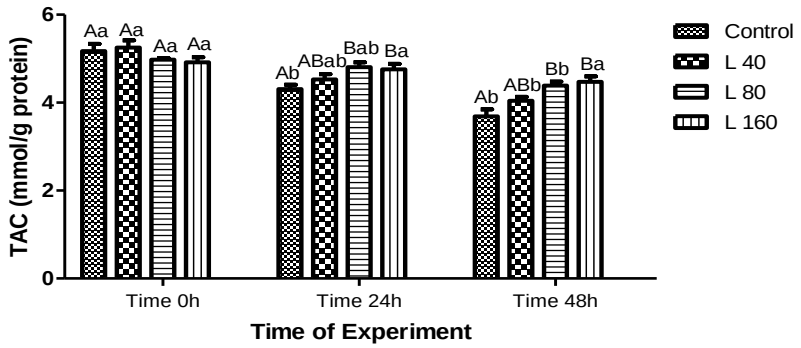
شکل ۳- ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (میلی‌مول در گرم پروتئین) در محیط نگه‌داری اسپرم خروس متعاقب غنی‌سازی منی با غلظت‌های مختلف اسید لینولنیک و نگه‌داری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت

^{A,B,C} حروف بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش در هر زمان است.

^{a,b} حروف کوچک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های مختلف در یک گروه آزمایش است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴– ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (میلی‌مول در گرم پروتئین) در اسپرم خروس متعاقب غنی‌سازی منی با غلظت‌های مختلف اسید لینولنیک و نگه‌داری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت

[A,B] حروف بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروههای آزمایش در هر زمان است.

[a,b] حروف کوچک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های مختلف در یک گروه آزمایش است.

بحث

استرس اکسیداتیو به معنی افزایش تولید رادیکال‌های آزاد یا کاهش فعالیت مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی است که منجر به آسیب سلولی و اختلال در عملکرد بافت درگیر می‌شود. پراکسیداسیون لیپید غشای سلول و لیپو پروتئین‌های پلاسما اولین وقایعی هستند که در شروع استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شوند (۳۳). محتوای لیپیدی منی طیور یک عامل تعیین‌کننده‌ی مهم در کیفیت و توانایی باروری آن است (۱۵). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که اسپرم طیور به دلیل سطوح بالای اسیدهای چرب غیراشباع، به پراکسیداسیون لیپید حساس است و احتمالاً دلیل کاهش قدرت زنده‌مانی، کاهش حرکت و کاهش توانایی بارورسازی اسپرم در نگه‌داری در آزمایشگاه با همین موضوع مرتبط باشد (۳۵). سیستم محافظت آنتی‌اکسیدانی از سیتوپلاسم اسپرم منشا می‌گیرد، ولی اسپرم بیشتر حجم سیتوپلاسم خود را در مراحل پایانی تمایز از دست می‌دهد. در نتیجه سطوح کافی از آنتی‌اکسیدان‌ها برای ممانعت از آسیب رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپید در اسپرم وجود ندارد (۱۰). مواد مغذی آنتی‌اکسیدانی برای محدود کردن آسیب‌های ناشی از واکنش‌های اکسیداتیو در سلول‌ها بسیار با اهمیت هستند. مطالعات در این حوزه نشان می‌دهد که غنی‌سازی منی بز با تورین موجب کاهش غلظت مالون دی‌آلدهید در مقایسه با گروه کنترل شد (۳)؛ همچنین تغذیه خروس‌ها با کارنتین موجب کاهش میزان مالون دی‌آلدهید در منی شد (۲۹)؛ علاوه بر این اضافه کردن نیم میلی‌مولار اسید پالمیتولئیک و اولئیک به منی خروس باعث کاهش غلظت مالون دی‌آلدهید طی ذخیره‌سازی در دمای یخچال در مقایسه با گروه کنترل شد (۱۷ و ۳۴)؛ در حالیکه در اثر افزودن گلوتاتیون، گلوتاتیون اکسید شده یا سیستئین به منی قوچ (۹) و افزودن زرد چوبه، اینوزیتول و کارنتین به منی بز (۱۰) تغییری در میزان مالون دی‌آلدهید نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد؛ از سوی دیگر افزودن هم‌زمان اتیلن گلایکول و سیستئین به منی گاو موجب افزایش میزان مالون دی‌آلدهید منی شد (۱۳). در پژوهش حاضر غلظت‌های ۸۰ و ۱۶۰ میکرومولار اسید لینولنیک موجب کاهش سطوح مالون دی‌آلدهید در اسپرم و محیط نگه‌داری اسپرم شد. به نظر می‌رسد در منی غنی شده با آنتی‌اکسیدان‌ها با توجه به گونه حیوانی و نوع آنتی‌اکسیدانی که استفاده می‌شود ممکن است میزان مالون دی‌آلدهید کاهش یا افزایش یابد یا نسبت به گروه کنترل تغییری نداشته باشد. در پژوهش پیش‌رو، غنی‌سازی منی با اسید لینولنیک موجب افزایش میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در محیط نگه‌داری و اسپرم شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج پژوهش اخیر مشابه مطالعاتی است که در آن در اثر افزودن آنتی‌اکسیدان‌های تورین و سیستئین به منی قوچ (۹ و ۱۲) و اسید پالمیتولئیک و اولئیک به منی خروس (۱۷ و ۳۴)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت؛ به علاوه نتایج این پژوهش مشابه پژوهش‌هایی است که در آن‌ها میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی در منی سگ و قوچ در اثر افزودن سوپراکسید دیسموتاز به منی افزایش یافت (۱۴ و ۲۷)؛ ولی نتایج پژوهش حاضر برخلاف نتیجه‌ای است که در آن در اثر افزودن آنتی‌اکسیدان‌های گلوتامین و هیالورونان به منی بز میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی تغییری نشان نداد (۱۱). به نظر می‌رسد که اسیدهای چرب غیراشباع می‌توانند قدرت دفاع آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهند و میزان کیناز PI3 را که موجب افزایش قابلیت زنده‌مانی سلول‌ها می‌شود را، بالاتر ببرند (۳۲). در پژوهش حاضر مشاهده شد که اسید لینولنیک میزان مالون دی‌آلدهید را کاهش و میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد و در نهایت منجر به بهبود حرکت پیش‌رونده رو به جلوی اسپرم خروس شد. یکی از مهم‌ترین عواملی که موجب کاهش کیفیت منی می‌شود کاهش میزان حرکت اسپرم است که این کاهش حرکت با افزایش سطوح مالون دی‌آلدهید مرتبط است (۱۰). پیش از این نشان داده شده است که تغذیه با اسید لینولنیک موجب بهبود شاخصه‌های اسپرم در خروس و گاو می‌گردد (۲۳ و ۲۸)؛ علاوه بر این، اضافه کردن اسید لینولنیک به منی گاو موجب بهبود حرکت و زنده‌مانی اسپرم پس از فرایند انجماد- ذوب می‌شود (۲۲). اسید لینولنیک به‌واسطه کاهش آسیب به اسپرم و افزایش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی توانایی محافظت از اسپرم خروس طی نگه‌داری در دمای یخچال را دارد. به طور خلاصه نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که غنی‌سازی منی با اسید لینولنیک می‌تواند اثرات سوء ناشی از پراکسیداسیون لیپید و افزایش میزان مالون دی‌آلدهید را در اسپرم خروس کاهش دهد، در نتیجه می‌توان از اسید لینولنیک به‌عنوان یک افزودنی آنتی‌اکسیدانی در ذخیره‌سازی منی خروس بهره برد.

منابع

1- Aitken, R.J. and Baker, M.A; Oxidative stress and male reproductive biology. Reprod Fertil Develop; 2004; 16: 581-588.

2- Alvarez, J.G. and Storey, B.T; Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. Gamete Res; 1989; 23: 77-90.

3- Ateşşahin, A; Bucak, M.N; Tuncer, P.B. and Kizil, M; Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. Small Ruminant Res; 2008; 77: 38-44.

4- Aurich, J.E; Schonherr, U; Hoppe, H. and Aurich, C; Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled stored stallion semen. Theriogenology; 1997; 48: 185-192.

5- Bakst, M.R. and Cecil, H.C; Techniques for semen evaluation, semenstorage, and fertility determination. The Poultry Science Association, Inc., Savoy, Illinois; 1997; pp. 29-34.

www.SID.ir

Archive of SID

6- Blesbois, E; Grasseau, I. and Blum, J.C; Effects of Vitamin E on fowl semen storage at 4◦C. Theriogenology; 1993; 39: 771-779.

7- Boonsorn, T; Kongbuntad, W; Narkkong, N.A. and Aengwanich, W; Effects of catechin addition to extender on sperm quality and lipid peroxidation in boar semen. American-Eurasian J Agric Environ Sci; 2010; 7: 283-288.

8- Bradford, M.M; A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem; 1976; 7 (72): 248-254.

9- Bucak, M.N; Ateşşahin, A. and Yüce, A; Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. Small Rumin Res; 2008; 75: 128-134.

10- Bucak, M.N; Sariözkan, S; Tuncer, P.B; Sakin, F; Ateşşahin, A; Kulaksiz, R. and Çevik, M; The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircus ancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. Small Rumin Res; 2010; 89: 24-30.

11- Bucak, M.N; Sariözkan, S; Tuncer, P.B; Ulutaş, P.A. and Akçadağ, H.I; Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. Small Rumin Res; 2009; 81: 90-95.

12- Bucak, M.N. and Tekin, N; Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. Small Rumin Res; 2007; 73: 103-108.

13- Büyükleblebici, S; Tuncer, P.B; Bucak, M.N; Eken, A; Sariözkan, S; Taşdemir, U. and Endirlik, B.U; Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. Anim Reprod Sci; 2014; 150: 77-83.

14- Cassani, P; Beconi, M.T. and Flaherty, C.O; Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. Anim Reprod Sci; 2005; 86: 163-173.

15- Cerolini, S; Kelso, K.A; Noble, R.C; Speake, B.K; Pizzi, F. and Cavalchini, L.G; Relationship between spermatozoan lipid

www.SID.ir

Archive of SID

Reprod Fertil; 1995; 103:17-26.

21- Jones, R.M. and Sherins, R; Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. Fertil Steril; 1979; 31: 531-537 .

22- Kaka, A.L; Wahid, H; Rosnina, Y.; Yimer, N; Khumran, A.M; Behan, A.A. and Ebrahimi, M; Alpha-linolenic acid supplementation in tris extender can improve frozen-thawed bull semen quality. Reprod Domest Anim; 2015; 50(1): 29-33.

23- Kelso, K.A; Cerolini, S; Speake, B.K; Cavalchini, L.G. and Noble, R.C; Effects of dietary supplementation with alpha-linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age. J Reprod Fertil; 1997; 110(1): 53-59.

24- Koracevic, D; Koracevic, G; Djordjevic, V; Andrejevic, S. and Cosic, V; Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. J Clin Pathol; 2001; 54: 356-361.

25- Lake, P.E; Fowl semen as collected by the massage method. J Agr Sci; 1957; 49: 120-126.

composition and fertility during aging of chickens. Biol Reprod; 1997; 57: 976-980.

16- Chan, P; Cheng, J.T; Tsao, C.W; Niu, C.S. and Hong, C.Y; The in vitro antioxidant activity of trilinolein and other lipid-related natural substances as measured by enhanced chemiluminescence. Life Sci; 1996; 59(24): 2067-2073.

17- Eslami, M; Ghaniei, A. and Mirzie Rad, H; 2016. Effect of the rooster semen enrichment with oleic acid on the quality of semen during the chilled storage. Poult Sci; 2016; 95: 1418-1424.

18- Frederick S; Hep G2Hepatocyte Lipid Peroxidation Assay. NCLMethod GTA- 4. Version1.1. 2010.

19- Gadea, J; Selles, E; Marco, M.A; Coy, P; Matas, C; Romar, R. and Ruiz, S; Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. Theriogenology; 2004; 62: 690-701.

20- Griveau, J.F; Dumont, E; Renard, P; Callegary, J.P. and Le Lannou, D; Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. J

www.SID.ir

Archive of SID

26- Mangiagalli, M.G; Marelli, S.P; Guidobono Cavalchini, L.; Effect of lycopene on fowl sperm characteristics during in vitro storage. Arch Geflügelkd; 2007; 71: 25-29.

27- Marti, J.I; Marti, E; Cebrian-Perez, J.A. and Muino-Blanco, T; Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. Theriogenology; 2003; 60: 1025-1037.

28- Moallem, U; Neta, N; Zeron, Y; Zachut, M. and Roth, Z; Dietary α-linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen. Theriogenology; 2015; 83(7):1110-1120.

29- Neuman, S.L; Lin, T.L. and Heste, P.Y; The effect of dietary carnitine on semen traits of white Leghorn roosters. Poult Sci; 2002; 81: 495-503.

30- Nolan, C.J. and Larter, C.Z; Lipotoxicity: Why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? J Gastroenterol Hepatol; 2009; 24: 830-840.

31- Ommati, M.M; Zamiri, M.J; Akhlaghi, A; Atashi, H; Jafarzadeh, M.R; Rezvani, M.R. and Saemi, F; Seminal characteristics, sperm fattyacids, and blood biochemical attributes in breeder roosters orallyadministered with sage (Salvia officinalis) extract. Anim Prod Sci; 2013; 53: 548-554.

32- Oudit, G; Sun, H; Kerfant, B; Crackower, M; Penninger, J. and Backx, P; The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. J Mol Cell Cardiol; 2004; 37: 449-471.

33- Parthasarathy, S; Santanam, N; Ramachaandra, S. and Meilhac, O; Oxidants and antioxidants in atherogenesis: an appraisal. J Lipid Res; 1999; 40: 2143-2157.

34- Rad, H.M; Eslami, M. and Ghanie, A; Palmitoleate enhances quality of rooster semen during chilled storage. Anim Reprod Sci; 2016; 165: 38-45.

35- Surai, P.F; Cerolini, S; Wishart, G.J; Spake, B.K; Noble, R.C. and Sparks, N.H.C; Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. Poult Avian Biol Rev; 1998; 9: 11-23.

www.SID.ir

Archive of SID

36- Surai, P.F; Wishart, G.J; Noble, R.C. and Speake, B.K; The relationship between the dietary provision of α – tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation. J Reprod Fertil; 1997; 110: 47-51.

37- Wilcox, F.H; Shaffner, C.S. and Wilson, H.R; Breed differences in storing chicken semen. J Hered; 1961; 52(3): 119-121.

38- Yang, L; Yuan, I; Liu, L; Shi, C; Wang, L; Tian, F; Liu, F; Wang, H; Shao, C; Zhang, Q; Zhinan, C; Qin, W. and Wen, W; α-linolenic acid inhibits human renal cell carcinoma cell proliferation through PPAR-γ activation and COX-2 inhibition. Oncol Lett; 2013; 6:197-202.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of effect of linolenic acid on the quality of rooster semen stored at 4˚ C

Eslami, M.[1*]; Ghaniei, A.[1]; Zadeh Hashem, E.[2]; Norowzi, S.[3]

1. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia- Iran.
2. Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia- Iran.
3. DVM Student, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia-Iran.

Recieved: 8 September 2016 ***Accepted:*** 9 July 2017

Summary

The present study was designed to evaluate the effect of linolenic acid on the quality of rooster semen stored at 4˚ C. Semen was collected from ten roosters twice a week. Good quality ejaculates were pooled and then diluted, the semen was enriched with 0 (control), 40 (L40), 80 (L80) and 160 (L160) µM linoleate. Forward progressive motility (FPM), viability of spermatozoa, values of malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC) in medium and spermatozoa were evaluated at 0, 24 and 48h. The result showed that, FPM was higher in L80 and L160 groups compared to control group at 24 and 48 h ($P<0.05$). Moreover, viability was greater in L80 and L160 groups in comparison with the control group at 48 h ($P<0.05$). Values of MDA were lower and values of TAC were greater in L80 and L160 groups in medium and spermatozoa compared to control group at 24 and 48 h ($P<0.05$). In conclusion, enrichment with of semen 80 and 160 µM linoleate could enhance quality of rooster semen stored at fridge temperature.

Keywords: Linolenic acid, Rooster, Sperm, Semen.

* Corresponding Author E-mail: M.eslami@urmia.ac.ir

www.SID.ir