13 (2) 143-148, Summer 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effect of adding pentoxifylline to the Ross rooster semen on quality parameters of spermatozoa during 6 hours of storage at cooling temperature

Mahdi Nazari, Hossein Daghigh Kia *

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

Key Words

Pentoxifylline
Motility
Lipid peroxidation
Sperm

Abstract

Introduction: The most important factors involved in sperm fertility are motility, morphology and sperm membrane integrity. The studies show that, the addition of Pentoxifylline (PTX) can increase sperm motility by increasing energy production. The aim of the present study was to investigate the effect of adding Pentoxifylline to rooster semen on qualitative parameters of rooster sperm after 6 hours of storage at 4°C.

Materials & Methods: Semen samples were collected from 15 Ross 308 roosters at 28 weeks of age. After initial evaluations, semen samples were mixed together to eliminate individual differences. After diluting the semen and adding different levels of Pentoxifylline (0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 µM), the samples were kept at 4°C for 6 hours. Then, sperm kinetic parameters were evaluated.

Result: The results showed that the addition of 0.75 µM PTX significantly improved progressive mobility, curvilinear velocity, viability and plasma membrane integrity of spermatozoa compared to the control group ($P<0.05$).

Conclusion: In overall, it can be concluded that methylxanthine-derived drugs such as Pentoxifylline can have a significant effect on the motility, viability and plasma membrane integrity of rooster sperm in the short period of time.

* Corresponding Author's email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

Received: 23 May 2020; Reviewed: 11 July 2020; Revised: 28 September 2020; Accepted: 3 November 2020
(DOI): 10.22034/aej.2020.136439

مقاله پژوهشی

اثر پنتوکسی‌فیلین افزوده شده به منی خروس نژاد راس، بر فرآسنجه‌های کیفی اسپرم طی ۶ ساعت نگه‌داری در دمای سردسازی

*مهدی نظری، حسین دقیق‌کیا**

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

کلمات کلیدی

پنتوکسی‌فیلین
جنبایی
پراکسیداسیون لیپید
اسپرم

چکیده

مقدمه: از مهم‌ترین عوامل دخیل در باروری اسپرم می‌توان به تحرک، مورفولوژی و سلامت غشای پلاسمایی آن اشاره کرد. مطالعات حاکی از آن است که افزودن پنتوکسی‌فیلین می‌تواند از طریق افزایش تولید انرژی، تحرک اسپرم‌ها را افزایش دهد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر افزودن پنتوکسی‌فیلین به منی خروس بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس بعد از ٦ ساعت نگه‌داری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد بود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های منی از ۱۵ قطعه خروس راس ۳۰۸ در سن ۲۸ هفتگی جمع‌آوری شدند. پس از ارزیابی‌های اولیه، به‌منظور حذف تفاوت‌های فردی، نمونه‌های منی با یکدیگر مخلوط شدند. پس از رقیق‌سازی منی و افزودن سطوح مختلف پنتوکسی‌فیلین (PTX) (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میکرومولار)، نمونه‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٦ ساعت نگه‌داری شدند. سپس، فرآسنجه‌های کیفی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج نشان دادند که افزودن ۰/۷۵ PTX به‌طور معنی‌داری تحرک پیش‌رونده، سرعت اسپرم در مسیر طی شده، زنده‌مانی و سلامت غشاء اسپرم را نسبت به گروه شاهد بهبود بخشید ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری و بحث: به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که داروهای مشتق متیل‌گزانتین نظیر پنتوکسی‌فیلین می‌تواند در مدت کوتاهی تأثیر به‌سزایی بر تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم خروس ایفا کنند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: daghighkia@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۳ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۲۱ تیر ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۷ مهر ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳ آبان ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.136439

مقدمه

تلقیح مصنوعی در دسترس‌ترین و رایج‌ترین تکنیک مورد استفاده برای پرورش حیوانات اهلی است. با توجه به پیشرفت‌های اخیر در اسپرم‌گیری و تکنیک تلقیح مصنوعی پرندگان، به‌نظر می‌رسد حفظ کیفیت اسپرم‌ها تا زمان تلقیح، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد. یکی از فاکتورهای کلیدی تعیین‌کننده موفقیت در تکنیک تلقیح مصنوعی تحرک مناسب اسپرم‌ها است (Lecewicz و همکاران، ۲۰۱۹). رادیکال‌های آزاد به‌وسیله آزادسازی الکترون‌های اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها باعث آسیب‌های برگشت‌ناپذیر به سلول می‌شوند (Wang و همکاران، ۱۹۹۷). رادیکال‌های آزاد بیش‌تر به‌وسیله سیستم آنتی‌اکسیدانی خود مایع منی حذف می‌شوند(صفاو همکاران، ۱۳۹۵). آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد دارند. در صورت آسیب یا از بین رفتن این سیستم، پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم منجر بـه آسیب‌های ساختاری و عملکردی به سلول می‌شود (Baumber و همکاران، ۲۰۰۰). تحرک اسپرم‌ها نقش مهمی در موفقیت لقاح مصنوعی داشته و به‌عنوان یکی از فاکتورهای مهم ارزیابی کیفی اسپرم مطرح می‌باشد (صادقی و همکاران، ۱۳۹۸)، در بسیاری از تحقیقات، از مواد مختلفی برای بهبود کیفیت منی منجمد و مایع استفاده‌شده است. پنتوکسی‌فیلین (PTX) می‌تواند به‌عنوان محافظت‌کننده در برابر ROS عمل کند، هم‌چنین باعث محافظت و یکپارچگی غشاء سلول شده (Yovich، ۱۹۹۳) و در فعالیت تولیدمثلی برای افزایش تحرک اسپرم استفاده می‌شود(Banihani و Abu-Alhayjaa، ۲۰۱۶). از دیدگاه بیوشیمیایی فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم پرندگان از اسیدهای چرب غیراشباع نظیر اسیدآراشیدونیک و دوکوزاتترانوئیک تشکیل شده است. میزان بالای اسیدچرب در غشای پلاسمایی اسپرم، آن‌ها را به پراکسیداسیون لیپیدی حساس می‌کند که یکی از دلایل اصلی ناباروری در جنس نر این فرایند می‌باشد. درنتیجه غشای پلاسمایی اسپرم باید توسط یک سیستم آنتی‌اکسیدانی محافظت شود تا از آسیب اکسیداتیو طی ذخیره برون‌تنی جلوگیری شود (Zhandi و Sharafi، ۲۰۱۵). در این راستا، Bréque و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم خروس و بوقلمون در ساعت‌های اولیه ذخیره برون‌تنی در دمای صفر و دمای بدن روی می‌دهد. تشکیل پراکسیدان‌ها در نگه‌داری برون‌تنی اسپرم با تغییراتی در جنبایی، توانایی ادغام اسپرم-اووسیت و کاهش باروری همراه است (Zhandi و Sharafi، ۲۰۱۵) باوجود روش‌های دفاعی بسیار سازمان‌یافته علیه پراکسیداسیون چربی‌ها، سیستم 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 به‌نظر می‌رسد. محبوب‌ترین محرک‌های تحرک اسپرم شامل متیل گزانتین‌ها ازجمله کافئین و پنتوکسی‌فیلین (PTX) هستند که مهارکننده‌های رقابتی و غیرانتخابی فسفودی استراز بوده و باعث افزایش غلظت cAMP داخل سلولی و فسفوریلاسیون تیروزین در ناحیه دم اسپرم می‌شوند (Brie و همکاران، ۲۰۱۶). PTX هم‌چنین باعث کاهش آنیون‌های سوپراکسید و پراکسیداسیون لیپیدهای مرتبط با آسیب غشای اسپرم می‌شود (Zhang و همکاران، ۲۰۰۵). پنتوکسی‌فیلین علاوه بر افزایش تحرک اسپرم‌ها، خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز دارد (Gavella و همکاران، ۱۹۹۱). این ترکیب در فناوری تولید مثلی انسان نیز کاربرد داشته (Guasti و همکاران، ۲۰۱۷) و میزان لقاح را افزایش می‌دهد (Kovačič و همکاران، ۲۰۰۶). PTX و cAMP طول مدت فعالیت اسپرم‌ها را افزایش می‌دهند. تیمارهایی که سبب افزایش سطوح cAMP می‌شوند، اغلب منجر به افزایش تحرک و سرعت اسپرم شده و هم‌چنین آگونیست القای واکنش آکروزومی هستند. در صورت افزودن PTX به محیط سردسازی اسپرم نریان، پارامترهای تحرک پیش‌رونده، سرعت حرکت، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها پس از ۴۸ ساعت سردسازی بهبود معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند (Goulart و همکاران، ۲۰۰۰). پنتوکسی‌فیلین علاوه بر افزایش تحرک اسپرم‌ها، دارای خاصیت آنتی اکسیدانی نیز است (Gavella و همکاران، ۱۹۹۱). با توجه به مرور منابع، گزارش مکتوبی از بررسی افزودن PTX در محیط سردسازی منی خروس بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم یافت نشد. بنابراین هدف از این مطالعه، ارزیابی تأثیر برون‌تنی پنتوکسی‌فیلین بر فراسنجه‌های تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی و مورفولوژی اسپرم خروس راس ۳۰۸ تحت شرایط نگه‌داری منی به حالت مایع در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶ ساعت بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در واحد مرغداری ایستگاه تحقیقاتی و پژوهشی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز انجام پذیرفت. بدین‌منظور از ۱۵ قطعه خروس نژاد راس ۳۰۸ با سن ۲۸ هفته استفاده شد. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی به ابعاد ۸۵×۷۰×۷۰ سانتی‌متر و تحت شرایط ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی قرار داشته که با جیره یکسان ۱۵۰ گرم 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

عادت‌دهی شده و اسپرم‌گیری هر هفته دو بار انجام گرفت. نمونه‌های اسپرم بلافاصله توسط فلاسک حاوی آب گرم ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به آزمایشگاه فیزیولوژی تولیدمثل دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز واقع در جاده باسمنج منتقل شدند. پس از رسیدن نمونه‌ها به آزمایشگاه، ابتدا اسپرم‌ها ازنظر حجم، غلظت و رنگ بررسی شده و تنها نمونه‌هایی با حجم ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌لیتر و تحرک بیش از ۸۰ درصد مورد استفاده قرار گرفتند. برای از بین بردن اثرات انفرادی، نمونه‌های تأیید شده با یکدیگر مخلوط شدند. به‌منظور رقیق‌سازی اسپرم‌ها از رقیق‌کننده لیک (فروکتوز ۰/۸گرم، پتاسیم‌سیترات ۰/۵گرم، سدیم‌الگلوتامات ۱/۹۲گرم، پلی‌وینیل پیرولیدون ۰/۳گرم، منیزیم‌استات ۰/۰۷گرم، گلیسین ۰/۳۷۴گرم، لستین ۱گرم، آب دو بار تقطیر ۱۰۰ میلی‌لیتر) استفاده گردید. پس از آماده‌سازی رقیق‌کننده، ۲ میلی‌لیتر از محلول را داخل ۵ لوله استریل ریخته و به هر لوله براساس گروه‌های آزمایشی، آنتی‌اکسیدان موردنظر اضافه گردید. گروه‌های آزمایشی عبارت بودند از: صفر (گروه شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میکرومولار PTX. مواد شیمیایی مورد استفاده و پنتوکسی‌فیلین (وزن مولکولی:۲۸۷/۳۱، MDL Number: MFCD00063379، EC number: 229-374-5، CAS number: 6493-05-6 و Pub chem substance ID: 24278190) در مطالعه حاضر از شرکت سیگما آلمان تهیه شدند. پس از مخلوط سازی PTX با رقیق‌کننده، نمونه اسپرم به نسبت ۱ به ۲۰ به‌داخل هر لوله اضافه گردیده و پس از بستن درب لوله‌ها به‌داخل یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. بعد از گذشت ۶ ساعت، نمونه‌های موردنظر از یخچال خارج‌گردیده و درداخل بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از ۱ دقیقه و متعادل شدن دما، نمونه‌ها از نظر تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشاء و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. تمامی مراحل فوق در ۵ مرحله تکرارشد.

تحرک اسپرم: جهت ارزیابی فراسنجه‌های تحرک کل، پیش‌رونده، ۵ میکرولیتر از نمونه منی را روی لام قرار داده و بعد از پوشاندن با لامل زیر میکروسکوپ قرار داده شد. از هر نمونه حداقل ۱۰ فیلد به‌طور کاملاً تصادفی انتخاب‌شده و پارامترهای تحرک کل و تحرک پیش‌رونده و پارامترهای سرعتی حداقل ۲۰۰ اسپرم به‌وسیله سیستم CASA مورد ارزیابی قرار گرفتند (Najafi و همکاران ۲۰۱۴).

ارزیابی زنده‌مانی: برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین - نیگروزین استفاده گردید. بدین‌منظور یک قطره از اسپرم رقیق شده از هر گروه بر روی یک لام قرار گرفته و با یک قطره کوچک از رنگ ائوزین نیگروزین مخلوط گردید، سپس گسترش تهیه شده و پس از خشک شدن، توسط میکروسکوپ فاز کنتراست Labomed LX400; labomed Inc., Culver City, CA, (USA) با بزرگ‌نمایی×۴۰۰ و شمارش ۲۰۰ اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده(رنگ‌نشده)و مرده(رنگ‌شده) تعیین شدند (دقیق‌کیا و همکاران، ۱۳۹۷).

سلامت غشای پلاسمایی اسپرم (HOST): برای ارزیابی سلامت غشا اسپرم از آزمون هاست استفاده شد. برای این منظور، ۱۰ میکرو لیتر از مایع منی را با ۱۰۰ میکرولیتر محیط هایپواسموتیک هاست مخلوط کرده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای C°۳۷ انکوبه شد. سپس، درصد اسپرم‌های با دم و ناحیه میانی متورم و پیچ خورده با شمارش ۲۰۰ اسپرم و بزرگ‌نمایی×۴۰۰ تحت میکروسکوپ فاز کنتراست تعیین گردید (Evans، ۱۹۸۷).

ناهنجاری‌های مورفولوژیکی: برای ارزیابی ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم از محلول هانکوک استفاده‌شد(Hancock، ۱۹۵۶) برای این منظور، ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه منی به ۱۵۰ میکرولیتر از محلول هانکوک افزوده شد، 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 ۴۰۰×، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی و ناهنجار محاسبه شدند (واحدی و هدایت ایوریق، ۱۳۹۸).

آنالیز آماری: مطالعه حاضر دارای ۴ تیمار در ۵ تکرار بود داده‌های به‌دست آمده برای پارامترهای درصد تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، پاسخ به محلول HOST و هانکوک اسپرم‌های خروس راس پس از گذشت ۶ ساعت از سردسازی به حالت مایع، به‌وسیله رویه GLM با نرم‌افزار SAS (نسخه ۹.۳) در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آنالیز قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی استفاده شد. $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$

(Y_{ij} = شاهد ij ام، μ = میانگین جمعیت، T_i = اثر تیمارها، e_{ij}= اثر عوام ناشناخته ij ام $i=(۱-۱۰)$ ، $j=(۱-۵)$)

نتایج

اثر افزودن سطوح مختلف PTX به منی خروس بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم متعاقب سردسازی و نگه‌داری نمونه‌ها به‌مدت ۶ ساعت تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهند که افزودن ۰/۷۵ میکرومولار از PTX به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد حرکت پیش‌رونده و سرعت در مسیر طی شده اسپرم‌های سردسازی شده را بهبود بخشید ($P<۰/۰۵$). از نظر سایر فراسنجه‌های حرکتی، افزودن این ماده تمایل به بهبودی نشان داد ولی تفاوت این تیمارها با شاهد معنی‌دار نیست. نتایج حاصل از افزودن PTX در سطوح مختلف بر فراسنجه‌های زنده‌مانی، اسپرم سالم و یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم خروس در جدول ۲ ارائه شده است. بررسی‌ها نشان دادند که افزودن ۰/۷۵ میکرومولار از پنتوکسی‌فیلین

به‌طور معنی‌داری سبب حفظ یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها و افزایش درصد زنده‌مانی آن‌ها پس از ۶ ساعت سردسازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد می‌شود (P<۰/۰۵).هیچ‌تفاوت معنی‌داری در درصد اسپرم‌های با مورفولوژی ناهنجار بین گروه‌های تیماری در مقایسه با تیمار شاهد پس از ۶ ساعت سردسازی، مشاهده نشد.

جدول ۱: فراسنجه‌های حرکتی اسپرم خروس طی نگه‌داری برون‌تنی به‌مدت ۶ ساعت در رقیق‌کننده لیک همراه با غلظت‌های متفاوت پنتوکسی‌فیلین

متغیر	سطوح مختلف پنتوکسی‌فیلین(میکرو لیتر)					خطای معیار میانگین	P-value
	شاهد	۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵	۱		
تحرک پیش‌رونده (درصد)	۵۸/۸۰^{b}	۵۹/۲۰^{b}	۵۹/۲۰^{b}	۶۲/۰۰^{a}	۵۹/۸۰^{ab}	۰/۵۸	۰/۰۰۶
تحرک‌کل (درصد)	۹۱/۴۰	۹۱/۴۰	۹۱/۸۰	۹۴/۶۰	۹۲/۸۰	۰/۹۳	۰/۱۲
حرکت مستقیم (درصد)	۷۵/۰۸	۷۴/۸۲	۷۱/۲۹	۷۶/۲۷	۷۴/۶۹	۲/۴۱	۰/۲۹
حرکت خطی (درصد)	۳۵/۷۷	۳۶/۹۲	۳۲/۲۹	۳۷/۵۵	۳۴/۱۲	۱/۶۱	۰/۷۳
سرعت در مسیر طی شده (میکرومتر بر ثانیه)	۱۲۴/۵۷^{b}	۱۲۵/۶۹^{ab}	۱۲۶/۱۴^{ab}	۱۳۲/۵۷^{a}	۱۲۳/۲۹^{b}	۱/۵۹	۰/۰۰۶
سرعت در خط مستقیم (میکرومتر بر ثانیه)	۴۴/۵۶	۴۶/۴۹	۴۴/۶۶	۴۹/۷۹	۴۲/۹۵	۲/۳۹	۰/۳۴
میانگین سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر بر ثانیه)	۵۹/۸۲	۶۲/۱۶	۶۲/۵۷	۶۵/۳۳	۶۱/۵۱	۲/۸۴	۰/۷۴
بیش‌ترین دامنه حرکت‌های جانبی (میکرومتر)	۳/۹۳	۳/۸۴	۴/۳۱	۴/۴۰	۴/۰۶	۰/۱۸	۰/۱۸
فرکانس حرکت‌های جانبی (هرتز)	۱۴/۶۳	۱۴/۷۴	۱۲/۹۹	۱۳/۹۸	۱۵/۰۴	۰/۷۴	۰/۳۴

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

جدول ۲: فراسنجه‌های عملکردی اسپرم خروس طی نگه‌داری به‌مدت ۶ ساعت در غلظت‌های متفاوت پنتوکسی‌فیلین

متغیر	سطوح مختلف پنتوکسی‌فیلین (میکرولیتر)					خطای معیارمیانگین	P-value
	شاهد	۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵	۱		
زنده مانی (درصد)	۹۲/۲۸^{b}	۹۳/۸۲^{ab}	۹۴/۰۱^{ab}	۹۶/۶۷^{a}	۹۳/۸۹^{ab}	۰/۹۱	۰/۰۳۹
اسپرم با مورفولوژی ناهنجار (درصد)	۷/۴۰	۷/۵۳	۷/۴۰	۷/۱۵	۷/۱۶	۰/۳۶	۰/۹۳
یکپارچگی غشاء پلاسمائی (درصد)	۸۷/۳۳^{b}	۸۸/۴۷^{ab}	۸۸/۶۹^{ab}	۹۲/۲۶^{a}	۸۹/۸۷^{ab}	۰/۹۸	۰/۰۲۳

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

بحث

تحرک اسپرم یکی از مهم‌ترین فراسنجه‌هایی است که به شدت با توانایی اسپرم برای انتقال در سراسر مجاری تناسلی ماده برای رسیدن، واکنش و بارور کردن اووسیت مرتبط است. علت ناباروری جنس نر ممکن است به‌خاطر کاهش قابل توجه در تعداد اسپرم‌های متحرک و یا اختلال در کیفیت حرکتی اسپرم باشد (Rad و همکاران، ۲۰۱۶). تحرک اسپرم یکی از مهم‌ترین ویژگی‌ها برای ارزیابی قدرت باروری اسپرم انزال شده است. نشان داده شده است که لقاح تخمک انسان و حیوانات در شرایط آزمایشگاهی ارتباط مثبتی با تحرک اسپرم دارد (Bongso و همکاران، ۱۹۸۹). مطالعات پیشین نشان داد که ویژگی‌های حرکتی اسپرم رابطه مستقیمی با عملکرد باروری دارد (Januskauskas و همکاران، ۲۰۰۳)، به‌طوری‌که اسپرم‌های با سرعت حرکتی بیش‌تر شانس بالاتری برای رسیدن به محل لقاح دارند. عوامل متعددی می‌تواند تحرک اسپرم را کاهش بدهد، از مهم‌ترین دلایل کاهش کیفیت اسپرم در نگه‌داری برون‌تنی،می‌توان به تنش اکسیداتیو اشاره کرد. به‌دلیل القای تنش اکسیداتیو و آسیب به غشاء پلاسمایی اسپرم، تحرک و طول عمر اسپرم‌ها پس از انجماد کاهش پیدا می‌کند (Stephens و همکاران، ۲۰۱۳). تأثیر مشتقات متیل گزانتین ازجمله کافئین و PTX در مطالعات قبلی بر روی اسپرم خوک، گاو، گاومیش، انسان، قوچ، سگ و نریان گزارش شده است (Milani و همکاران، ۲۰۱۰). اسپرم خروس نسبت به اسپرم پستانداران دارای اسیدهای چرب غیراشباع بیش‌تری در غشاء خود است، این امر موجب افزایش حساسیت اسپرم خروس به پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (Besbos و همکاران، ۱۹۹۳) که نهایتاً سبب افزایش آسیب‌هایی نظیر کاهش زنده‌مانی، تحرک و قابلیت باروری طی فرآیندهای نگه‌داری اسپرم می‌شود (Suai و همکاران، ۱۹۹۸). این در حالی است که افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مناسب به محیط نگه‌داری اسپرم طیور می‌تواند تا حدی از شدت آسیب‌های وارده به اسپرم کاسته و کیفیت اسپرم را طی‌فرآیندهایی نظیر سردسازی و انجماد افزایش‌دهد(Radو همکاران، ۲۰۱۶). PTX در سطح گسترده در تکنیک‌های کمک باروری انسانی به‌منظور تحریک حرکات دم اسپرم‌های اپیدیدیم و اسپرم‌های انزال شده با تحرک پایین استفاده می‌شود که با استفاده از این روش میزان باروری اسپرم‌ها بهبود می‌یابد (Tardif و همکاران، ۲۰۱۴). PTX به عنوان مهارکننده آنزیم فسفودی استراز از تفکیک cAMP جلوگیری می‌کند و از طریق افزایش فعالیت مسیر گلیکولیز و تولید مقادیر زیادی cAMP اثر مثبت در عملکرد اسپرم دارد (Lardy و همکاران، ۱۹۷۱). در سلول اسپرم cAMP باعث فعال شدن آنزیم پروتئین کیناز

می‌شود، این آنزیم در فسفوریلاسیون تیروزین دم اسپرم نقش مهمی دارد و مسیر تنظیمی مهمی در فرایند کاپاسیتاسیون اسپرم محسوب می‌شود (Brie و همکاران، ۲۰۱۶). از PTX در درمان ناهنجاری‌های بیضه موش و انسان استفاده شده است که منجر به بهبود کیفیت اسپرم و باروری آن‌ها شده است (Esteves و همکاران، ۲۰۰۷). محققین نشان دادند که افزودن PTX قبل از انجماد به اسپرم‌های انسانی با کیفیت پایین، نتوانست از کاهش واکنش آکروزومی القاء شده طی انجماد، جلوگیری کند، هم‌چنین هیچ بهبودی از نظر پارامترهای زنده‌مانی و تحرک اسپرم مشاهده نشد. این نتایج ضد و نقیض می‌تواند به‌دلیل تفاوت گونه‌ای، منشا اسپرم (اپیدیدیم، تازه، سردسازی شده و منجمد شده)، بخش باقی‌مانده از سمینال پلاسما در اسپرم‌های سردسازی شده و واکنش بین ترکیبات رقیق‌کننده باشد. علارغم اینکه PTX توانایی بهبود پارامترهای حرکتی اسپرم گونه‌های مختلف را پس از یخ‌گشایی دارد، اما تاکنون در مورد اثر این ماده روی مهم‌ترین پارامترهای عملکردی اسپرم در محیط سردسازی اسپرم‌خروس گزارشی انجام نشده است (Esteves و همکاران، ۲۰۰۷). PTX یک ماده مناسب جهت فعال کردن اسپرم‌هایی هست که در پایین‌ترین وضعیت متابولیکی پس از یخ‌گشایی قرار دارند (Brie و همکاران، ۲۰۱۶). افزودن PTX و کافئین در غلظت ۱۰ میلی‌مولار به محیط رقیق‌کننده اسپرم سگ سبب بهبود معنی‌دار پارامترهای تحرکی اسپرم شد (Lecewicz و همکاران، ۲۰۱۹). نتایج اخیر نشان داد که افزودن پنتوکسی‌فیلین در رقیق کننده لیک بر پایه لسیتین در محیط سردسازی اسپرم خروس سبب حفظ زنده‌مانی اسپرم‌های سردسازی شده شدکه مطابق با نتایج Ghasemzadeh و همکاران (۲۰۱۳) بود که بیان کردند اضافه کردن پنتوکسی فیلین با دوز ۳/۶ میکرومول بر نمونه مایع منی مردان مبتلا به آستنوسپرمی باعث افزایش معنی‌دار درصد اسپرم های متحرک و نیز درصد اسپرم‌های با تحرک پیش‌رونده شد. هم‌چنین Goulart و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که افزودن پنتوکسی‌فیلین به‌محیط سردسازی‌اسپرم‌نریان‌سبب بهبود پارامترهای تحرک پیش‌رونده، سرعت، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها پس از ۴۸ ساعت سردسازی نسبت به تیمار شاهد شد. افزودن پنتوکسی‌فیلین به اسپرم‌های گرفته شده از اپیدیدیم نریان منجر به افزایش تحرک و پارامترهای سرعتی آن‌ها شد (Guasti و همکاران، ۲۰۱۷). در اسپرم گاو نر این ماده نتوانست باعث تحریک تحرک اسپرم شود، اما پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون موجب تغییراتی در پارامترهای سرعتی اسپرم شد (Banihani و Abu-Alhayjaa، ۲۰۱۶). افزودن PTX در محیط انجماد اسپرم نریان هیچ اثر مضری بر تحرک اسپرم،زنده‌مانی و فسفوریلاسیون تیروزین نداشت (Guasti و همکاران، ۲۰۱۷). علاوه بر این گزارش‌های محدودی در مورد تاثیر افزودن پنتوکسی‌فیلین روی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها وجود دارد. نتایج مطالعه اخیر افزایش معنی‌دار یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم خروس تحت تأثیر تیمار با سطح ۰/۷۵ میکرومولار PTX نشان داد. همبستگی مثبتی بین درصد اسپرم‌های با غشاء سالم و متحرک در صورت افزودن پنتوکسی‌فیلین به اسپرم موش مشاهده شد (Ponce و همکاران، ۱۹۹۹). پنتوکسی‌فیلین به‌دلیل این‌که هیچ تاثیری بر وضعیت فسفوریلاسیون تیروزین ندارد، می‌تواند در حفظ سلامت غشای پلاسمایی موثر باشد (Guasti و همکاران، ۲۰۱۷). در اثر افزودن پنتوکسی‌فیلین به اسپرم نریان قبل از سردسازی، کاهش قابل توجهی در درصد اسپرم‌های با مورفولوژی نرمال دیده شد. ناهنجاری‌های دم اسپرم می‌تواند منجر به نارسایی در منابع انرژی و نقص در تحرک شود (Goulart و همکاران، ۲۰۰۰). مکانیسم‌های تأثیر پنتوکسی فیلین بر وضعیت اسپرم را می‌توان در چند دسته شامل مهار فسفو دی‌استراز، افزایش تبدیل ATP به cAMP، موثر بر نقل و انتقال داخل سلولی کلسیم و از بین بردن رادیکال‌های آزاد ناشی از دژنراسیون و نکروز اسپرم‌ها خلاصه کرد (Yovich و همکاران، ۱۹۹۳). به‌نظر می‌رسد این موارد می‌تواند توجیه کننده تأثیر مثبت پنتوکسی فیلین در افزایش تحرک و زنده‌مانی اسپرم باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری از نظر مورفولوژی اسپرم‌های‌خروس پس از ۶ ساعت سردسازی، بین گروه‌های آزمایشی و تیمار شاهد وجود نداشت. در مطالعه حاضر، برای اولین بار تاثیر افزودن پنتوکسی‌فیلین به منی خروس بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم طی ۶ ساعت نگه‌داری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزودن ۰/۷۵ میکرومولار PTX به منی خروس، تحرک پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم‌ها را پس از ۶ ساعت سردسازی به‌طور معنی‌داری بهبود بخشید. با توجه به این‌که تحرک پیش‌رونده از مهم‌ترین و کلیدی‌ترین پارامترهای اسپرم برای حصول باروری مطلوب محسوب می‌شود، لذا با حفظ تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها در طول سردسازی می‌توان به نتایج مطلوبی در تلقیح مصنوعی دست یافت.

منابع

۱. **دقیق‌کیا، ح.؛ جعفری، س.؛ مقدم، غ.؛ ابراهیمی، م. و نجفی، ا.، ۱۳۹۷.** تأثیر مکمل‌سازی رقیق‌کننده با سطوح مختلف ال کارنیتین بر کیفیت منی قوچ قزل بعد از فرآیند انجماد یخ‌گشایی در خارج فصل تولیدمثلی. پژوهش‌های تولیدات دامی. سال ۱۹، شماره ۹، صفحات ۴۸ تا ۵۳.

۲. **واحدی، و. و هدایت‌ایورق، ن.، ۱۳۹۸.** بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ با افزودن عصاره نعناع فلفلی در

رقیق‌کننده. فصلنامه محیط‌زیست جانوری. سال ۱۱، شماره ۱، صفحات ۸۳ تا ۹۰.

۳. **صفا، س.؛ مقدم، غ.؛ جعفری‌جوزانی، ر.؛ دقیق‌کیا، ح.؛ جانمحمدی، ح. و نعمتی، ذ.، ۱۳۹۵.** بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامین E و نانوسلنیوم بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس نژاد لگهورن طی نگه‌داری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد. پژوهش‌های علوم دامی (دانش کشاورزی). سال ۴، شماره ۲۶، صفحات ۵۹ تا ۷۰.

۴. **صادقی، ع.؛ پورمظفر، س. و گذری، م.، ۱۳۹۸.** مقایسه برخی از پارامترهای بیوشیمیایی و اسپرم شناختی و اوزون‌برون و فیل‌ماهی. فصلنامه محیط‌زیست جانوری. سال ۱۲، شماره ۲، صفحات ۱۱۷ تا ۱۲۲.

5. **Banihani, S. and Abu-Alhayjaa, R., 2016.** The activity of seminal creatine kinase is increased in the presence of pentoxifylline. Andrologia. Vol. 48, pp: 603-604.
6. **Baumber, J.; Ball, B.A.; Gravance, C.; Medina, V. and Davies-Morel, M.C., 2000.** The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. Journal of andrology. Vol. 21, pp: 895-902.
7. **Blesbois, E.; Grasseau, I. and Blum, J., 1993.** Effects of vitamin E on fowl semen storage at 4 C. Theriogenology. Vol. 39, pp: 771-779.
8. **Bongso, T.A.; Ng, S.C.; Mok, H.; Lim, M.N.; Teo, H.L.; Wong, P.C. and Ratnam, S.S., 1989.** Effect of sperm motility on human in vitro fertilization. Archives of andrology. Vol. 22, pp: 185-190.
9. **Bréque, 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: Incorporating Gamete Research. Vol. 663, pp: 314-323.
10. **Brie, D.; Sahebkar, A.; Penson, P.E.; Dinca, M.; Ursoniu, S.; Serban, M.C.; Zanchetti, A.; Howard, G.; Ahmed, A. and Aronow, W.S., 2016.** Effects of pentoxifylline on inflammatory markers and blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of hypertension. Vol. 34, pp: 2318-2329.
11. **Dziekońska, A.; Fraser, L. and Strzeżek, J., 2009.** Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. J Anim Feed Sci. Vol. 18, pp: 638-649.
12. **Esteves, S.C.; Spaine, D.M. and Cedenho, A.P., 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. Vol. 40, pp: 985-992.
13. **Evans, G., 1987.** Handling & examination of semen. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. pp: 93-106
14. **Januskauskas, A.; Johannisson, A. and Rodriguez Martinez, H., 2003.** Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. Theriogenology. Vol. 60, pp:743-758.
15. **Gavella, M.; Lipovac, V. and Marotti, T., 1991**. Effect of pentoxifylline on superoxide anion production by human sperm. International J of Andrology. Vol. 14, pp: 320-327.
16. **Goulart, H.d.M.; Silva, A.; McManus, C. and Papa, F., 2004a.** Effects of pentoxifylline on the in vitro viability of equine spermatozoids, after cooling at 5 degrees celsius. Revista Brasileira de Zootecnia (Brazil).
17. **Goulart, H.d.M.; Silva, A.E.D.F.; McManus, C. and Papa, F.O., 2004b**. Efeitos da Pentoxifilina sobre a Viabilidade in Vitro dos Espermatozóides de Eqüinos, após o Resfriamento a 5ºC. Revista Brasileira de Zootecnia. Vol. 33, pp: 112-122.
18. **Guasti, P.; Monteiro, G.; Maziero, R.; Carmo, M.; Dell'Aqua Jr, J.; Crespilho, A.; Rifai, E. and Papa, F.; 2017.** Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. Animal reproduction science. Vol. 179, pp: 27-34.
19. **Ghasemzadeh, A.P.; Nouri, M.P.; Sedghiani, M.P.; Yousefzadeh, S. and Fadaei Fouladi, R., 2013.** Effects of pentoxifylline on in vitro sperm motility and viability of infertile males with oligoasthenospermia. The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility. Vol. 15, pp: 1-6.
20. **Hancock, J.L., 1956.** The morphology of boar spermatozoa. J of the Royal Microscopical Society. Vol. 76, pp: 84-97.
21. **Kovačič, B.; Vlaisavljević, V. and Reljič, M., 2006.** Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia. Journal of andrology. Vol. 27, pp: 45-52.
22. **Lardy, H.A.; Garbers, D.L.; Lust, W. and First, N.L., 1971.** Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. Biochemistry. Vol. 10, pp: 1825-1831.
23. **Lecewicz, M.; Strzeżek, R.; Majewska, A.M.; Purpurowicz, P.S. and Kordan, W., 2019.** The effect of different concentrations of caffeine, pentoxifylline and 2'-deoxyadenosine on the biological properties of frozen thawed canine semen. Annals of Animal Science. Vol. 19, pp: 733-746.
24. **Milani, C.; Fontbonne, A.; Sellem, E.; Stelletta, C.; Gérard, O. and Romagnoli, S., 2010.** Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. Theriogenology. Vol. 74, No. 1, pp: 153-164.
25. **Najafi, A.; Kia, H.D.; Mohammadi, H.; Najafi, M.H.; Zanganeh, Z.; Sharafi, M.; Martinez-Pastor, F. and Adeldust, H., 2014.** Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. Cryobiology. Vol. 69, pp: 68-73.
26. **Ponce, A.; Fiol, M.; Ruiz, R.; Vincenti, L.; Santilla, M.; Stutz, G. and Lacuara, J., 1999.** Influence of pentoxifylline on sperm membrane functional integrity. Archives of andrology. Vol. 43, pp: 77-84.
27. **Rad, H.M.; Eslami, M. and Ghanie, A., 2016.** Palmitoleate enhances quality of rooster semen during chilled storage. Animal reproduction science. Vol. 165, pp: 38-45.
28. **Rijsselaere, T.; Van Soom, A.; Maes, D. and Nizanski, W., 2012.** Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: an update after 20 years. Reproduction in Domestic Animals. Vol. 47, pp: 204-207.
29. **Stephens, T.D.; Brooks, R.M.; Carrington, J.L.; Cheng, L.; Carrington, A.C.; Porr, C.A. and Splan, R.K., 2013.** Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on post-thaw motility and longevity of equine frozen semen. Journal of equine veterinary science. Vol. 33, pp: 615-621.
30. **Surai, P.F.; Cerolini, S.; Wishart, G.J.; Speake, B.K.; Noble, R. and Sparks, N.H., 1998.** Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation.
31. **Tardif, S.; Madamidola, O.A.; Brown, S.G.; Frame, L.; Lefievre, L.; Wyatt, P.G.; Barratt, C.L. and Martins Da Silva, S.J., 2014.** Clinically relevant enhancement of human sperm motility using compounds with reported phosphodiesterase inhibitor activity. Human reproduction. Vol. 29, pp: 2123-2135.
32. **Wang, Y.; Sharma, R. and Agarwal, A., 1997.** Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. Urology. Vol. 50, pp: 409-413.
33. **Yovich, J.L., 1993.** Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. Human reproduction. Vol. 8, pp: 1786-1791.
34. **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. Vol. 16, No. 3, pp: 443-448.
35. **Zhang, X.; Sharma, R.K.; Agarwal, A. and Falcone, T., 2005.** Effect of pentoxifylline in reducing oxidative stress induced embryotoxicity. Journal of assisted reproduction and genetics. Vol. 22, pp: 415-417.