

Original Research Paper

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

Mahdi Nazari, Hossein Daghigh Kia*

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

Key WordsPentoxifylline
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 during hours of storage at 4°C.

Materials & Methods: Semen samples were collected from 37 Ross 52 roosters at 4 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, 2047, 207, 2097 and 3 M), the samples were kept at 4°C for 8 hours. Then, sperm kinetic parameters were evaluated.

Result: The results showed that the addition of 0.97 M PTX significantly improved progressive motility, 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 email daghighkia@tabrizu.ac.irReceived: 5 May 2024; Reviewed: 33 July 2024; Revised: 4 September 2024; Accepted: 5 November 2024
(DOI): [10.4242/aej.4242035865](https://doi.org/10.4242/aej.4242035865);

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 فرآسنجه‌های کیفی اسپرم خروس بعد از ۶ ساعت نگهداری در دمای ۴ 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، ۱ و ۰/۷۵ میکرومولار)، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶ ساعت نگهداری شدند. سپس، فرآسنجه‌های کیفی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج نشان دادند که افزودن PTX ۰/۷۵ 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: به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که داروهای مشتق متیل‌گزانترین 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

برون تنی اسپرم طیور ضروری به نظر می‌رسد. محبوب‌ترین محرک‌های تحرک اسپرم شامل متیل گزانتین‌ها از جمله 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 آنتی‌اکسیدانی 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 برون تنی 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 به مدت ۶ ساعت بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در واحد مرغداری ایستگاه تحقیقاتی و پژوهشی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز انجام پذیرفت. بدین منظور 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، کلسیم فسفات ۰/۷۴ درصد، کربنات کلسیم 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

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، به نظر 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 به وسیله آزادسازی الکترون‌های اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها باعث آسیب‌های برگشت‌ناپذیر به سلول می‌شوند (Wang و همکاران، ۱۹۹۷). رادیکال‌های آزاد بیش‌تر به وسیله سیستم آنتی‌اکسیدانی خود مایع منی حذف می‌شوند (صفا و 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 به 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 استفاده شده 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 دوکوزاترآنوئیک 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. در نتیجه غشای پلاسمایی اسپرم باید توسط یک سیستم آنتی‌اکسیدانی محافظت شود تا از آسیب‌اکسیداتیوی ذخیره برون تنی 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 برون تنی در دمای صفر و دمای بدن روی می‌دهد. تشکیل پراکسیدان‌ها در نگهداری برون تنی اسپرم با تغییراتی در جنبایی، توانایی ادغام اسپرم-اوسیت و کاهش باروری همراه است (Zhandi و Sharafi، ۲۰۱۵) با وجود روش‌های دفاعی بسیار سازمان‌یافته علیه پراکسیداسیون چربی‌ها، سیستم آنتی‌اکسیدانی حاضر در اسپرماتوزوای طیور قادر به جلوگیری کامل از اثرات منفی پراکسیداسیون لیپیدی طی نگهداری برون تنی نیست، بنابراین استفاده از یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی در نگهداری

زنده (رنگ نشده) و مرده (رنگ شده) تعیین شدند (دقیق کیا 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 میکرو لیتر محیط هایپواسموتیک هاست مخلوط کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای 37°C انکوبه شد. سپس، درصد اسپرم های با دم و ناحیه میانی متورم و پیچ خورده با شمارش ۲۰۰ اسپرم و بزرگ نمایی $\times 400$ تحت میکروسکوپ فاز کنتراست تعیین گردید (Evans, ۱۹۸۷).

ناهنجاری های مورفولوژیکی: برای ارزیابی ناهنجاری های مورفولوژیکی اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد (Hancock, ۱۹۵۶). برای این منظور، ۱۵ میکرو لیتر از هر نمونه منی به ۱۵۰ میکرو لیتر 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 فاز کنتراست با بزرگ نمایی $\times 400$ درصد اسپرم های با مورفولوژی غیرطبیعی و ناهنجار محاسبه شدند (واحدی و هدایت ایوبی، ۱۳۹۸).

آنالیز آماری: مطالعه حاضر دارای ۴ تیمار در ۵ تکرار بود داده های به دست آمده برای پارامترهای درصد تحرک کل، تحرک پیش رونده، زنده مانی، پاسخ به محلول HOST و هانکوک اسپرم های خروس راس پس از گذشت ۶ ساعت از سردسازی به حالت مایع، به وسیله رویه GLM با نرم افزار SAS (نسخه ۹.۳) در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آنالیز قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی استفاده شد.

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

که در آن Y_{ij} = شاهد ij ام، μ = میانگین جمعیت، T_i = اثر تیمارها، e_{ij} = اثر عوام ناشناخته ij ام

نتایج

اثر افزودن سطوح مختلف PTX به منی خروس بر فراسنجه های حرکتی اسپرم متعاقب سردسازی و نگهداری نمونه ها به مدت ۶ ساعت تحت دمای ۴ درجه سانتی گراد در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان می دهند که افزودن ۰/۷۵ میکرومولار از PTX به طور معنی داری نسبت به تیمار شاهد حرکت پیش رونده و سرعت در مسیر طی شده اسپرم های سردسازی شده را بهبود بخشید ($P < 0.05$). از نظر سایر فراسنجه های حرکتی، افزودن این ماده تمایل به بهبودی نشان داد ولی تفاوت این تیمارها با شاهد معنی دار نیست. نتایج حاصل از افزودن PTX در سطوح مختلف بر فراسنجه های زنده مانی، اسپرم سالم و یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم خروس در جدول ۲ ارائه شده است. بررسی ها نشان دادند که افزودن ۰/۷۵ میکرومولار از پنتوکسی فیلین

عادت دهی شده و اسپرم گیری هر هفته دو بار انجام گرفت. نمونه های اسپرم بلافاصله توسط فلاسک حاوی آب گرم 37°C درجه سانتی گراد به آزمایشگاه فیزیولوژی تولیدمثل دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز واقع در جاده باسمنج منتقل شدند. پس از رسیدن نمونه ها به آزمایشگاه، ابتدا اسپرم ها از نظر حجم، غلظت و رنگ بررسی شده و تنها نمونه هایی با حجم ۰/۲ تا ۰/۷ میلی لیتر و تحرک بیش از ۸۰ درصد مورد استفاده قرار گرفتند. برای از بین بردن اثرات انفرادی، نمونه های تأیید شده با یکدیگر مخلوط شدند. به منظور رقیق سازی اسپرم ها از رقیق کننده لیک (فروکتوز ۰/۸ گرم، پتاسیم سترات ۰/۵ گرم، سدیم الگلوتامات ۱/۹۲ گرم، پلی وینیل پیرولیدون ۰/۳ گرم، منیزیم استات ۰/۷ گرم، گلیسین ۰/۳۷۴ گرم، لستین ۱ گرم، آب دو بار تقطیر ۱۰۰ میلی لیتر) استفاده گردید. پس از آماده سازی رقیق کننده، ۲ میلی لیتر از محلول را داخل ۵ لوله استریل ریخته و به هر لوله براساس گروه های آزمایشی، آنتی اکسیدان مورد نظر اضافه گردید. گروه های آزمایشی عبارت بودند از: صفر (گروه شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میکرومولار PTX. مواد شیمیایی مورد استفاده و پنتوکسی فیلین (وزن مولکولی: ۲۸۷/۳۱، EC number: 229-374-5، MDL Number: MFCD00063379، 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 رقیق کننده، نمونه اسپرم به نسبت ۱ به ۲۰ به داخل هر لوله اضافه گردیده و پس از بستن درب لوله ها به داخل یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد منتقل شدند. بعد از گذشت ۶ ساعت، نمونه های مورد نظر از یخچال خارج گردیده و در داخل بن ماری با دمای 37°C درجه سانتی گراد قرار داده شد و بعد از ۱ دقیقه و متعادل شدن دما، نمونه ها از نظر تحرک، زنده مانی، سلامت غشاء و ناهنجاری های مورفولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. تمامی مراحل فوق در ۵ مرحله تکرار شد.

تحرک اسپرم: جهت ارزیابی فراسنجه های تحرک کل، پیش رونده، ۵ میکرو لیتر 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 به طور کاملاً تصادفی انتخاب شده و پارامترهای تحرک کل و تحرک پیش رونده و پارامترهای سرعتی حداقل ۲۰۰ اسپرم به وسیله سیستم CASA مورد ارزیابی قرار گرفتند (Najafi و همکاران ۲۰۱۴).

ارزیابی زنده مانی: برای ارزیابی میزان اسپرم های زنده و مرده از رنگ آمیزی حیاتی ائوزین - نیگروزین استفاده گردید. بدین منظور 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 بزرگ نمایی $\times 400$ و شمارش ۲۰۰ اسپرم، درصد اسپرم های

اسپریم‌های با مورفولوژی ناهنجار بین گروه‌های تیماری در مقایسه با تیمار شاهد پس از ۶ ساعت سردسازی، مشاهده نشد.

به‌طور معنی‌داری سبب حفظ یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپریم‌ها و افزایش درصد زنده‌مانی آن‌ها پس از ۶ ساعت سردسازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد می‌شود ($P < 0.05$). هیچ تفاوت معنی‌داری در درصد

جدول ۱: فراسنجه‌های حرکتی اسپریم خروس طی نگهداری برون تنی به مدت ۶ ساعت در رقیق‌کننده لیک همراه با غلظت‌های متفاوت پنتوکسی‌فیلین

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

میانگین‌ها با حروف ناهمسان (a,b) بین تیمارها در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است ($P < 0.05$)

جدول ۲: فراسنجه‌های عملکردی اسپریم خروس طی نگهداری به مدت ۶ ساعت در غلظت‌های متفاوت پنتوکسی‌فیلین

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

میانگین‌ها با حروف ناهمسان (a,b) بین تیمارها در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است ($P < 0.05$)

بحث

کافئین و PTX در مطالعات قبلی بر روی اسپریم خوک، گاو، گاو میش، انسان، قوچ، سگ و نریان گزارش شده است (Milani و همکاران، ۲۰۱۰). اسپریم خروس نسبت به اسپریم پستانداران دارای اسیدهای چرب غیراشباع بیش‌تری در غشاء خود است، این امر موجب افزایش حساسیت اسپریم خروس به پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (Besbos و همکاران، ۱۹۹۳) که نهایتاً سبب افزایش آسیب‌هایی نظیر کاهش زنده‌مانی، تحرک و قابلیت باروری طی فرآیندهای نگهداری اسپریم می‌شود (Suai و همکاران، ۱۹۹۸). این در حالی است که افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مناسب به محیط نگهداری اسپریم طیور می‌تواند تا حدی از شدت آسیب‌های وارده به اسپریم کاسته و کیفیت اسپریم را طی فرآیندهایی نظیر سردسازی و انجماد افزایش دهد (Rad و همکاران، ۲۰۱۶). PTX در سطح گسترده در تکنیک‌های کمک باروری انسانی به‌منظور تحریک حرکات دم اسپریم‌های اپیدیدیم و اسپریم‌های انزال شده با تحرک پایین استفاده می‌شود که با استفاده از این روش میزان باروری اسپریم‌ها 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 اسپریم دارد (Lardy و همکاران، ۱۹۷۱). در سلول اسپریم cAMP باعث فعال شدن آنزیم پروتئین کیناز

تحرک اسپریم یکی از مهم‌ترین فراسنجه‌هایی است که به شدت با توانایی اسپریم 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 اسپریم‌های متحرک و یا اختلال در کیفیت حرکتی اسپریم باشد (Rad و همکاران، ۲۰۱۶). تحرک اسپریم یکی از مهم‌ترین ویژگی‌ها برای ارزیابی قدرت باروری اسپریم انزال شده است. نشان داده شده است که لقاح تخمک انسان و حیوانات در شرایط آزمایشگاهی ارتباط مثبتی با تحرک اسپریم دارد (Bongso و همکاران، ۱۹۸۹). مطالعات پیشین نشان داد که ویژگی‌های حرکتی اسپریم رابطه مستقیمی با عملکرد باروری دارد (Januskauskas و همکاران، ۲۰۰۳)، به‌طوری‌که اسپریم‌های با سرعت حرکتی بیش‌تر شانس بالاتری برای رسیدن به محل لقاح دارند. عوامل متعددی می‌تواند تحرک اسپریم را کاهش بدهد، از مهم‌ترین دلایل کاهش کیفیت اسپریم در نگهداری برون‌تنی، می‌توان به تنش اکسیداتیو اشاره کرد. به‌دلیل القای تنش اکسیداتیو و آسیب به غشاء پلاسمایی اسپریم، تحرک و طول عمر اسپریم‌ها پس از انجماد کاهش پیدا می‌کند (Stephens و همکاران، ۲۰۱۳). تأثیر مشتقات متیل‌گزان‌تین از جمله

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 به دلیل این‌که هیچ‌تاثیری 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 پنتوکسی‌فیلین 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 نکرز اسپرم‌ها خلاصه کرد (Yovich و همکاران، ۱۹۹۳). به نظر می‌رسد این موارد می‌تواند توجیه‌کننده تأثیر مثبت پنتوکسی‌فیلین در افزایش تحرک و زنده‌مانی اسپرم باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری از نظر مورفولوژی اسپرم‌های خروس پس از ۶ ساعت سردسازی، بین گروه‌های آزمایشی و تیمار شاهد وجود نداشت. در مطالعه حاضر، برای اولین بار تأثیر 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 آل کارنتین 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 نعنای فلفلی در

می‌شود، این آنزیم در فسفوریلاسیون تیروزین دم اسپرم نقش مهمی دارد و مسیر تنظیمی مهمی در فرآیند 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 آکروزومی‌القاء شده طی انجماد، جلوگیری کند، هم‌چنین هیچ بهبودی از نظر پارامترهای زنده‌مانی و تحرک اسپرم مشاهده نشد. این نتایج ضد و نقیض می‌تواند به دلیل 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. علاوه بر 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 اسپرم خروس 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 حرکتی اسپرم شد (Lecewicz و همکاران، ۲۰۱۹). نتایج اخیر نشان داد که افزودن پنتوکسی‌فیلین در رقیق‌کننده لیک بر پایه لسیترین در محیط سردسازی اسپرم خروس سبب حفظ زنده‌مانی اسپرم‌های سردسازی شده شد که مطابق با نتایج Ghasemzadeh و همکاران (۲۰۱۳) بود که بیان کردند اضافه کردن پنتوکسی‌فیلین با دوز ۳/۶ میکرومول بر نمونه مایع منی مردان مبتلا به آستوسپرمی باعث افزایش معنی‌دار درصد اسپرم‌های متحرک و نیز درصد اسپرم‌های با تحرک پیش‌رونده شد. هم‌چنین Goulart و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که افزودن پنتوکسی‌فیلین به محیط سردسازی اسپرم نریان سبب 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 (Abu-Alhayjaa و Banihani، ۲۰۱۶). افزودن PTX در محیط انجماد اسپرم نریان هیچ اثر مضر بر تحرک اسپرم، زنده‌مانی و فسفوریلاسیون تیروزین نداشت (Guasti و همکاران، ۲۰۱۷). علاوه بر این گزارش‌های محدودی در مورد تأثیر افزودن

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. **Kovačić, B.; Vlaisavljević, V. and Reljić, 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.
- 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 اسپرم‌شناختی و آوزون‌برون 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. **Dziewkońska, 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.** Handline & 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 spermatozooids, 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 Espermatóides de Equinos, após o Resfriamento a 5°C. *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.