نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۹، زمستان ۱۳۹۹
ص‌ص: ۳~۱۴

تأثیر مهارکننده سروتونین بر فراسنجه های اسپرم خروس های مادر گوشتی مسن پس از انجماد–ذوب

- **سیروان نسیمی**
دانش‌آموخته کارشناسی ارشد،گروه علوم طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
- **محسن شرفی** (نویسنده مسئول)
استادیار گروه علوم طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران..
- **عبدالحسین شاهوردی**
دانشیار گروه جنین شناسی، پژوهشکده تولید مثل، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.

تاریخ دریافت : خرداد ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش : مهر ۱۳۹۸
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۸۷۲۱۶۵۷
Email: m.sharafi@modares.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2019.126497.1937

چکیده

محور سروتونرژیک نقشی مهمی در فرآیندهای تولید مثلی در خروس های گله‌های مادر گوشتی ایفا می کند. هدف از اجرای این طرح ارزیابی شاخص های کیفی اسپرم منجمد در خروس های گوشتی مسن سویه راس تغذیه شده با مهار کننده سروتونین (پاراکلروفنیل آلانین) بوده است. در این آزمایش ۱۶ قطعه خروس مادر مسن سویه راس به چهار گروه تقسیم و به ترتیب ۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در کیلوگرم (ppm) پاراکلروفنیل آلانین به مدت چهار هفته دریافت نمودند. سپس از خروس ها نمونه های منی جمع‌آوری و منجمد شدند. پس از انجماد-ذوب، فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی، سلامت غشا، مورفولوژی، سلامت آکروزوم، فعالیت میتوکندری، میزان لیپید پراکسیداسیون و شکست DNA مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استفاده از تیمارهای ۲۰ و ۴۰ ppm پاراکلروفنیل آلانین منجر به بهبود ($P\leq0.05$) جنبایی کل، جنبایی پیشرونده، سلامت غشا، سلامت آکروزوم، زنده مانی و کاهش آپوپتوزیس در اسپرم منجمد خروس پس از یخگشایی شد. استفاده از تیمارهای پاراکلروفنیل آلانین تاثیری بر مورفولوژی، فعالیت میتوکندری، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و شکست DNA نداشت. در نتیجه استفاده از تیمارهای ۲۰ و ۴۰ ppm پاراکلروفنیل آلانین می‌تواند راهکاری در جهت بهبود فراسنجه‌های اسپرم خروس‌های مسن پس از فرایند انجماد-یخگشایی باشد.

واژه‌های کلیدی: انجماد اسپرم، ارزیابی اسپرم، پاراکلروفنیل آلانین ، خروس.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 129 pp: 3-14

Effects of serotonin inhibitor on the sperm parameters in old broiler breeder roosters after freeze-thaw

By: Sirvan Nasimi[1], Mohsen Sharafi[2*], Abdolhossein Shahverdi[3]
[1,2] MSc Graduated and Assistant Professor of Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. [3] Associate Professor of Department of Embryology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

Received: June 2019 **Accepted: October 2019**

Serotonergic axis has an important role in reproductive process of breeder rooster flocks. The aim of this study was to evaluate semen quality parameters of Ross old broiler breeder roosters, which received serotonin inhibitor (PCPA). In this study, 16 Ross broiler breeder rooster assigned into four groups and received 0, 20, 40 and 80 ppm PAPA during 4 weeks. Then semen samples were collected and frozen. After freezing-thawing process, motion parameters, viability, membrane integrity, morphology, acrosome integrity, mitochondria activity, lipid peroxidation and DNA fragmentation were evaluated. In results, using 20 and 40 ppm PCPA improved ($P\leq0.05$) total motility, progressive motility, membrane integrity, acrosome integrity, viability and decreased apoptosis rate in frozen-thawed semen samples. Using PCPA did not have any significant effect on morphology, mitochondria activity, lipid peroxidation and DNA fragmentation of semen samples. It seems to using 20 and 40 ppm PCPA could be a suitable method to improve Ross old broiler breeder rooster semen quality parameters after freezing-thawing process.

Key words: Sperm freezing, Sperm evaluation, PCPA, Rooster.

مقدمه

تلقیح مصنوعی یکی از مهمترین تکنیک‌ها برای مدیریت اصلاح ژنتیکی طیور است، زیرا به وسیله این تکنیک با استفاده از چند قطعه خروس با پتانسیل ژنتیکی و باروری تأیید شده می‌توان هزاران واحد اسپرم را برای مرغ‌ها فراهم کرد. همچنین با استفاده از تلقیح مصنوعی، مدیریت عملکرد تولید مثلی در گله های مادر گوشتی و تخم گذار به طور آسان تری قابل انجام است (Feyzi و همکاران، ۲۰۱۸). انجماد اسپرم یکی از مهم ترین فناوری‌هایی می باشد که برای یک تلقیح مصنوعی موفق مورد نیاز است با این حال در فرآیند انجماد تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی را در غشای اسپرم به وجود می‌آورد که در نتیجه زنده‌مانی اسپرم را بعد از انجماد-ذوب تحت تاثیر قرار می‌دهد (Shahverdi و همکاران، ۲۰۱۵). کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی در خروس های مسن گوشتی که می‌تواند منجر به کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسمای منی و اسپرم گردد، یکی از دلایل مهم کاهش کیفیت اسپرم منجمد خروس های مسن می باشد (Fattah و همکاران، ۲۰۱۷). این کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی به دلایل مختلفی رخ می دهد. یکی از این دلایل اصلی تغییر در محور سروتونورژیک (سروتونین-پپتید وازواکتیو روده ای- پرولاکتین) خروس های مسن می باشد (Avital-Cohen و همکاران، ۲۰۱۵). تحقیقات نشان داده است که سطوح بالای سروتونین که در هیپوتالاموس سنتز می‌شود اثر مهاری بر تولیدمثل پرندگان دارد و افزایش سطح سروتونین باعث کاهش سنتز GnRH و ترشح LH می‌شود (Hall و همکاران، ۱۹۸۶). در نتیجه مهار کردن سیستم سروتونرژیک به طور کلی باعث تحریک ترشح گنادوتروپین و افزایش توسعه گنادها می‌گردد (El Halawani و همکاران، ۱۹۸۳). همچنین سروتونین به صورت غیر مستقیم و از

طریق VIP که به عنوان اصلی‌ترین فاکتور آزاد کننده پرولاکتین شناخته می‌شود، موجب سرکوب سیستم تولیدمثل می گردد (Youngrenو همکاران، ۱۹۹۶). در مطالعات اولیه بر روی پرندگان نر مشخص شد که سطوح بالای پرولاکتین موجب پسرفت بیضه‌ها می‌شود (Chaiseha و همکاران، ۱۹۹۸). استفاده از مهار کننده سروتونین، می تواند باعث افزایش هورمون LH و نیز افزایش توسعه سلول های سرتولی و لایدیگ بافت بیضه گردد (Avital-Cohen و همکاران، ۲۰۱۳). در نتیجه این توسعه، سیستم آنتی اکسیدانی اسپرم و پلاسمای منی نیز افزایش پیدا خواهد کرد که به عنوان یک عامل محافظت کننده در طی فرآیند انجماد-ذوب می تواند اثرات مثبت خود را اعمال نماید.

لذا هدف از این مطالعه بررسی اثر مصرف یکی از مهارکننده‌های رایج محور سروتونرژیک (پاراکلروفنیل آلانین) بر جنبایی، سلامت غشا، مورفولوژی، فعالیت میتوکندری، سلامت آکروزوم، زنده مانی، پراکسیداسیون لیپیدها و شکست DNA اسپرم منجمد خروس‌های سویه راس می باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایش در مرکز تحقیقات طیور واقع در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس در طی مدت بهار و تابستان سال ۱۳۹۷ انجام شد و در این تحقیق از ۱۶ قطعه خروس بالغ نژاد راس ۳۰۸ با سن ۴۷ هفته شامل ۴ تیمار استفاده شد. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی نگه‌داری شدند. تمامی خروس‌ها با جیره یکسان بر اساس کاتالوگ سویه راس تغذیه شدند، آب به صورت آزاد از طریق آب خوری‌های پستانکی در اختیار پرنده‌ها قرار داشت. سالن نگه‌داری با زمان سنج، دماسنج و ترموستات تجهیز شد و مدت ۱۵ ساعت روشنایی در طول ۲۴ ساعت و دمای ۲۱ تا ۲۳ درجه سلسیوس برای پرنده‌ها فراهم شد. خروس ها مهار کننده سروتونین را به مدت چهار هفته دریافت نمودند.

تیمارهای آزمایشی در این تحقیق به شرح زیر بود:

تیمار ۱: خروس‌های مصرف کننده کپسول ژلاتینی خالی (PCPA0)

تیمار ۲: خروس‌های مصرف کننده کپسول ژلاتینی حاوی ۲۰ ppm پاراکلروفنیل آلانین (PCPA20)

تیمار ۳: خروس‌های مصرف کننده کپسول ژلاتینی حاوی ۴۰ ppm پاراکلروفنیل آلانین (PCPA40)

تیمار ۴: خروس‌های مصرف کننده کپسول ژلاتینی حاوی ۸۰ ppm پاراکلروفنیل آلانین (PCPA80)

یک ماه پس از تغذیه خروس ها با پاراکلروفنیل آلانین، اسپرم گیری از خروس ها به مدت شش بار انجام شد. بلافاصله پس از اسپرم‌گیری، نمونه های منی در آب ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شده و برای ارزیابی کیفیت اسپرم به آزمایشگاه منتقل شدند. بر روی منی جمع‌آوری شده ارزیابی اولیه‌ای برای حجم کل، غلظت، جنبایی کل ، جنبایی پیش رونده و مورفولوژی انجام و فقط از نمونه‌هایی برای ادامه آزمایش استفاده شدند که دارای حداقل حجم ۰/۵ میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از $۲/۵ \times ۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر، جنبایی حداقل ۷۵ درصد، جنبایی پیشرونده ۶۰ درصد و مورفولوژی طبیعی ۸۵ درصد بودند.

بعد از جمع‌آوری اسپرم از هر یک از خروس‌ها همه اسپرم‌ها جهت حذف اثرات فردی باهم مخلوط شدند سپس با رقیق‌کننده (جدول ۱) که از قبل برای هر تیمار آماده‌شده بود، با نسبت ۱ به ۱۰ (۱ میلی‌لیتر اسپرم در ۱۰ میلی‌لیتر رقیق‌کننده) رقیق شدند. pH رقیق‌کننده ۷/۲ و اسمولاریته رقیق‌کننده ۳۱۰ میلی‌اسمول بود. پس‌ازآن لوله‌های حاوی منی در ظرف محتوی ۱۰۰ سی‌سی آب $۳۷^{\circ}C$ قرار داده شد و به مدت ۲ ساعت در یخچال $۵^{\circ}C$ برای رسیدن به دمای تعادل نگهداری شدند. پس از رسیدن دمای رقیق‌کننده حاوی تیمارهای مختلف به نزدیک ۵ درجه سانتی‌گراد، بلافاصله در استرا (نی) انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شدند. در مرحله بعد استراهای بسته‌شده حاوی منی به فاصله ۴ سانتی‌متری بالای سطح ازت قرار گرفتند. پس از گذشت ۴ دقیقه با سرعت استراها در داخل ازت مایع ($-۱۹۶^{\circ}C$) غوطه‌ور شدند و در گابلت‌های مخصوص هر تیمار قرار داده شدند.

جدول ۱. اجزای تشکیل دهنده رقیق کننده انجماد اسپرم

ردیف	نام ماده	مقدار (گرم /۵۰ میلی‌لیتر)
۱	Potassium acetate	۰/۲۵ گرم
۲	Sodium glutamate	۰/۹۶گرم
۳	D-fructose	۰/۴ گرم
۴	Polyvinyl pirrolidone	۰/۱۵ گرم
۵	Magnesium acetate	۰/۰۳۵ گرم
۶	Glycine	۰/۱۸۷ گرم

پس از فرآیند انجماد-ذوب فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل پارامترهای حرکتی، زنده مانی، سلامت غشا، مورفولوژی طبیعی، یکپارچگی آکروزوم، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم و نیز درصد میتوکندری‌های فعال اسپرم ارزیابی شد.

به منظور بررسی ویژگی‌های جنبایی اسپرم پس از انجماد-ذوب در گروه‌های مختلف تیماری، نرم افزار کامپیوتری آنالیز جنبایی اسپرم مورد استفاده قرار گرفت (Shahverdi و همکاران، ۲۰۱۵). بدین ترتیب، دو استرا از هر گروه تیماری یخ‌گشایی شده و به داخل میکروتیوب انتقال داده شدند. سپس با استفاده از سمپلر ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام تخلیه شده و یک لامل تمیز روی آن قرار گرفت. لام مورد نظر به زیر میکروسکوپ معکوس فاز کنتراست منتقل شده و با استفاده از سیستم آنالیز کامپیوتری جنبایی اسپرم با استفاده از رایانه مجهز به نرم افزار SCA ارزیابی شد و جنبایی کل و پیشرونده گزارش شد.

در این مطالعه برای بررسی فعالیت و یکپارچگی غشاء از آزمون تورم هایپواسموتیک (HOST) استفاده شد. آزمون هاست بر اساس اسمولاریتی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند (Revell و Mrode، ۱۹۹۴). به این منظور ۳۰ میکرولیتر از اسپرم رقیق‌شده با رقیق‌کننده به نسبت ۱:۱۰ را با ۳۰۰ میکرو لیتر از محلول هاست مخلوط کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه را بر روی یک‌گوشه لام قرار داده و با لام دیگر به‌آرامی گسترش تشکیل و پس از خشک شدن با استفاده از میکروسکوپ نوری نمونه‌ها را می‌توان ارزیابی کرد. تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش‌شده و سپس درصد اسپرم‌های با غشاء سالم و آسیب‌دیده محاسبه شد.

به منظور ارزیابی مورفولوژی اسپرم و تعیین درصد اسپرم‌های طبیعی و غیر طبیعی از روش رنگ‌آمیزی هانکوک استفاده شد. برای ارزیابی اسپرم‌های غیر طبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱ میلی لیتر محلول هانکوک افزوده شد و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شد و با شمارش حداقل ۴۰۰ اسپرماتوزوا زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر، درصد اسپرم‌های غیر طبیعی و اسپرم با آکروزوم غیر طبیعی محاسبه شد. میانگین سه مشاهده به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شد.

فعالیت میتوکندریایی به وسیله رودامین ۱۲۳ اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت میتوکندریایی ابتدا استراهای اسپرم ذوب و برای حذف قسمت رقیق‌کننده سانتریفیوژ شدند و بعد از حذف قسمت رقیق‌کننده پلت تشکیل شده با ۵۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس مخلوط شد. رودامین باید در جای تاریک به نمونه اضافه شود. به اندازه ۱۰ میکرولیتر رودامین به نمونه اضافه شده و در جایی تاریک و در دمایی اتاق به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از طی زمان ۲۰ دقیقه به مقدار ۱۰ میکرولیتر PI به نمونه اضافه شد. پس از آن میزان فعالیت میتوکندریایی نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شدند. در نمودار دستگاه فلوسایتومتر نمونه رودامین مثبت و PI منفی ($R123^{+}/PI^{-}$) باشد، به عنوان نمونه دارای میتوکندری فعال و نمونه رودامین مثبت و PI مثبت ($R123^{+}/PI^{+}$) باشد به عنوان میتوکندری غیر فعال در نظر گرفته شد.

برای اندازه‌گیری یکپارچگی آکروزم از رنگ فلورسنت PSA استفاده شد. تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus ; 51BX) با بزرگنمایی ۴۰۰ ارزیابی شد. اسپرم‌های با سر سبز به عنوان آکروزوم دست نخورده و سالم و اسپرم‌های با کمربند سبز به عنوان آکروزم تخریب شده در نظر گرفته شد (Masoudi و همکاران، ۲۰۱۹).

در این آزمایش از فسفاتیدیل سرین، به عنوان یک نشانگر برای تشخیص زنده بودن یا آپوپتوزیس اسپرم استفاده شد (Askarianzadeh و همکاران، ۲۰۱۸). حضور این نشانگر در سطح غشای پلاسمایی اسپرم، از نشانه‌های اولیه آپوپتوزیس است که در حالت طبیعی یا حالت زنده اسپرم در داخل سیتوپلاسم اسپرم یافت می‌شود. برای اندازه‌گیری میزان جابه‌جایی فسفاتیدیل‌سرین غشای اسپرم از کیت آنکسین (IQP-116F, PSD Kit, the Netherland) استفاده شد. در نمودار دستگاه فلوسایتومتر نمونه‌های آنکسین منفی و PI منفی (A^-/PI^-) به عنوان اسپرم زنده تلقی شدند. نمونه‌های آنکسین مثبت و PI منفی (A^+/PI^-) زنده ولی دچار آپوپتوزیس اولیه بودند. نمونه‌های آنکسین مثبت و PI مثبت (A^+/PI^+) به عنوان اسپرم مرده و دچار آپوپتوزیس ثانویه شده تلقی شدند و آنکسین منفی و PI مثبت (A^-/PI^+) به عنوان اسپرم نکروز شده در نظر گرفته شدند. در این مطالعه نمونه‌های A^-/PI^- و A^+/PI^- به‌عنوان زنده و نمونه‌های A^+/PI^+ و A^-/PI^+ به عنوان اسپرم دچار شده به مرگ سلولی محاسبه شدند.

اندازه‌گیری غلظت MDA با تیوباربیوتوریک اسید (TBA) یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدها است (Shahverdi و همکاران، ۲۰۱۵). یک مولکول MDA با دو مولکول TBA واکنش می‌دهد و فرآورده این واکنش، مولکولی صورتی رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد. نتایج حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتری در فرمول منحنی استاندارد گذاشته و غلظت MDA (نانو مول در میلی‌لیتر منی) محاسبه شد

برای تشخیص شکست DNA رنگ Acridine Orange نوعی رنگ انتخابی برای اسیدهای نوکلئیک است که برای تعیین چرخه سلولی مفید است. این رنگ به DNA یا RNA متصل می‌شود و در اثر اتصال به DNA باعث می شود که رنگ سبز فلورسانس در ۵۲۵ نانومتر نشر شود و با اتصال الکترواستاتیکی به RNA رنگ قرمز فلورسانس در طول موج ۶۳۰ نانومتر نشر می-شود. در اسپرماتوزوآی طبیعی رنگ به DNA دورشته‌ای متصل می‌شود و رنگ سبز نشر می‌کند و در اسپرم غیر طبیعی به DNA دناتوره شده که تک رشته‌ای است متصل می‌شود و رنگ قرمز یا نارنجی نشر کند. این فرایند رنگ‌آمیزی سلول‌ها با دستگاه فلوسیتومتری آنالیز می‌شود (Evenson و Wixon، ۲۰۰۵).

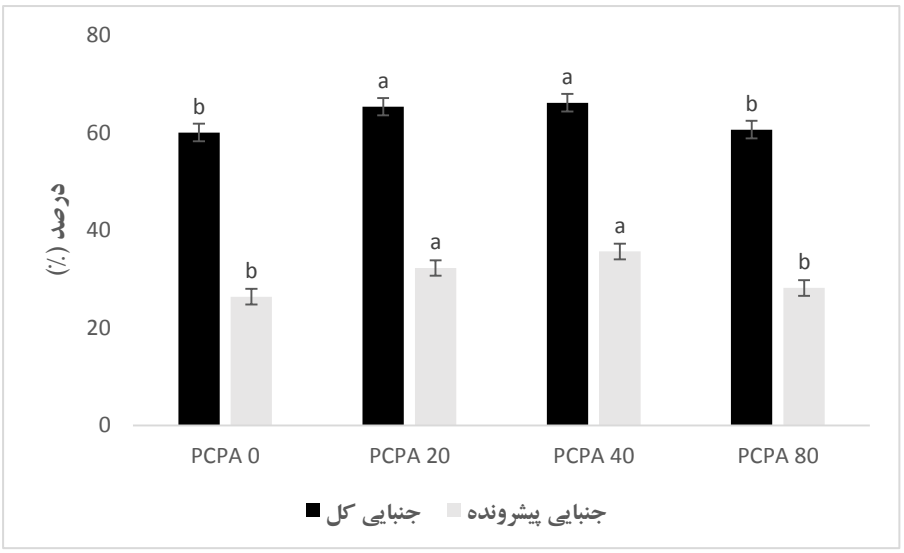
برای تحلیل آماری ارزیابی کیفیت اسپرم در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد.

$$Yij= \mu+Ai+eij$$

Y: متغیر وابسته (مشاهدات)، A: اثر غلظت تیمار، e: اثر عوامل باقیمانده

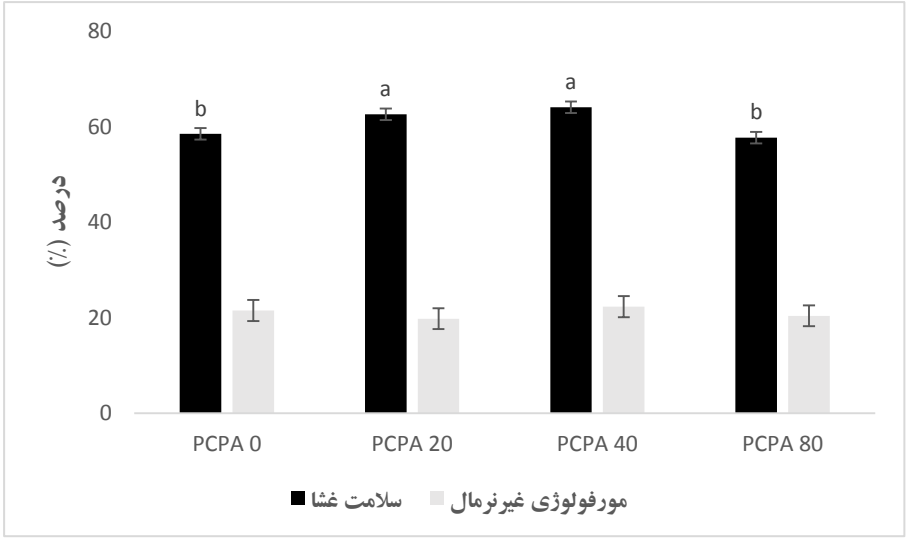
نتایج

نتایج مربوط به اثر پاراکلروفنیل آلانین بر جنبایی کل و جنبایی پیشرونده اسپرم خروس پس از فرایند انجماد-ذوب در شکل ۱ نشان داده شده است. جنبایی کل و پیشرونده در تیمار های PCPA20 (۱/۸ ± ۶۵/۴ و ۱/۶ ± ۳۲/۳) و PCPA40 (۱/۸ ± ۶۶/۲ و ۱/۶ ± ۳۵/۷) بالاتر ($P\leq0.05$) از PCPA0 (۱/۸ ± ۶۰/۱ و ۱/۶ ± ۲۶/۴) و PCPA80 (۱/۸ ± ۶۰/۷ و ۱/۶ ± ۲۸/۲) گزارش شد.



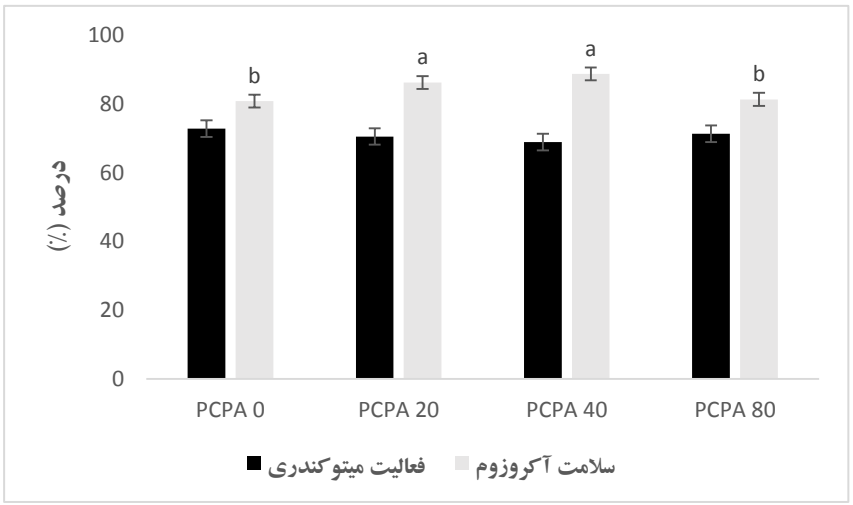
شکل ۱. اثر پاراکلروفنیل آلانین بر جنبایی کل و پیشرونده اسپرم خروس پس از فرایند انجماد-ذوب.
حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها است ($P\leq0.05$).

نتایج مربوط به اثر پاراکلروفنیل آلانین بر سلامت غشا و مورفولوژی اسپرم خروس پس از فرایند انجماد-ذوب در شکل ۲ نشان داده شده است. سلامت غشا در تیمارهای PCPA20 (۱/۲ ± ۶۲/۶) و PCPA40 (۱/۲ ± ۶۴/۱) بالاتر ($P\leq0.05$) از PCPA0 (۱/۲ ± ۵۸/۵) و PCPA80 (۱/۲ ± ۵۷/۷) بوده است. نتایج حاصل از آزمون هانکوک نشان داد که استفاده تیمارهای مختلف پاراکلروفنیل آلانین تاثیری بر میزان اسپرم با مورفولوژی غیر طبیعی نداشته است ($P>0.05$).



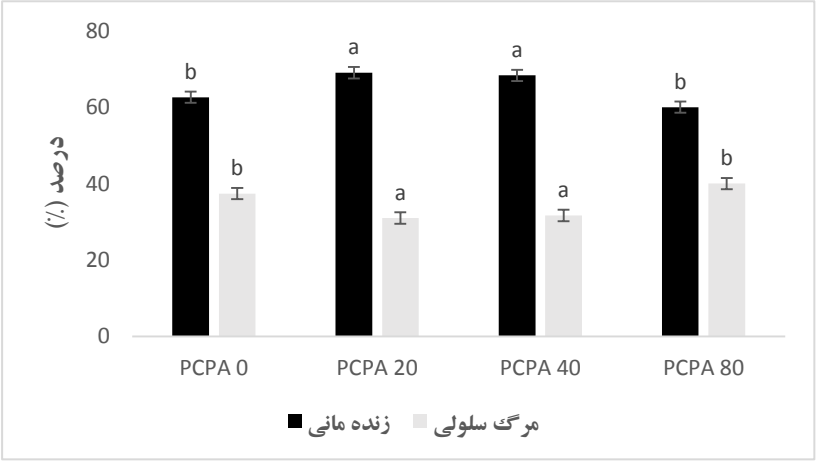
شکل ۲. اثر تغذیه از پاراکلروفنیل آلانین بر سلامت غشا و مورفولوژی اسپرم خروس پس از فرایند انجماد-ذوب.
حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها است ($P\leq0.05$).

شکل ۳ تاثیر استفاده از پاراکلروفنیل آلانین بر فعالیت میتوکندری و سلامت آکروزوم اسپرم خروس پس از فرایند انجماد-ذوب را نشان می دهد. نتایج حاصل از رنگ آمیزی با رودامین-۱۲۳ نشان داد که استفاده تیمارهای مختلف پاراکلروفنیل آلانین بر تاثیری بر میزان اسپرم با میتوکندری فعال نداشته است ($P>0.05$). سلامت آکروزوم در تیمارهای PCPA20 (۱/۹ ± ۸۶/۲) و PCPA40 (۱/۹ ± ۸۸/۷) از تیمارهای PCPA0 (۱/۹ ± ۸۰/۸) و PCPA80 (۱/۹ ± ۸۱/۳) بالاتر ($P\leq0.05$) بوده است.



شکل ۳. تاثیر استفاده از تغذیه پاراکلروفنیل آلانین بر فعالیت میتوکندری و سلامت آکروزوم اسپرم خروس پس از فرایند انجماد-ذوب.
حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها است ($P\leq0.05$).

شکل ۴ تاثیر استفاده از تغذیه پاراکلروفنیل آلانین بر زنده مانی و میزان آپوپتوزیس اسپرم خروس پس از فرایند انجماد-ذوب را نشان می دهد. میزان زنده‌مانی در تیمارهای PCPA20 (۱/۵ ± ۶۹/۰) و PCPA40 (۱/۵ ± ۶۸/۳) از تیمارهای PCPA0 (۱/۵ ± ۶۲/۶) و PCPA80 (۱/۵ ± ۶۰/۰) بالاتر ($P\leq0.05$) بوده است و میزان مرگ سلولی در تیمارهای PCPA20 (۱/۵ ± ۳۱/۰) و PCPA40 (۱/۵ ± ۳۱/۷) از تیمارهای PCPA0 (۱/۵ ± ۳۷/۴) و PCPA80 (۱/۵ ± ۴۰/۰) کمتر ($P\leq0.05$) بوده است.



شکل ۴. تاثیر استفاده از تغذیه پاراکلروفنیل آلانین بر زنده مانی و میزان مرگ سلولی اسپرم خروس پس از فرایند انجماد-ذوب.
حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها است ($P\leq0.05$).

نتایج حاصل از تاثیر تغذیه پاراکلروفنیل آلانین بر میزان تولید مالون دی آلدهاید و شکست DNA اسپرم خروس پس از فرایند انجماد-ذوب در جدول ۲ نشان داده شده است و نتایج نشان داد استفاده تیمارهای مختلف پاراکلروفنیل آلانین تاثیری بر میزان تولید مالون دی آلدهاید و شکست DNA نداشته است ($P>0.05$).

جدول ۲. تاثیر استفاده از تغذیه پاراکلروفنیل آلانین بر میزان تولید مالون دی آلدهاید و شکست DNA اسپرم خروس پس از فرایند انجماد-ذوب

تیمارهای آزمایشی	PCPA0	PCPA20	PCPA40	PCPA80	SEM
تولید مالون دی آلدهاید (nmol/ml)	۳/۸۰	۳/۲۱	۳/۴۵	۳/۰۱	۰/۹
شکست DNA (٪)	۸/۵	۸/۳	۷/۸	۹/۰	۱/۱

بحث

تلقیح مصنوعی در گله های مرغ مادر گوشتی مسن نتایج باروری مطلوب تری در مقایسه با جفتگیری طبیعی دارد زیرا که در گله های گوشتی به دلیل افزایش وزن، خروس‌ها به خصوص از سنین چهل هفتگی به بعد قادر به جفتگیری کامل با مرغ ها نمی باشند و تلقیح مصنوعی روشی مطمئن برای انتقال اسپرم‌های سالم و بارور به دستگاه تولید مثلی مرغ می باشد. از طرفی در جفتگیری طبیعی، مرغ ها که به دلیل افزایش وزن خروس دچار تنش های زیادی در موقع جفتگیری می شوند دچار کاهش باروری می شوند این در حالی است که در تلقیح مصنوعی هیچ گونه تنشی به مرغ در طی این فرآیند وارد نمی شود اما لازمه بهینه بودن استفاده از تکنیک تلقیح مصنوعی فراهم بودن اسپرم منجمد با کیفیت است زیرا کیفیت پایین اسپرم منجمد سبب افت بازده تلقیح مصنوعی می-گردد (Lotfi و همکاران، ۲۰۱۷). تاکنون راهکارهای مختلفی برای بهبود بازده اسپرم منجمد ارایه شده است که از میان آن‌ها می‌توان به افزودن آنتی اکسیدان ها به جیره و یا رقیق کننده انجماد اسپرم اشاره نمود (Moghbeli و همکاران، ۲۰۱۶).

اما به غیر از استفاده مستقیم از آنتی اکسیدان‌ها می‌توان به صورت واسطه ای سیستم آنتی اکسیدانی اسپرم را تقویت نمود زیرا تنش اکسیداتیو از دلایل اصلی کاهش کیفیت اسپرم پس از انجماد می باشد و با استفاده از بهبود کیفیت اسپرم قبل انجماد و همچنین تقویت سیستم آنتی اکسیدانی سلول اثرات تنش اکسیداتیو را به حداقل رساند (Askarianzadeh و همکاران، ۲۰۱۸).

امروزه ثابت شده است که محور سروتونرژیک (سروتونین – پپتید وازواکتیو روده‌ای – پرولاکتین) نقش مهمی در افت باروری و کیفیت اسپرم خروس‌های مسن ایفا می‌کند. سطح هورمون‌های سروتونین هیپوتالاموس، پپتید وازواکتیو روده‌ای هیپوتالاموس و پرولاکتین هیپوفیز در خروس‌های مسن در مقایسه با خروس‌های جوان بیشتر بوده و همچنین فعالیت محور گنادها در خروس‌های مسن در مقایسه با خروس‌های جوان کمتر است (Avital-Cohen و همکاران، ۲۰۱۳). پاراکلروفنیل‌آلانین که با نام تجاری فنکلونین شناخته می‌شود، به عنوان یک مهار کننده انتخابی و غیر قابل برگشت هیدروکسیلاز تریپتوفان (آنزیم محدود کننده سرعت در بیوسنتز سروتونین) عمل می‌کند (Jouvet، ۱۹۹۹). اثر این مهار کننده در مطالعات زیادی مورد بررسی قرار گرفته است که نشان داده شده اثر مهاری آن بر روی سروتونین موجب بهبود سطح هورمون‌های تولیدمثلی و رفتارهای تولیدمثلی در حیوانات شده است (Meyerson و Lewander، ۱۹۷۰).

مهار سروتونین توسط مهارکننده پاراکلروفنیل آلانین موجب کاهش سطح سروتونین مغزی و کاهش غلظت پرولاکتین پلاسمای خون می شود (Kordon و همکاران، ۱۹۷۳). همچنین مهار محور سروتونرژیک موجب کاهش سطح پرولاکتین پلاسمای خون (Avital-Cohen و همکاران، ۲۰۱۲؛ El

Halawani و همکاران، ۱۹۹۵؛ Vistoropsky و همکاران، ۲۰۱۶). و افزایش سطح تستوسترون پلاسمای خون خروس‌های مسن شده است (Avital-Cohen et al., 2015). مهار محور سروتونرژیک موجب افزایش سطح هورمون‌های LH و FSH پلاسمای خون خروس‌های مسن می‌شود (Avital-Cohen و همکاران، ۲۰۱۵) در نتیجه مقدار تستوسترون افزایش یافته که در نهایت موجب بهبود فراسنجه‌های کیفیت منی اندازه‌گیری شده (حجم مایع منی و غلظت اسپرم) می شود(Avital-Cohen و همکاران، ۲۰۱۵). در این مطالعه نیز مهار محور سروتونرژیک با خوراندن پاراکلروفنیل آلانین اثر معنی‌داری بر روی پارامترهای جنبایی، سلامت غشا، سلامت آکروزوم، زنده مانی و نرخ باروری اسپرم خروس پس از فرایند ذوب-انجماد را داشته است که تایید کننده مطالعات پیشین در این زمینه بوده است.

از طرف دیگر پاراکلروفنیل آلانین از طریق افزایش هورمون LH می تواند باعث افزایش کوآنزیم Q10 درون سلولی گردند که از این طریق می توانند قدرت آنتی اکسیدانی اندوژنوس سلول را افزایش دهند و در نتیجه آن میزان رادیکال های آزاد و تنش های اکسیداتیو در طی فرآیند انجماد به حداقل میزان خود برسد. در هنگام پراکسیداسیون لیپیدها کوآنزیم Q10 همانند یک آنتی اکسیدان عمل می‌کند (Mancini و همکاران ۱۹۹۸) و مستقیماً رادیکال‌های لیپید پروکسیل را پاک می‌کند (Turunen و همکاران، ۲۰۰۴). در میتوکندری کوآنزیم Q10 دارای نقش حامل انرژی می‌باشد (Littarru و Tiano، ۲۰۰۷) بنابراین سنتز ATP و تولید انرژی با فراهمی کوآنزیم Q10 مرتبط می‌باشد (Lewin و Lavon، ۱۹۹۷). در سلول اسپرم، CoQ10 به عنوان یک عامل انرژی و آنتی‌اکسیدان در قطعه میانی اسپرم متمرکز شده است و نشان می‌دهد که انرژی برای تحرک و همه فرایندهای مرتبط به انرژی در سلول اسپرم به فراهمی CoQ10 وابسته است. هم‌چنین فرم کاهش یافته CoQ10 مانع پراکسیداسیون چربی در غشا اسپرم می‌شود. CoQ10 تنها آنتی‌اکسیدان محلول در چربی است که به صورت درون‌زادی سنتز می‌شود. یوبی‌کینول موجب مهار اکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی و هم‌چنین چربی‌های لیپوپروتئین موجود در گردش خون می‌شود (Littarru و Tiano، ۲۰۰۷). یوبی‌کینول علاوه بر واکنش به طور مستقیم با رادیکال‌های پراکسیل، به طور موثر رادیکال آلفا توکوفروکسیل را به آلفا توکوفرول تبدیل نموده و موجب بازسازی ویتامین E شده و از اکسیداسیون جلوگیری می‌کند.

کاهش ظرفیت انتی اکسیدانی از دلایل عمده افت باروری اسپرم منجمد است که در نتیجه آن میزان مالون دی آلدهاید افزایش می یابد. تستوسترون، که در نتیجه استفاده از پاراکلروفنیل آلانین و مهار محور سروتونین مقدارش افزایش می یابد، بیان ژن‌های مرتبط با ظرفیت آنتی اکسیدانی از جمله گلوتاتیون و گلوتاتیون پراکسیداز را افزایش می دهد. آنتی اکسیدان‌های گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و پیش ماده‌های آن‌ها (گلوتاتیون کاهش و اکسایش یافته) نقش‌های مهمی را در لیپید پراکسیداسیون و پاکسازی پراکسیدهای هیدروژن (مولکول پیش ماده رادیکال هیدروکسیل) ایفا می‌کنند (Storey و همکاران، ۱۹۹۸) عدم تعادل میان تولید و پاکسازی رادیکال‌های آزاد منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود که این تنش سبب آسیب به اسپرم و اختلال در جنبایی، سلامت غشای پلاسمایی، واکنش آکروزوم و قابلیت اصال اسپرم به تخمک می‌شود (Storey و همکاران، ۱۹۹۸).

نتیجه گیری

استفاده از تیمار پاراکلروفنیل آلانین در خروس های مسن نژاد راس موجب مهار محور سروتونین-پپتیدوازواکتیو روده ای-پرولاکتین می شوند و بدنبال آن اثر مهار از هیپوتالاموس برداشته و ترشح LH به دنبال آن تستسترون آفزایش می یابد که در نتیجه طرفیت آنتی اکسیدانی سلول اسپرم طی فرایند انجماد-ذوب بهبود می یابد در نتیجه استفاده از این تیمار جنبایی، سلامت غشا و آکروزوم، زنده مانی و باروری اسپرم خروس سویه راس پس از فرایند انجماد-ذوب بهبود یافت.

منابع

Askarianzadeh, Z., Sharafi, M. and Karimi Torshizi, M.A. (2018). Sperm quality characteristics and fertilization capacity after cryopreservation of rooster semen in extender exposed to a magnetic field. *Animal Reproduction Science.* 198:37-46.

Avital-Cohen, N., Heiblum, R., Argov-Argaman, N., Rosenstrauch, A., Chaiseha, Y., Mobarkey, N. and Rozenboim, I. (2013). Age-related changes in gonadal and serotonergic axes of broiler breeder roosters. *Domestic Animal Endocrinology*. 44: 145–150.

Avital-Cohen, N., Heiblum, R., Argov, N., Rosenstrauch, a., Chaiseha, Y., Mobarkey, N. and Rozenboim, I. (2012). The effect of active immunization against vasoactive intestinal peptide (VIP) and inhibin on reproductive performance of aging White Leghorn roosters. *Poultry Science*. 91: 161–174.

Avital-Cohen, N., Heiblum, R., Rosenstrauch, A., Chaiseha, Y., Mobarkey, N., Gumułka, M. and Rozenboim, I. (2015). Role of the serotonergic axis in the reproductive failure associated with aging broiler breeder roosters. *Domestic Animal Endocrinology.* 53: 42–51.

Chaiseha, Y., Tong, Z., Youngren, O.M. and El Halawani, M.E. (1998). Transcriptional changes in hypothalamic vasoactive intestinal peptide during a photo-induced reproductive cycle in the turkey. *Journal of Molcular Endocrinology*. 21: 267–275.

El Halawani, M.E., Silsby, J.L., Fehrer, S.C. and Behnke, E.J. (1983). Reinitiation of Ovulatory Cycles in Incubating Female Turkeys by an Inhibitor of Serotonin Synthesis, P-Chlorophenylalanine1. *Biology of Reproduction.* 28: 221–228.

El Halawani, M.E., Silsby, J.L., Rozenboim, I. and Pitts, G.R. (1995). Increased egg production by active immunization against vasoactive intestinal peptide in the turkey (Meleagris gallopavo). *Biology of Reproduction.* 52: 179–183.

Evenson, D.P. and Wixon, R. (2005). Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 207: 532-537

Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., Esmaeili, V. and Najafi, A. (2017). L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*. *74: 148-153*

Feyzi, S., Sharafi, M. and Rahimi, S. (2018). Stress preconditioning of rooster semen before cryopreservation improves fertility potential of thawed sperm. *Poultry Science.* 97: 2582-2590.

Hall, T.R., Cheung, A. and Harvey, S. (1986). Serotoninergic inhibition of LH secretion in the domestic fowl. *Journal of Endocrinology*. 110: 239–244.

Jouvet, M. (1999). Sleep and serotonin: An unfinished story. *Neuropsychopharmacology*.

Kordon, C., Blake, C.A., Terkel, J. and Sawyer, C.H. (1973). Participation of serotonin-containing neurons in the suckling-induced rise in plasma prolactin levels in lactating rats. *Neuroendocrinology*. 13: 213–223.

Lewin, A. and Lavon, H. (1997). The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Molcular Aspects Medicine.* 18: 213-219.

Littarru, G.P. and Tiano, L. (2007). Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: Recent developments. *Molecular Biotechnology*. 1: 31–37.

Lotfi, S., Mehri, M., Sharafi, M. and Masoudi, R. (2017). Hyaluronic acid improves frozen-thawed sperm quality and fertility potential in rooster. *Animal Reproduction Science.* 184: 204-210

Mancini, A., Conte, G., Milardi, D., De Marinis, L. and Littarru, G.P. (1998). Relationship between sperm cell ubiquinone and seminal parameters in subjects with and without varicocele. *Andrologia.* 30: 1–4.

Masoudi, R., Sharafi, M., Shahneh, A.Z. and Khodaei-Motlagh, M. (2019). Effects of reduced glutathione on the quality of rooster sperm during cryopreservation. *Theriogenology.* 128:149-155

Meyerson, B.J. and Lewander, T. (1970). Serotonin synthesis inhibition and estrous behavior in female rats. *Life Science.*

Moghbeli, M., Kohram, H., Zare-Shahaneh, A., Zhandi, M., Sharafi, M., Nabi, M.M., Zahedi, V. and Sharideh, H. (2016). Are the optimum levels of the catalase and vitamin E in rooster semen extender after freezing-thawing influenced by sperm concentration? *Cryobiology.* 72: 264–268.

Revell, S.G., Mrode, R.A., 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*. 36, 77–86.

Shahverdi, A., Sharafi, M., Gourabi, H., Yekta, A.A., Esmaeili, V., Sharbatoghli, M., Janzamin, E., Hajnasrollahi, M. and Mostafayi, F. (2015). Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology*. 83, 78–85.

Storey, B.T., Alvarez, J.G., Thompson, K.A., 1998. Human sperm glutathione reductase activity in situ reveals limitation in the glutathione antioxidant defense system due to supply of NADPH. *Molcular Reproduction and Development.* 49: 400-407.

Turunen, M., Olsson, J. and Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimistry and Biophysics Acta - Biomembrane.* 1660: 171–199.

Vistoropsky, Y., Heiblum, R., Smorodinsky, N.I. and Barnea, A. (2016). Active immunization against vasoactive intestinal polypeptide decreases neuronal recruitment and inhibits reproduction in zebra finches. *Neurology.* 524: 2516–2528.

Youngren, O., Chaiseha, Y., Phillips, R., 1996. Vasoactive intestinal peptide concentrations in turkey hypophysial portal blood differ across the reproductive cycle. *Endocrinology*. 103: 323–330.