

## مهار تولید ROS از طریق افزودن آنتی‌اکسیدان هدفمند ۲-۴ دی‌نیترو فنول و تاثیر آن بر عملکرد اسپرم منجمد-یخ‌کشایی خروس

• ناهید محمدی

دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی، فیزیولوژی دام دانشگاه تبریز

• حسین دقیق کیا (نویسنده مسئول)

• استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۷

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۰۸۹۴۳۱

Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

### چکیده

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.121379.1674

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

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

**Effect of 2, 4-Dinitrophenol on reactive oxygen species production in mitochondria and improvement of sperm viability after freeze-thawing process of Rooster semen**By: Nahid Mohammadi<sup>1</sup>, Hossein Daghigh Kia<sup>2\*</sup>

1M.sc. Graduate student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

2Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.

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

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

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

برای حرکت اسپرم فعالیت می کنند ( Rui و همکاران، ۲۰۱۷؛ Du Plessis و همکاران، ۲۰۱۵). در این راستا، در جریان عبور الکترون از زنجیره انتقال الکترون رادیکال‌های آزاد تولید می شوند که سبب ایجاد پدیده‌ای به نام تنش اکسیداتیو می گردند (Wang و همکاران، ۲۰۱۵؛ Antonenko و همکاران، ۲۰۰۸). میتوکندری با استفاده از ویتامین E، آسکوربیک اسید، کوآنزیم Q10، سیتوکروم C و گلوتاتیون یا با استفاده از آنزیم‌هایی نظیر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز رادیکال‌های آزاد را از بین می برد. اگر این سیستم دفاعی در معرض خطر قرار گیرد این رادیکال‌های آزاد می توانند در میتوکندری تجمع یافته و

اسپرم پرندگان نسبت به انجماد بسیار حساس بوده و میزان باروری آن بعد از انجماد نسبت به پستانداران اهلی، بسیار پایین است؛ بنابراین بهبود باروری منی منجمد شده برای انجام تلقیح مصنوعی ضروری است (Madeddu و همکاران ۲۰۱۷؛ Mphaphathi و همکاران، ۲۰۱۶). گونه‌های اکسیژن فعال در زنجیره انتقال الکترون میتوکندری تولید شده و در سطوح پاتولوژیکی می توانند به شدت عملکرد سلول را مختل کرده و مرگ آن را القا کنند (De Plessis و همکاران، ۲۰۱۵؛ Amara و همکاران، ۲۰۱۳). یکی از محل های اصلی تولید ROS ها میتوکندری ها می باشند که در قسمت میانی اسپرم قرار داشته و به عنوان موتور تأمین انرژی

کمپلکس I و III زنجیره انتقال الکترون یک فرآیند غیر آنزیمی بوده و تحت شیب بالای الکتروشیمیایی به شدت فعال است (Karim and Echta, 2007). این رابطه non-ohmic است می تواند تولید ROS را بدون کاهش زیاد در فسفریلاسیون اکسیداتیو محدود کند از این رو جفت جدا کن های میتوکنندری نشان دهنده اولین خط دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو می باشند (Kudin و همکاران, 2004). می توان با دستکاری میتوکنندری در جهت کاهش پتانسیل غشاء میتوکنندری، تولید ROS را کاهش داد (Mailloux and Harper, 2011; Baffy, 2010; Azzu and Brand, 2010). القای جفت جداکن های میتوکنندری به وسیله دی نیترو فنول در شرایط آزمایشگاهی کشت جنین خوک و گاو و انجماد اسپرم در میمون رزوس و گربه ماهی زرد، انسان و خوک مفید بوده است (Wang و همکاران, 2015). پژوهش حاضر به منظور بهبود کیفیت اسپرم خروس، کاهش تولید ROS و افزایش زندهمانی متعاقب یخ کشایی از طریق هدف قرار دادن میتوکنندری با استفاده از اثرات آنتی اکسیدانی DNP انجام گرفته است. هدف از این آزمایش افزودن DNP بر منی خروس و بررسی تاثیر آن بر کاهش تولید ROS و حفظ و بهبود کیفیت و عملکرد اسپرم بود.

### مواد و روش ها

#### پروندگان مورد استفاده و جمع آوری مایع منی

پژوهش حاضر، در ایستگاه تحقیقاتی و پژوهشی خلعت پوشان دانشگاه تبریز انجام پذیرفت. در این تحقیق از 14 خروس بالغ راس 208 با 28 هفته سن استفاده گردید خروس ها در قفس های انفرادی با ابعاد 85 × 70 × 70 سانتی متر، دمای 18-22 درجه سانتی گراد، و 15 ساعت روشنایی و 9 ساعت تاریکی نگهداری می شدند. خروس ها در طول دوره، روزانه 140-150 گرم جیره ی تجاری (حاوی 2740 کیلوکالری انرژی متابولیسمی و 12/56 پروتئین خام به ازای هر کیلوگرم ماده خشک) تغذیه شدند و دسترسی آزاد به آب داشتند. خروس ها به مدت 2 هفته برای اسپرم گیری عادت دهی شدند. سپس به دو گروه هفت تایی تقسیم شده و نمونه منی هر روز از یک گروه از خروس ها با استفاده از روش مالش پشتی - شکمی جمع آوری و در یک فلاسک آب گرم 37 درجه سانتی گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از

منجر به بروز جهش در ژنوم میتوکنندری mtDNA، پراکسیداسیون لیپیدها، اکسیداسیون پروتئین ها، آسیب به DNA، اختلال در عملکرد میتوکنندری و مرگ سلولی شوند (Skulachev و همکاران, 2010; Smith and Murphy, 2010; Skulachev و همکاران, 2010; Mirzaei و همکاران, 2009). یکی از دلایل عدم اثر بخشی آنتی اکسیدان هایی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته اند این است که در محل اصلی تولید ROS که در میتوکنندری است، تجمع نمی یابند (Fang و همکاران, 2014). میتوکنندری ها به علت داشتن ویژگی های منحصر به فردی نظیر نفوذناپذیر بودن نسبت به آنتی اکسیدان ها، داشتن مقادیر بالای 5 الی 10 برابر ROS در داخل میتوکنندری نسبت به سیتوپلاسم، حضور کاردیولپین در غشای داخلی میتوکنندری، بیشتر در معرض تنش اکسیداتیو باشند (Skulachev و همکاران, 2009; Mirzaei و همکاران, 2016). این موضوع سبب شده تا افق های تحقیقاتی حاضر در زمینه تولیدمثل، در جهت ورود آنتی اکسیدان ها به میتوکنندری فعالیت نمایند. بدین منظور در این بررسی از ترکیب شیمیایی 4-2-دی-نیترو فنول<sup>1</sup> برای کاهش آسیب های ناشی از ROS استفاده گردید که یک ترکیب مشتق از نیتروژن آلی با فرمول شیمیایی C6H4N2O5 و جرم مولی 184/11 g/mol بوده، در دمای اتاق به شکل بلورهای زرد است. این ماده به طور گسترده در کشاورزی و صنایع استفاده شده و در غلظت های بالا به علت دخالت در متابولیسم سلول و جدا کردن فسفریلاسیون از اکسیداسیون برای انسان و حیوان سمی است (Silva و همکاران, 2016). مکانیزم عمل آن بر اساس گرادیان پروتون فضای داخلی میتوکنندری و جلوگیری از تشکیل ATP می باشد. واقعیت این است که زنجیره انتقال الکترون می تواند بدون تولید ATP ادامه یافته و باعث افزایش میزان متابولیسم پایه شود به همین علت در سال 1930 به طور گسترده برای کاهش وزن افراد چاق مورد استفاده قرار گرفت (Silva و همکاران, 2016). استفاده از DNP به مقدار 30 mg/kg وزن بدن در روز به مدت 46 روز در موش سبب گردید تا بیشتر جنین های موش متولد شده مرده باشند و همچنین زندهمانی بعد از تولد و وزن بدن نوزادان را کاهش یابد (Silva و همکاران, 2016). تولید سوپراکسید بوسیله

<sup>1</sup>2-4-dinitrophenol (DNP)

رقیق کننده حاوی گلیسرول به مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی گراد نگهداری شده و بعد از ۲ ساعت یک میلی لیتر رقیق کننده حاوی گلیسرول به هر کدام از فالكون ها افزوده شد و یک ساعت دیگر در یخچال نگهداری شدند. سپس نمونه منی بلافاصله در داخل پایوت های ۰/۲۵ میلی لیتر کشیده شد و در پنج سانتی متری بالای سطح ازت مایع به مدت ۷ دقیقه قرار گرفتند سپس به سرعت در ازت مایع غوطه ور کرده و برای نگهداری به داخل تانک ازت منتقل شدند. نمونه ها به مدت دو ماه در داخل تانک ازت نگهداری شدند. در این تحقیق، به ازای هر یک از گروه های تیماری ۵ بار تکرار انجام شد و در هر تکرار هشت پایوت منجمد و پس از یخ گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای یخ گشایی، پایوت ها به مدت ۳۰ ثانیه در آب ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از یخ گشایی صفاتی مانند درصد اسپرم های متحرک، درصد اسپرم های زنده، سلامت غشای اسپرم، خصوصیات مرفولوژیکی اسپرم ها و همچنین مقادیر مالون دی آلدئید نمونه ها جهت تعیین میزان لیپید پراکسیداسیون غشای پلاسمایی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی اولیه از نمونه های منی، در صورت داشتن حجم ۰/۶-۰/۳ میلی لیتر، غلظت اسپرم بیشتر از  $3 \times 10^9$  در هر میلی لیتر، تحرک بالاتر از ۸۰٪ و میزان اسپرم غیرطبیعی کمتر از ۱۰٪ مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور حذف تفاوت های فردی، نمونه های منی بلافاصله پس از ارزیابی اولیه، با هم مخلوط شدند (Safa و همکاران، ۲۰۱۶).

### آماده سازی رقیق کننده و انجماد اسپرم

به منظور رقیق سازی اسپرم ها از رقیق کننده بلستویل استفاده گردید مواد شیمیایی مورد استفاده برای تهیه رقیق کننده بلستویل در مطالعه حاضر از شرکت مرک آلمان تهیه گردید (جدول ۱). پس از آماده سازی رقیق کننده به مقدار ۱۰ میلی لیتر از محلول در داخل ۱۰ لوله استریل ریخته شده و به هر لوله براساس گروه آزمایشی، آنتی اکسیدان DNP افزوده شد. تیمارهای آزمایشی مشتمل بر پنج سطح (۰، ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۰/۷۵، ۱ نانومولار)، از DNP بود که در پنج تکرار انجام شد. DNP از شرکت سیگما-آلدریچ (کد محصول: ۳۴۳۳۴) تهیه گردید. پس از افزودن آنتی اکسیدان به رقیق کننده، نمونه های اسپرم با نسبت ۱ به ۳۰ به داخل لوله ها اضافه گردید سپس فالكون های حاوی رقیق کننده حاوی گلیسرول، اسپرم و آنتی اکسیدان DNP، همچنین فالكون حاوی

### جدول ۱: اجزای مقادیر رقیق کننده بلستویل

Table (1)- Blastville Extender components

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

## آزمایشات اسپرم

### ارزیابی تحرک اسپرم

درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) نسبت به رنگ نشده (زنده) محاسبه شد (Bakhshayesh Khiabani, 2017).

#### تست یکپارچگی غشاء پلاسمایی (HOST)<sup>9</sup>

یکپارچگی غشای پلاسمایی با استفاده از تست التهاب هیواسموتیک (HOST) تعیین شد. مواد شیمیایی لازم برای تهیه محلول هاست از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از مایع منی را به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایواسموتیک هاست (حاوی ۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم تری سدیم سترات دی هیدرات، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی اسمول) اضافه شد. سپس در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بمدت ۳۰ دقیقه گرم خانه گذاری کرده و پس از آن با تهیه حداقل ۳ قطره از نمونه انکوبه شده، ارزیابی و شمارش اسپرم با استفاده از میکروسکوپ صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌هایی با دم گره خورده (زنده) نسبت به گره نخورده (مرده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی دارای دم گره خورده دارای غشای پلاسمایی سالم بوده و با قرار گرفتن در محیط هایواسموتیک واکنش نشان می‌دهند در حالی که اسپرم‌هایی که دم آنها بدون گره بوده غشای پلاسمایی آنها آسیب دیده است (Bakhshayesh Khiabani, 2017).

#### تست مورفولوژی اسپرم

برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه منی یخ‌گشایی شده به میکروتیوب‌های حاوی ۱۵۰ میکرولیتر از محلول هانکوک (۶۲/۵ میلی لیتر فرمالین ۳۷ درصد، ۱۵۰ میلی لیتر محلول سالین، ۱۵۰ میلی لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر) افزوده شد. سپس یک قطره از این مخلوط را روی لام قرار داده و توسط لامل پوشانده شده و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی  $\times 400$ ، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی محاسبه شد.

پس از یخ‌گشایی نمونه منی، فراسنجه‌های حرکتی اسپرم (تحرک کل<sup>۲</sup>، تحرک پیش‌رونده<sup>۳</sup>، سرعت در مسیر میانگین<sup>۴</sup>، سرعت در مسیر منحنی<sup>۵</sup>، سرعت در مسیر مستقیم<sup>۶</sup>، جنبایی عرضی<sup>۷</sup>، خطی بودن جنبایی<sup>۸</sup>) با استفاده از سیستم CASA (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver city CA, USA) ارزیابی شدند. جهت ارزیابی فراسنجه‌های تحرک ۵ میکرولیتر از نمونه را روی لام از قبل گرم شده ( $37^{\circ}\text{C}$ ) قرار داده و بعد از پوشاندن با لامل، روی صفحه گرم میکروسکوپ قرار داده شد. از هر نمونه حداقل ۱۰ میدان دید در زیر میکروسکوپ بطور کاملاً تصادفی انتخاب و فراسنجه‌های تحرک ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی  $\times 100$  تجزیه و تحلیل شدند (Akhlaghi و همکاران، ۲۰۱۴).

### درصد زنده‌مانی اسپرم

این ارزیابی بوسیله روش رنگ‌آمیزی اتوزین-نیگروزین انجام گرفت (Bakhshayesh Khiabani, 2017). در این روش اسپرم‌های مرده رنگ اتوزین را به خود جذب کرده ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی ۱۰ میکرولیتر از رنگ آماده شده اتوزین-نیگروزین برداشته و بر روی لام قرار داده شد سپس ۱۰ میکرولیتر نمونه‌ی اسپرم برداشته و با سر سمپلر به آرامی به رنگ اضافه کرده، سپس به آرامی گسترش داده شد. پس از خشک شدن، لام را زیر میکروسکوپ قرار داده و از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شده و

<sup>2</sup> Total Motility (TM)

<sup>3</sup> Progressive Motility (PM)

<sup>4</sup> Curvilinear velocity (micron/sec) (VCL)

<sup>5</sup> Average path velocity (micron/sec) (VAP)

<sup>6</sup> Straight – line velocity (micron/sec) (VSL)

<sup>7</sup> Lateral head displacement (micron) (ALH)

<sup>8</sup> Linearity (%) (LIN= VSL/VCL $\times 100$ )

<sup>9</sup> Hypo-osmotic swelling test

## اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدهید

رایج‌ترین روش برای ارزیابی پراکسیداسیون غشای اسپرم، اندازه‌گیری سطح مالون دی آلدهید (MDA)<sup>۱۰</sup> از طریق ارزیابی تیوباریتوریک اسید می‌باشد (Balercia و همکاران، ۲۰۱۷). مالون دی آلدهید یک محصول نهایی پراکسیداسیون لیپید است و با تیوباریتوریک اسید واکنش داده و تولید یک ترکیب اضافی مالون دی آلدهید- تیوباریتوریک اسید را می‌کند که به راحتی می‌توان این ترکیب اضافی را اندازه‌گیری نمود. برای اندازه‌گیری غلظت MDA، ابتدا دو پایوت از هر تیمار از هر تکرار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، یخ‌گشایی شدند. سپس ۱ سی‌سی از محلول EDTA<sup>۱۱</sup>، ۱ سی‌سی از محلول BHT<sup>۱۲</sup> و ۲ سی‌سی از محلول TAC<sup>۱۳</sup> را با هم مخلوط کرده به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس به مقدار ۱ میلی‌لیتر از بالای هر نمونه برداشته و به یک فالكون تمیز ریخته و به آن یک میلی‌لیتر TBA اضافه شد سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، اجازه داده شد تا در دمای اتاق سرد شوند. سپس جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر (T80 UV/VIS ساخت شرکت PJ انگلستان) اندازه‌گیری شد (Mirzaei Rad و همکاران، ۲۰۱۶؛ Frederick، ۲۰۱۰).

## تجزیه و تحلیل آماری

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

مدل آماری این طرح عبارت است از:

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

$$Y_{ij} = \text{مشاهده } ij \text{ ام}$$

$$\mu = \text{میانگین جمعیت}$$

$$T_i = \text{اثر تیمارها}$$

$$e = \text{اثر باقیمانده ناشی از عوامل ناشناخته } ij \text{ ام}$$

## نتایج

## بررسی فراسنجه‌های تحرک اسپرم

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

## زنده‌مانی، یکپارچگی غشای اسپرم، مورفولوژی

## اسپرم و پراکسیداسیون لیپید

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

<sup>10</sup>Malondialdehyde (MDA)

<sup>11</sup>Ethylennedinitrilotetraacetic acid

<sup>12</sup>Butylated hydroxytoluene

<sup>13</sup>Trichloressigsaur

جدول ۲: مقایسه ویژگی‌های حرکتی اسپرم خروس در سطوح مختلف ۲؛ دی‌نیتروفنول (میانگین ± خطای معیار)

متغیرها Variables	TM (%)	PM (%)	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	ALH ( $\mu\text{m}$ )	STR (%)	LIN (%)	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	BCF (Hz)
شاهد	71 <sup>ab</sup> ± 2/2	26/20 <sup>b</sup> ± 0/96	26/86 ± 3/33	22/90 ± 2/78	3/07 <sup>ab</sup> ± 0/24	81/76 <sup>ab</sup> ± 1/42	32/78 ± 0/91	52/30 ± 13/44	11/81 ± 1/46
0/25 nM	78/60 <sup>a</sup> ± 2/2	28/00 <sup>b</sup> ± 0/96	32/24 ± 3/33	24/49 ± 2/78	3/95 <sup>a</sup> ± 0/24	76/24 <sup>b</sup> ± 1/42	33/86 ± 0/91	71/95 ± 13/44	14/09 ± 1/46
0/50 nM	76/60 <sup>a</sup> ± 2/2	26/00 <sup>cb</sup> ± 0/96	22/90 ± 3/33	17/79 ± 2/78	3/04 <sup>ab</sup> ± 0/24	80/71 <sup>ab</sup> ± 1/42	39/33 ± 0/91	60/59 ± 13/44	14/97 ± 1/46
0/75 nM	79/60 <sup>a</sup> ± 2/2	41/20 <sup>a</sup> ± 0/96	31/08 ± 3/33	25/69 ± 2/78	3/29 <sup>ab</sup> ± 0/24	82/83 <sup>a</sup> ± 1/42	34/47 ± 0/91	66/4 ± 13/44	14/29 ± 1/46
1 nM	61/80 <sup>b</sup> ± 2/2	22/00 <sup>c</sup> ± 0/96	20/47 ± 3/33	17/06 ± 2/78	2/58 <sup>b</sup> ± 0/24	82/35 <sup>a</sup> ± 1/42	32/97 ± 0/91	51/99 ± 13/44	12/05 ± 1/46

میانگین‌های با حرف‌های ناهمسان (a, b, c) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ).  
 ALH: بیشترین دامنه حرکت‌های جانبی بر حسب میکرومتر، BCF: فرکانس حرکت‌های جانبی بر حسب هر تریز، LIN: معیار خطی بودن حرکت اسپرم که بر حسب درصد است، PM: جنبایی پیشرونده، STR: معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم بر حسب درصد، TM: جنبایی کل، VAP: میانگین سرعت در مسیر مستقیم، VCL: سرعت واقعی اسپرم در خط مستقیم، VSL: سرعت اسپرم طی خط مستقیم.

جدول ۳: صفات زنده مانی، یکپارچگی غشاء، میزان اسپرم سالم و تولید مالون دی آلدئید در سطوح مختلف ۲؛ دی‌نیتروفنول (میانگین ± خطای معیار)

متغیر	زنده مانی (%)	یکپارچگی غشای پلاسمایی (%)	اسپرم سالم (%)	مالون دی آلدئید
گروه شاهد	70/60 <sup>c</sup> ± 0/81	48/00 <sup>d</sup> ± 0/97	58/20 <sup>c</sup> ± 0/95	2/17 <sup>ab</sup> ± 0/06
0/25 nM	75/50 <sup>b</sup> ± 0/81	61/00 <sup>c</sup> ± 0/97	66/00 <sup>b</sup> ± 0/95	2/13 <sup>ab</sup> ± 0/06
0/50 nM	78/80 <sup>ab</sup> ± 0/81	69/70 <sup>b</sup> ± 0/97	68/60 <sup>b</sup> ± 0/95	1/94 <sup>bc</sup> ± 0/06
0/75 nM	82/20 <sup>a</sup> ± 0/81	77/80 <sup>a</sup> ± 0/97	72/80 <sup>a</sup> ± 0/95	1/83 <sup>c</sup> ± 0/06
1 nM	61/40 <sup>d</sup> ± 0/81	44/80 <sup>d</sup> ± 0/97	58/20 <sup>c</sup> ± 0/95	2/34 <sup>d</sup> ± 0/06

میانگین‌های با حرف‌های ناهمسان (a, b, c, d) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ).

## بحث

در پژوهش حاضر، اثرات جفت جدا کن ۲،۴-دی نیتروفنول بر پارامترهای حرکتی اسپرم، یکپارچگی غشای پلاسمایی، مورفولوژی اسپرم، زنده مانی و میزان لیپید پراکسیداسیون بررسی گردید. نتایج حاکی از بهبود قابل توجهی در زمان استفاده از DNP در سطح ۰/۷۵ نانومولار در متغیرهای زنده مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، مورفولوژی، لیپید پراکسیداسیون، تحرک کل و پیش رونده اسپرم پس از یخ گشایی نسبت به گروه شاهد بود (جدول ۲ و ۳). میتوکندری اندامک مهم و منحصر به فردی است که در جنبایی، زنده مانی، بلوغ اسپرم، باروری و کیفیت اسپرم نقش داشته و به علت دارا بودن ویژگی های منحصر به فرد، آسیب پذیرترین قسمت سلول نسبت به ROSها و شروع کننده استرس اکسیداتیو است (Choi و همکاران، ۲۰۰۷؛ Skulachev و همکاران، ۲۰۰۹؛ Fang، ۲۰۱۴). اختلال در عملکرد میتوکندری سبب کاهش کیفیت اسپرم و مشکلات باروری می گردد (Ford، ۲۰۰۶). بنابراین محافظت از عملکرد میتوکندری می تواند نقش اساسی در بهبود کیفیت اسپرم و باروری داشته باشد. نتایج بررسی ما نشان داد که استفاده از DNP باعث کاهش لیپید پراکسیداسیون، افزایش زنده مانی و بهبود کیفیت اسپرم در مقایسه با گروه شاهد گردید، این یافته ها مطابق با مطالعات پیشین (Fang و همکاران، ۲۰۱۴؛ Dong و همکاران، ۲۰۱۰؛ Silva و همکاران، ۲۰۱۶) است. القای جداکننده های میتوکندری به وسیله دی نیتروفنول در شرایط آزمایشگاهی کشت جنین خوگ و گاو (Thompson و همکاران، ۲۰۰۰؛ Machaty و همکاران، ۲۰۰۱) مفید بوده است. استفاده از DNP در انجماد مایع منی میمون رزوس یک افزایش جنبایی متعاقب یخ گشایی را سبب گردید (Dong و همکاران، ۲۰۱۰). فانگ و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که این ترکیب مسئول کاهش تولید ROS، پراکسیداسیون لیپید و افزایش زنده مانی متعاقب یخ گشایی در گربه ماهی زرد بوده است با این حال اثرات DNP ممکن است در ارتباط با خصوصیات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گامت ها باشد زیرا در انزال هایی با زنده مانی پایین متعاقب

یخ گشایی نسبت به اسپرم هایی با جنبایی بالا پس از یخ گشایی معمولاً مؤثرتر می باشد (Dong و همکاران، ۲۰۱۰). نتایج حاصل از مطالعه بر روی موش نشان داد که جلوگیری از تولید ROS به وسیله ترکیبات شیمیایی جفت جداکن ممکن است یک استراتژی بسیار مؤثرتری نسبت به تلاش برای حذف یا خنثی کردن گونه های ROS با مکمل های آنتی اکسیدانی باشد (Dong و همکاران، ۲۰۱۰). مطالعه اثرات فعال سازی پروتئین جفت جدا کن<sup>۱۴</sup> در مواجهه با سرمای شدید بر تولید ROS, MDA, ATP فراسنجه های حرکتی اسپرم، باروری و ارتباط آن با آسیب اکسیداتیو و کیفیت اسپرم در اسپرم تازه و یخ گشایی گورخر ماهی بررسی شد. نتایج حاصل از مطالعات آنها حاکی از افزایش جنبایی متعاقب یخ گشایی، کاهش لیپید پراکسیداسیون، افزایش تولید ATP و در نهایت افزایش موفقیت در باروری بود (Wang و همکاران، ۲۰۱۵). جفت جداکن های شیمیایی مانند DNP و کربونیل سیانید-P-تری فلورو متوکسی فنیل هیدرازین تولید H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> میتوکندری را کاهش می دهند که به شدت جالب توجه و شایسته بررسی می باشند (Mailloux and Harper، ۲۰۱۰). نتایج حاصل از مطالعه Silva و همکاران (۲۰۱۶) بر روی انجماد اسپرم خوگ نشان داد که افزودن DNP تأثیری بر روی یکپارچگی غشای پلاسمایی، لیپید پراکسیداسیون و زنده مانی اسپرم خوگ نداشت. Shabalina و همکاران (۲۰۱۰) مخالف با این نظریه هستند که جداکننده ها تولید ROS را کاهش می دهند و فقط کاهش تولید ROS در کمپلکس II و فقط در حضور سوبسترای سوکسینات وابسته به پتانسیل غشاء می دانند که می تواند تولید ROS را کاهش دهد و بیان کردند که برای انجام این عمل نیاز به سطوح بالایی از سوکسینات است که این سطوح بالای سوکسینات در حالت عادی وجود ندارد (Shabalina و همکاران، ۲۰۱۰). مهار UCP<sub>2</sub> به وسیله گنیپین منجر به افزایش سریع H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> می گردد. این شواهد بعداً بوسیله مشاهده کاهش تولید ROS به وسیله بیان بیش از حد UCP<sub>2</sub> حمایت گردید (Lee و همکاران، ۲۰۰۵). در موش های فاقد UCP<sub>2</sub> تولید و انتشار ROS

<sup>14</sup> Uncoupling Protein2(Ucp2)



انجماد اسپرم باشد (Mailloux and Harper, 2011). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که افزایش جنبایی و بهبود تحرک کل با وجود استفاده از ۲،۴-دی نیتروفنول حفظ می گردد. با توجه به این که ۲،۴-دی نیتروفنول در سطوح پایین مورد استفاده یک کاهش کوچک در پتانسیل غشاء ایجاد می کند که این کاهش جزئی باعث کاهش در تولید ATP نمی گردد. از سوی دیگر انرژی مورد نیاز برای جنبایی اسپرم از طریق گلیکولیز تامین می گردد پس کاهش در تولید ATP از طریق مسیر فسفریلاسیون اکسیداتیو تاثیری روی جنبایی اسپرم نخواهد گذاشت. بنابراین کاهش جزئی پتانسیل غشا با کاهش در تولید ROS سبب بهبود فراسنجه های حرکتی اسپرم گردید. جنبایی برآورد ساده و سریعی از کیفیت اسپرم است که به طور معمول در اسپرم یخ گشایی شده به علت همبستگی آن با باروری مورد توجه قرار می گیرد. افزایش تحرک پس از یخ گشایی سبب افزایش باروری موفق می گردد که بیانگر آن است که تحرک و سرعت اسپرم از شاخص های مهم در ارزیابی کیفیت اسپرم می باشد. ارتباط لقاح موفق با لپید پراکسیداسیون قابل فهم است. اسپرم ها حاوی غلظت های بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع می باشند بنابراین به پراکسیداسیون لپیدها بسیار حساس می باشند. کاهش لپید پراکسیداسیون به حفظ غشای پلاسمایی اسپرم و یکپارچگی غشای میتوکنندری، حفظ سیگنالینگ مولکولی که برای باروری موفقیت آمیز ضروری می باشد کمک می کند (Wang و همکاران، 2015). حرکت اسپرم نیاز به مقدار زیادی انرژی برای دستگاه فلاژلوم اسپرماتوزوئید دارد. آدنوزین تری فسفات مورد نیاز برای حمایت از فعالیت های حیاتی اسپرم بوسیله دو مسیر متابولیکی، گلیکولیز و فسفریلاسیون اکسیداتیو تامین می شود. در میتوکنندری ها تولید انرژی از طریق فسفریلاسیون اکسیداتیو و در قسمت سر و قطعه اصلی تاژک از طریق گلیکولیز می باشد. گلیکولیز انرژی مورد نیاز برای ظرفیت پذیر شدن، پرتحرک شدن و واکنش های آکروزومی را تامین می کند. فسفریلاسیون اکسیداتیو انرژی مورد نیاز برای تمایز و بلوغ و جنبایی را تامین می کند؛ مسیرهای متابولیکی تامین انرژی در اسپرم ها یک حالت مختص به گونه می باشد. فعالیت

میتوکنندری افزایش می یابد (Mailloux and Harper, 2010؛ Lee و همکاران، 2009). با توجه به متناقض بودن نتایج حاصل از DNP در گونه های مختلف (Silva و همکاران، 2016؛ fang و همکاران، 2016؛ Dong و همکاران، 2010؛ Matsumoto و همکاران، 2008؛ Lanning و همکاران، 2002؛ Lardy و همکاران، 1948) می توان دلیل نتایج حاصل را اینگونه بیان نمود. تأثیر مطلوب آنتی اکسیدان هدفمند مورد مطالعه به علت محافظت از عملکرد میتوکنندری می باشد (Murphy and Smith)، در نتیجه استفاده از آنتی اکسیدانی که توانایی نفوذ به میتوکنندری و محافظت از آن در برابر آسیب های ROS را دارا می باشند می توانند سبب بهبود فراسنجه های کیفی اسپرم گردند. مطالعات در موش های تراریخت نشان داد که ژن کاتالاز، زمانی که میتوکنندری را هدف قرار می دهد با کاهش آسیب های ناشی از ROS، طول عمر را به طور قابل توجهی افزایش می دهد. در حالی که بیان بیش از حد آنزیم کاتالاز در هسته یا پراکسیزوم اثر قابل توجهی بر روی طول عمر نداشت (Mukhopadhyay and Weiner, 2007). پروتئین های جفت جداکن کانالهایی هستند که در غشای داخلی میتوکنندری حضور داشته و متعلق به خانواده ناقل های آنیونی هستند اولین دفاع آنتی اکسیدانی میتوکنندری در برابر ROS می باشد که با کاهش جزئی در پتانسیل غشاء و افزایش مصرف اکسیژن سبب کاهش تولید ROS می گردند (Fang و همکاران، 2014؛ Rousset و همکاران، 2004؛ Dong و همکاران، 2010؛ Harper، 2001؛ Ehtay، 2007). 4-هیدروکسی نونال یک محصول لپید پراکسیداسیون در استرس اکسیداتیو است که می تواند سبب فعال شدن  $UCP_2$  و به دنبال آن سبب کاهش تولید ROS و کاهش آسیب های اکسیداتیو گردد (Ehtay and Brand, 2007). همچنین  $UCP_2$  می تواند به طور مستقیم آنیون سوپراکسید را از سراسر غشای داخلی میتوکنندری به سیتوپلاسم منتقل کرده و سبب حذف آنیون سوپراکسید از میتوکنندری گردد (Azzu and Brand, 2010؛ Wojtczak و همکاران، 2011). از این رو فعال سازی  $UCP_2$  ممکن است یک روش موثر برای کاهش تنش اکسیداتیو در

Plessis و همکاران، ۲۰۱۵). در صورتی که جنبایی اسپرم گاو به چرخه کربس و جنبایی اسپرم موش به گلیکولیز وابسته می‌باشد (Ferramosca، ۲۰۱۴).

### نتیجه‌گیری

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

### تشکر و قدردانی

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

اسپرم موش و گرز در محیط‌های فاقد گلوکز متوقف می‌گردد. گلوکز برای ظرفیت پذیری، افزایش تحرک و اتصال اسپرم به تخمک در بعضی از پستانداران مانند انسان، موش، گرز و همستر ضروری است. اما اضافه کردن گلوکز، ظرفیت پذیری اسپرم گاو، سگ و خوکچه هندی را متوقف می‌کند (Ferramosca، ۲۰۱۴؛ Amaral و همکاران، ۲۰۱۳؛ Du Plessis و همکاران، ۲۰۱۵). اما نباید فراموش کرد که عملکرد صحیح میتوکندری برای باروری ضروری بوده و نقص در عملکرد آن می‌تواند سبب ایجاد ناباروری گردد (Amaral و همکاران، ۲۰۱۱؛ Mukai and Okuno، ۲۰۰۴). مطالعات نشان داده‌اند که گلیکولیز یک نقش بسیار مهم در جنبایی اسپرم دارد. ATP تولید شده در میتوکندری برای انتشار در طول تاژک کافی نبوده و برای انتشار در طول تاژک مدت زمان بیشتری نیاز دارد. بخصوص در گونه‌هایی مانند جوندگان که اسپرم آنها دارای دم طویل می‌باشند. اگر چه این دلیل هنوز مورد مناقشه است (Ford، ۲۰۰۶؛ Mukai and Okuno، ۲۰۰۴؛ Hansford، ۱۹۹۷). علاوه بر این مطالعات در موش نشان داد، نقص در فسفریلاسیون اکسیداتیو مهار کننده جنبایی اسپرم نیست (Ferramosca، ۲۰۱۴). آنزیم‌های گلیکولیتیک در قطعه میانی دم اسپرم پستانداران شناسایی شده‌اند که شامل هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز و گلیسرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز می‌باشد (Du Plessis و همکاران، ۲۰۱۵). با این حال چندین دلیل وجود دارند که بیان می‌کند گلیکولیز منبع تولید ATP برای جنبایی اسپرم است. در تعدادی از موش‌های نر تعدادی از آنزیم‌های مرتبط با گلیکولیز مثل انولاز ۴ (Du Plessis و همکاران، ۲۰۱۵)، گلیسرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز، فسفوگلیسرات کیناز، لاکتات دهیدروژناز را از بین بردند و مشاهده کردند که عملکرد اسپرم دچار اختلال شده (بویژه از نظر تحرک) و باروری خود را از دست داده‌اند. نتایج حاصل از مطالعات نشان داده است که برخی از سویه‌ها بیشتر از سویه‌های دیگر به گلیکولیز متکی هستند. استفاده از لیزر توئیزر<sup>۱۵</sup> نشان داد که جنبایی اسپرم انسان وابسته به پتانسیل غشاء میتوکندری<sup>۱۶</sup> نیست. اسپرم گراز دارای بالاترین فعالیت گلیکولیتیک است (Du

<sup>15</sup> Laser tweezers

<sup>16</sup> Mitochondrial membrane potential (MMP)

منابع

- Balercia G, Gandini L, and Lenzi A. (2017). Antioxidants in andrology. *Trends in Andrology and sexual medicine*. Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland.
- Choi, S.Y., Gonzalvez, F., Jenkins, G.M., Slomianny, C., Chretien, C., Arnoult, D., et al. (2007). Cardiolipin deficiency releases cytochrome c from the inner mitochondrial membrane and accelerates stimuli-elicited apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 14: 597–606.
- Dong, Q., Tollner, T.L., Rodenburg, S.E., Hill, D.L. and VandeVoort, C.A. (2010). Antioxidants, oxyrase, and mitochondrial uncoupler 2, 4-dinitrophenol improved postthaw survival of rhesus monkey sperm from ejaculates with low cryosurvival. *Fertility and Sterility*, 94: 2359-2361.
- Echtay, K.S. (2007). Mitochondrial uncoupling proteins—What is their physiological role? *Free Radical Biology and Medicine*, 43: 1351-1371.
- Echtay, K.S. and Brand, M.D. (2007). 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production. *Redox Report*, 12: 26-29.
- Fang, L., Bai, C., Chen, Y., Dai, J., Xiang, Y., Ji, X et al. (2014). Inhibition of ROS production through mitochondria-targeted antioxidant and mitochondrial uncoupling increases post-thaw sperm viability in yellow catfish. *Cryobiology*, 69: 386-393
- Amaral, A., Lourenco, B., Marques, M. and Ramalho-Santos, J. (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, 146: 163-174.
- Amaral, A., Paiva, C., Baptista, M., Sousa, AP. and Ramalho-Santos, J. (2011). Exogenous glucose improves long-standing human sperm motility, viability, and mitochondrial function. *Fertility and Sterility*, 96: 848–850.
- Antonenko, Y.N., Avetisyan, A.V., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Chertkov, V.A., Domnina, L.V et al. (2008). Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of an aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies. *Biochemistry*, 73: 1273–1287.
- Azzu, V. and Brand, M.D. 2010. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 35: 298-307.
- Akhlaghi A, Jafari Y, Zhandi M and Peebles ED. (2014). Reproductive performance, semen quality, and fatty acid profile of spermatozoa in senescent broiler breed rooster as enhanced by the long-term feeding of dried apple pomace. *Animal Reproduction Science*. 147: 64-73
- Baffy, G. (2010). Uncoupling protein-2 and cancer. *Mitochondrion*, 10:243–252
- Bakhshayesh Khiabani, A., Moghaddam, G. and Daghigh Kia, H. (2017). Effects of adding different levels of Glutamine to modified Beltsville extender on the survival of frozen rooster semen. *Animal Reproduction Science*, 184: 172–177

- Karim, S. and Echtay, M.D. (2007). 4-Hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production. *W. S. Maney and Son Ltd*, 12: 26-29.
- Kudin, A.P., Bimpong-Buta, N.Y., Vielhaber, S., Elger, C.E. and Kunz, W.S. (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 4127-4135.
- Lanning, L.L., Creasy, D.M., Chapin, R.E., Mann, P.C., Barlow, N.J., Regan, K.S et al. (2002). Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30, 507-520.
- Lardy, H.A. and Phillips, P.H. (1945). Studies of fat and carbohydrate oxidation in mammalian spermatozoa. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 6: 53-61.
- Lee, S.C., Robson-Doucette, C.A. and Wheeler, M.B. (2009). Uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species formation in islets and influences susceptibility to diabetogenic action of streptozotocin. *Journal of Endocrinology*, 203:33-43.
- Machaty, Z., Thompson, J.G., Abeydeera, L.R., Day, B.N. and Prather, R.S. (2001). Inhibitors of mitochondrial ATP production at the time of compaction improve development of in vitro produced porcine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 58: 39-44.
- Madeddu, M., Mosca, F., Abdel Sayed, A., Zaniboni, L., Mangiagalli, MG., Colombo, E et al. (2016). Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: Comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen. *Animal Reproduction Science*, 171: 58-64.
- Ferramosca, A. (2014). Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *Biomed Research International*, 1-8.
- Ford, W.C.L. (2006). Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Human Reproduction Update*, 12(3): 269-274
- Frederick, S. (2010). *Hep G2 Hepatocyte Lipid Peroxidation Assay*. NCL Method GTA- 4. Version 1.1.
- Hansford, R.G., Hogue, B.A. and Mildaziene, V.J. (1997). Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 29: 89-95
- Harper, J.A., Dickinson, K. and Brand, M.D. (2001). Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obesity Reviews*, 2:255-65.
- Herrero, A. and Barja, G. (1998). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: sites of free radical generation and mechanisms involved. *mech. Mechanisms of Ageing and Development*, 103 133-146.
- Hirst, J., King, MS. and Pryde, K.R. (2008). The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochemical Society Transactions*, 36: 976-980.
- Hoffman, D.L., Salter, J.D. and Brookes, P.S. (2007). Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory*, 292: 101-108.

- Safa, S., Moghaddam, G., Jozani, R.J., Daghigh Kia, H. and Janmohammadi, H. (2016). Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. *Animal Reproduction Science*, 174, 100–106.
- Shabalina, O.N., Shekarova, M.V., Skulachev, T.V., Titova, V.A., Vygodin, M.Y., Vyssoikh, M.N et al. (2011). Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents. *Aging (Albany)*, 3: 1110–1119
- Silva, E.F., Junior, A.S.V., Cardoso, T.F., Stefanello, F.M., Kalb, A.C., Martínez, P.E et al. (2016). Reproductive toxicology of 2,4 dinitrophenol in boar sperm. *Toxicology in Vitro*, 35: 31–35.
- Skulachev, V.P., Anisimov, V.N., Antonenko, Y.N., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Elichev, V.P et al. (2009). An attempt to prevent senescence: A mitochondrial approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787: 437–461.
- Smith, R.A. and Murphy, M.P. (2011). Mitochondria-targeted antioxidants as therapies. *Discovery medicine*, 11: 106–114.
- Thompson, J., McNaughton, C., Gasparrini, B. and McGowan, L. (2000). Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. *Reproduction Fertility*, 118: 47-55.
- Venditti, P., Di Stefano, L. and Di Meo, S. (2013). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*, 13: 71-82.
- Mailloux, R.J. and Harper, M.E. (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radical Biology and Medicine*, 51:1106–1115.
- Mirzaei Rad, H., Eslami, M. and Ghanie, A. (2016). Palmitoleate enhances quality of rooster semen during chilled storage. *Animal Reproduction Science*, 165: 38–45.
- Mphaphathi, M.L., Seshoka, M.M., Luseba, D., Sutherland, B. and Nedambale, T.L. (2016). The characterisation and cryopreservation of Venda chicken semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5: 132–139
- Mukai, C. and Okuno, M. (2004). Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction*, 71:540–547.
- Mukhopadhyay, A. and Weiner, H. (2007). Delivery of drugs and macromolecules to mitochondria. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 729–738.
- Murphy, M.P. and Smith, R.A.J. (2000). Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 41: 235–250.
- Rousset, R., Alves-Guerra, M.C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulier, A.M., Bouillaud, F.R et al. (2004). The Biology of Mitochondrial Uncoupling ProteinS. *Diabetes*, 53(1): 130-135.
- Rui, B.R., Angrimani, D.S.R., Losano, J.D.A., Bicudo, L.D.C., Nichi, M., and Pereira, R.J.G. (2017). Validation of simple and cost-effective stains to assess acrosomal status, DNA damage and mitochondrial activity in rooster spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 187: 133–140.

