14(1) 49-56, Spring 2022

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

Original Research Paper

The Effect of adding rosemary aqueous extract in to extender on cryopreservation of ram semen

Sakineh Asdzadeh* *, Behzad Sadeghi

Department of Animal Science, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

Key Words
Rosemary extract
Cryopreservation
Semen
Ram

Abstract

Introduction: One of the freezing semen disadvantages is increasing of free radicals leading to enhanced sperm membrane peroxidation then consequently causes lowered semen fertility after thawing. Some plants bearing high level of natural antioxidants can help to decrease semen peroxidation. The objective of the present study is to evaluate the ability of rosemary extract to protect ram sperm from freeze-thaw damages.

Materials & Methods: In this study, ejaculates were collected from 4 Zandi rams. Semen samples were pooled after each sampling. Experimental treatment included five levels of rosemary aqueous extract (0, 2.5, 5, 7.5 and 10 percent). Then samples were frozen and transferred to liquid nitrogen tanks for three weeks. After thawing sperm quality parameters including total and progressive motility, abnormalities, sperm membrane integrity and MDA production were evaluated.

Results: The results showed that rosemary extract significantly improved total and progressive motility, sperm membrane integrity and viability, and decreased sperm abnormalities and MDA production at levels of 5 and 7.5 percent ($p<0.05$).

Conclusion: According to the obtained data, adding specific levels of rosemary extract in the diluent will have a protective effect in the freezing-thawing process of Zandi rams sperm.

* Corresponding Author's email: asadzadeh80@gmail.com
Received: 20 January 2021; Reviewed: 23 February 2021; Revised: 27 April 2021; Accepted: 27 May 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.276096.2477

مقاله پژوهشی

اثر افزودن عصاره آبی رزماری در محیط رقیق‌کننده بر انجمادپذیری اسپرم قوچ

سکینه اسدزاده، بهزاد صادقی*

گروه علوم دامی، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران

کلمات کلیدی

عصاره رزماری
انجماد
منی
قوچ

چکیده

مقدمه: یکی از اثرات منفی انجماد منی دام‌ها افزایش رادیکال‌های آزاد و در نتیجه افزایش پراکسیداسیون غشای سلولی اسپرم است که در نهایت سبب کاهش باروری منی پس از یخ‌گشایی می‌گردد. برخی گیاهان با داشتن سطوح بالای آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌توانند به کاهش پراکسیداسیون کمک نمایند. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی توانایی عصاره رزماری در محافظت از اسپرم قوچ طی فرایند انجماد-یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ٤ رأس قوچ نژاد زندی نمونه اسپرم جمع‌آوری شد نمونه‌های منی در هر بار اسپرم‌گیری با هم مخلوط شدند. تیمارهای آزمایشی شامل۵ سطح عصاره رزماری (۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰درصد) بودند.سپس، نمونه‌ها منجمدشده و به‌مدت ۳ هفته درمخزن ازت نگه‌داری‌شدند. پس از یخ‌گشایی پارامترهای کیفی اسپرم شامل جنبایی کل و حرکت پیشرونده، میزان ناهنجاری‌ها، یکپارچگی غشای اسپرم و میزان تولید MDA اسپرم ارزیابی شدند.

نتایج: نتایج حاصل نشان‌داد که عصاره‌رزماری به‌طور معنی‌داری درسطوح ۵ و ۷/۵ درصد سبب بهبودجنبایی کل، حرکت پیش‌رونده، یکپارچگی غشاء و زنده‌مانی شد و میزان ناهنجاری‌های اسپرم و تولید MDA را کاهش داد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری و بحث: با توجه به داده‌های حاصله، افزودن سطوح مشخص عصاره رزماری در رقیق‌کننده، اثر محافظتی در فرایند انجماد-یخ‌گشایی اسپرم قوچ زندی خواهد داشت.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: asadzadeh80@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱ بهمن ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۵ اسفند ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۷ اردیبهشت ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ٦ خرداد ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.276096.2477

مقدمه

انجماد منی نقش بسیار زیادی در توسعه تکنیک‌های مرتبط با تولیدمثل ازجمله تلقیح مصنوعی دارد (۱). ذخیره‌سازی طولانی‌مدت منی دام برای دستیابی به مزایای تلقیح مصنوعی، یک امر ضروری می‌باشد که به‌واسطه فرایند انجماد اسپرم تحقق یافته و سبب توقف فعالیت‌های متابولیکی اسپرم‌ها می‌شود. هر یک از مراحل انجماد می‌تواند سبب آسیب به ساختار غشای پلاسمایی اسپرم شده و به دنبال آن عملکرد طبیعی اسپرم تحت تاثیر قرار گرفته و تحرک و باروری اسپرم را کاهش دهند (۲). آسیب‌های وارده به اسپرم طی فرایند انجماد و ذوب اصلی‌ترین دلیل کاهش باروری ناشی از تلقیح اسپرم یخ زده نسبت به اسپرم تازه می‌باشد. طیف وسیعی از آسیب‌ها مانند شوک سرمایی، تشکیل کریستال‌های یخ و اکسیداسیون اسیدهای چرب در حین این فرایندها اتفاق می‌افتد. تنش اکسیداتیو مهم‌ترین آسیب وارده به اسپرم در طی فرایند انجماد-ذوب می‌باشد. رادیکال‌های آزاد با آسیب زدن به DNA میتوکندری اسپرم و برهم زدن ساختار غشای سلول سبب بروز تنش اکسیداتیو در سلول می‌شوند. درپایان نیز این آسیب‌ها سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول اسپرم شده و باعث کاهش جنبایی و به‌دنبال آن کاهش باروری می‌شود (۳). غشای پلاسمایی اسپرم پستانداران به‌طور ویژه غنی از اسیدهای چرب غیراشباع با چندین پیوند دوگانه (PUFA) است. این غلبه PUFA اسپرم را به میزان بالایی به پراکسیداسیون لیپیدی حساس می‌کند، پراکسیداسیون لیپیدی به غشاهای اسپرم پستانداران و نیز ساختار ماتریکس لیپیدی صدمه زده، که نتیجه تهاجم گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) است. دو محل اصلی تولید ROSها میتوکندری و غشای پلاسمایی اسپرم می‌باشد. یون هیدروکسیل، هیدروژن پراکسید، رادیکال هیدروکسیل و یون هیپوکلریت نمونه‌هایی از گونه‌های اکسیژن فعال به‌شمار می‌روند (۴). گونه‌های اکسیژن از طریق واکنش با غشای پلاسمایی، میتوکندری و DNA می‌توانند سبب ایجاد آسیب در اسپرم شوند (۵). برای برطرف نمودن این مشکل استفاده از آنتی‌کسیدان‌ها اهمیت فوق‌العاده‌ای دارند. آنتی‌اکسیدان‌ها با مهار واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداتیو و ایجاد تعادل بین مواد اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی سبب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شوند (۶). اگرچه در حالت طبیعی پلاسمای منی دارای مکانیسم‌های آنتی‌کسیدانی برای مهار ROS گونه‌های اکسیژن فعال‌ها و محافظت علیه هر نوع آسیب وارده به اسپرم می‌باشد ولی این میزان آنتی‌اکسیدان کافی نبوده و برای فرآوری اسپرم نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدان‌های با منشا خارجی می‌باشد (۶). موضوع مهمی که مطرح می‌شود این است که هدف از افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها حذف کامل رادیکال‌های آزاد نیست بلکه هدف اصلی نگه‌داشتن غلظت رادیکال‌های آزاد در یک حد فیزیولوژیکی ثابت است (۷). عصاره بسیاری از گیاهان حاوی ترکیبات بیواکتیو ازجمله فنول‌ها و فلاونوییدها هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی موثری را نشان داده و از آسیب حاصل از رادیکال‌های آزاد ممانعت می‌کنند (۸). یکی از خصوصیات مهم فلاونوییدها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها است که می‌تواند با تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل در مولکول مرتبط باشد (۹). امروزه به‌دلیل مشکلات ایمنی و هم‌چنین وجود ترکیبات سمی در برخی از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک و مشکلات اقتصادی، استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی رواج یافته است (۱۰). در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی در رابطه با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌ویژه از منشا گیاهی افزایش یافته است (۱۱). گیاه رزماری با نام علمی *Rosmarinu officinalis* متعلق به خانواده نعناعیان می‌باشد که قابلیت زیادی در تولید آنتی اکسیدان از خود نشان داده است. اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدسرطانی و ضدایدزی این گیاه مشخص شده است. این گیاه حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی همانند رزماریتیک، کارنوزول و اسیدکارنوزیک است (۱۲). در تحقیقات متعددی اثر عصاره رزماری به تنهایی یا همراه با سایر ترکیبات بر کیفیت اسپرم خوک (۱۳)، گاو (۱۴)، بز (۱۵) و خروس (۱۶) و نمونه اپیدیدمی اسپرم گوسفند (۱۰) بررسی شد که در همه آن‌ها کاربرد گیاه رزماری سبب بهبود کیفیت اسپرم شده بود. هدف این پژوهش استفاده از عصاره رزماری در رقیق‌کننده منی برای جلوگیری و یا کاهش آسیب‌های انجمادی به ساختار و کیفیت اسپرم در طول فرآیند انجماد-ذوب اسپرم قوچ زندی بود.

مواد و روش‌ها

تیمارهای آزمایشی: استخراج عصاره آبی از گیاه رزماری در آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد قائمشهر انجام شد. ۰/۱۵ گرم برگ تازه گیاه رزماری که از بوته‌های رزماری برداشت شده بود به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر در حال جوش با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه حرارت دیده و بعد از طی زمان مورد نظر از روی شعله برداشته شد و اجازه داده شد تا سرد شود، زمانی‌که دمای عصاره به ۲۵ درجه سانتی‌گراد رسید، عصاره حاصل با استفاده از یک فیلتر سرنگی با قطر منافذ ۲۰ میکرومتر تصفیه شد و در سطوح ۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد (تیمارهای آزمایشی شامل غلظت‌های ۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد عصاره آبی رزمای می‌باشد که حجم‌های عصاره جایگزین بخش بافر تریس شد) به محیط اضافه شد.

جمع‌آوری مایع منی: در این تحقیق از منی چهار راس قوچ نژاد زندی (سن ۳ سال) استفاده شد. نمونه‌های منی قوچ‌های آموزش

دیده به‌صورت هفته‌ای دو بار به‌وسیله مهبل‌مصنوعی، بادمای درونی (۴۰-۳۷ °C) فشار لازم که برای نعوظ آلت نر برای انزال منی لازم است، جمع‌آوری شدند.

ارزیابی اولیه نمونه منی: برای جلوگیری از ایجاد شوک سرمایی به اسپرم‌ها، نمونه‌های منی تا زمان انتقال به آزمایشگاه، درون فلاسک عایق دارای آب ۳۷-۳۵ °C نگه‌داری و پس از اتمام نمونه‌گیری به سرعت، به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب گرم با دمای ۳۷ °C قرار داده شدند. حجم بین ۲-۰/۷۵ میلی‌لیتر، غلظت بیش‌تر از $۲/۵\times۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک بیش‌تر از ۷۰ درصد و مورفولوژی اسپرم غیرطبیعی کم‌تر از ۱۰ درصد، در هر انزال به‌عنوان اسپرم طبیعی درنظر گرفته می‌شد.

رقیق‌سازی مایع منی و افزودن تیمارهای آزمایشی: برای ساخت رقیق‌کننده از یک محیط بر پایه تریس استفاده گردید. محیط پایه حاوی تریس، سیتریک‌اسید، فروکتوز و زرده تخم‌مرغ بود (جدول ۱). اسمولاریتی محیط پایه ۴۲۵ میلی‌اسمولار و اسیدیته آن ۶/۸ تنظیم شد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در مطالعه حاضر از شرکت سیگما تهیه شد.

جدول ۱: اجزای مواد تشکیل‌دهنده محیط انجماد بر پایه تریس بدون عصاره رزماری

مواد		مقدار	
اجزاء بافر تریس	تریس	۳۰/۷۷ (گرم/لیتر)	٪۸۰
	سیتریک اسید	۱۶/۴ (گرم/لیتر)	
	فروکتوز	۱۲/۶ (گرم/لیتر)	
زرده تخم‌مرغ			٪۱۵
گلیسرول			٪۵

رقیق‌کننده پایه به تعداد تیمارهای آزمایشی در لوله‌های مشخص تقسیم شد و سطوح مختلف عصاره آبی رزماری به آن‌ها اضافه شد. رقیق‌سازی به نسبت ۱ حجم منی و ۲۰ حجم محیط‌های انجماد فوق‌الذکر در دمای ۳۷ °C انجام شد. سپس لوله حاوی منی در ظرف محتوی ۱۰۰ سی‌سی آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد در یخچال ۵ °C به‌مدت ۲ ساعت برای به تعادل رسیدن نگه‌داری شد. سپس بلافاصله در استراهای انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتر کشیده شد. در مرحله بعد، نی‌های بسته شده حاوی منی به فاصله ۵ سانتی‌متری بالای سطح بخار ازت مایع قرار گرفت. پس از گذشت ۷ دقیقه با سرعت منی در داخل ازت مایع (۱۹۶ °C-) غوطه‌ور شده و استراهای مربوط به هر گروه تیماری در گابلت‌های مخصوص قرار داده شدند.

یخ‌گشایی: برای ذوب منی، پس از خارج کردن استراهای انجمادی منی از ازت مایع، به‌مدت ۳۰ ثانیه در داخل حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس با استفاده از یک قیچی طرفی از استرا که با خمیر مسدود شده بود، چیده شده و به‌داخل لوله‌های اپیندورف ریخته شدند.

ارزیابی اسپرم بعد از فرایند انجماد- ذوب

تحرک: اولین پارامتر ارزیابی در این تحقیق بررسی تحرک اسپرم پس از انجماد- ذوب بود. برای این آزمایش استراها پس از ۲۱ روز انجماد در مخزن نیتروژن مایع، یخ‌گشایی شدند. سپس با استفاده از پیپت سمپلر و با برداشتن ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام و گذاشتن یک لامل تمیز برروی آن، لام مورد نظر با استفاده از میکروسکوپ مجهز به سیستم آنالیز رایانه‌ای اسپرم CASA (CASA, Video TesT-Sperm 3.1, Russia) و براساس شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم با مشخصات سیستماتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. پارامترهایی که توسط این سیستم برآورد شدند به‌شرح زیر می‌باشند:

Total motility (TM): جنبایی کل؛ درصد اسپرم‌های دارای جنبش

Progressive motility (PM): جنبایی پیش‌رونده؛ درصد اسپرم‌های دارای جنبایی رو به جلو

Linearity (LIN): درصد خطی بودن جنبایی (VSL/VCL x 100)

Straight Line Velocity (VSl): سرعت در مسیر مستقیم (میکرون بر ثانیه)

Curvilinear velocity (VCL): سرعت در مسیر منحنی (میکرون بر ثانیه)

Lateral head displacement (ALH): جنبایی عرضی سر (میکرون)

Average path velocity (VAP): سرعت در مسیر میانگین (میکرون بر ثانیه)

Beat cross frequency (BCF): تناوب عرضی زنش (هرتز)

Wobble (WOB): نسبت سرعت VAP به سرعت VCL برحسب درصد

Straightness (STR): درصد مستقیم الخط بودن حرکت اسپرم‌ها (VSL/VAP x 100)

یکپارچگی غشاء: در این مطالعه برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از تست هاست استفاده شد. تست هاست براساس اسمولاریتی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. اسمولاریتی محیط هاست ۱۰۰ میلی اسمولار و اسمولاریته مورد نیاز برای اسپرم ۴۲۵ میلی‌اسمولار است. بنابراین اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. بدیهی است که تنها اسپرم‌های زنده قادر هستند به این نوع تغییر واکنش دهند و اسپرم‌های مرده که در این محیط قرار می‌گیرند هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند. در تحقیق حاضر ۱۰ میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاست که حاوی

فروکتوز وسیترات سدیم بود اضافه شد (جدول ۲). سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل ۳قطره(۱۰میکرولیتر) از نمونه‌انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. بررسی میکروسکوپی با استفاده از یک صفحه داغ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ صورت گرفت. درهر گروه تیماری‌حداقل ۴۰۰ اسپرم‌شمارش شدو درصداسپرم‌های با دم گره خورده (زنده) نسبت به گره نخورده (مرده) محاسبه شد.

جدول۲: اجزای مواد تشکیل‌دهنده محیط HOST برای ارزیابی زنده‌مانی

مواد	مقدار
فروکتوز	۹ (گرم/لیتر)
سیترات سدیم	۴/۹ (گرم/لیتر)
اسمولاریته	۱۰۰(میلی اسمول)

زنده‌مانی: برای‌ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی‌ائوزین- نیگروزین استفاده شد. این‌روش بر این‌اساس می‌باشدکه اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را به‌خود جذب می‌کنند ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی ۲۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم بر روی لام قرار گرفت.۲۰ میکرولیتر از رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین برداشته و روی نمونه ریخته و با سر سمپلر به آرامی نمونه را هم زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ۳۰ ثانیه ۲۰ میکرولیتر از نمونه را برداشته و بر گوشه لام دیگری گذاشته و با یک لام دیگر بر روی لام به‌آرامی‌گسترش‌تهیه‌شد. پس از خشک‌شدن لام رازیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ قرار داده و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۴۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کم‌رنگ به‌خود گرفته یا تنها بخشی از گردن آن‌ها رنگ گرفته بود به‌عنوان اسپرم زنده درنظر گرفته شد.

جدول ۳: اجزای مواد تشکیل‌دهنده محیط ائوزین- نیگروزین

مواد	مقدار
رنگ ائوزین Y	۰/۶۷ (گرم/لیتر)
کلرید سدیم	۰/۹ (گرم/لیتر)
رنگ نگروزین	۱۰ (گرم/لیتر)

ریخت‌شناسی‌اسپرم(تست‌هانکوک): برای‌ارزیابی‌اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول هانکوک افزوده شده و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شده و با شمارش حداقل ۴۰۰ اسپرماتوزوا زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و اسپرم با آکروزوم غیرطبیعی محاسبه شده است. میانگین سه مشاهده به‌عنوان یک داده واحد درنظر گرفته شده است.

جدول ۴: اجزای مواد تشکیل‌دهنده محلول هانکوک

مواد	مقدار
فرمالین ۳۷٪	۶۲/۵ میلی‌لیتر
محلول سالین	۱۵۰ میلی‌لیتر
محلول بافر	۱۵۰ میلی‌لیتر
آب دو بار تقطیر	۵۰۰ میلی‌لیتر

اندازه‌گیری‌مالون‌دی‌آلدئید(MDA): اندازه‌گیری غلظت MDA توسط تست TBARS (Thiobarbituric acid-reactive substances) که یکی از رایج‌ترین روش‌های تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها است، صورت گرفت. یک میلی‌لیتر از نمونه منی درون لوله فالکون ریخته شده، سپس به‌ترتیب ۱ میلی‌لیتر BHT، ۱ میلی‌لیتر EDTA و ۲ میلی‌لیتر TCA به نمونه اضافه شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی که فاقد هرگونه مواد درشت موجود در محیط باشد برداشته شد و به درون یک اپیندورف ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر TBA به آن افزوده شد، در اپیندورف‌ها کاملاً بسته شده و نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه درون‌حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه گذاشته شدند، سپس به‌مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگه‌داشته شدند تا سرد شوند. سپس ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌حاصل‌درون‌کوت‌ریخته‌شد. غلظت MDA موجود در نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (T80UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد (۱۷).

جدول ۵: اجزای تشکیل‌دهنده تست TBARS

مواد	مقدار
EDTA اتیلن دی آمید تترا استیک اسید	۰/۰۳۷ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر آب
BHT بتا هیدروکسی تولوئن	۰/۲ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول
TCA تری کربوکسیلیک اسید	۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر آب
TBA تیو باربیتوریک اسید	۰/۱۳۴ گرم در ۲۰ میلی‌لیتر آب

روش‌آماری‌مورداستفاده‌در‌تجزیه‌و‌تحلیل‌داده‌ها: داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی و براساس مدل‌های آماری زیر به کمک رویه Proc GLM نرم‌افزار SAS مورد تجزیه‌و تحلیل قرار گرفتند:

$$y_{ijk} = \mu + a_i + e_{ij}$$

Y: خصوصیات کمی و کیفی اسپرم، μ: میانگین جامعه، αi: اثر سطوح مختلف رزماری، eij: اثر باقی‌مانده

مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون توکی انجام شد.

نتایج

تعیین اثرعصاره آبی رزماری بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که در میان پارامترهای حرکتی اسپرم جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده اثرات معنی‌داری را نشان دادند. به‌طوری‌که درصد جنبایی در سطح ۵ درصد و صفر درصد به ترتیب بالاترین و پائین‌ترین (۵۵/۱±۵/۱۵a,۳۴/۱±۲۸/۱۵d) میانگین را داشته که از نظر آماری این اختلاف معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۵). درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده در سطح ۵ و ۷/۵ به‌طور معنی‌داری از تمام سطوح دیگر و تیمار شاهد بالاتر بود (p<۰/۰۵). نتایج حاصل آنالیز کامپیوتری داده‌های مرتبط با تحرک (CASA) در جدول ۶ نشان داده شده است.

اثر عصاره رزماری بر یکپارچگی غشاء، زنده‌مانی و ناهنجاری‌های اسپرم: یکپارچگی غشای سلول‌های اسپرم با افزایش سطوح عصاره تا سطح ۷/۵ در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد اما سطح ۱۰ درصد اثر تخریبی برروی غشای اسپرم‌ها داشته و یکپارچگی غشا را در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش داده است (p<۰/۰۵). با مطالعه زنده‌مانی اسپرم‌ها مشخص شد که سطوح ۵ و ۷/۵ درصد باعث افزایش معنی‌دار در درصد اسپرم‌های زنده می‌شود، در طی این آزمایش هم‌چنین مشخص شد که سطح بالاتر از ۷/۵ سبب کاهش معنی‌دار درصد زنده‌مانی در مقایسه با گروه شاهد شد (p<۰/۰۵) درصد اسپرم‌های دارای ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در در سطح ۵ درصد به‌طور معنی‌داری در مقاسیه با گروه شاهد کم‌تر بود (p<۰/۰۵) (جدول ۷).

اثر عصاره رزماری بر میزان تولید مالون‌دی آلدئید (MDA) در سلول اسپرم: غلظت مالون‌دی‌آلدئید که بیانگر نرخ پراکسیداسیون لیپیدی است با افزایش سطوح عصاره رزماری در محیط رقیق‌کننده کاهش یافت که این کاهش در سطح ۵ درصد بیش‌ترین میزان را داشته و میزان این کاهش در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۱). نتایج مربوط به بررسی میزات تولید مالون‌دی‌آلدئید توسط اسپرم‌ها بعد از فرایند ذوب-یخ‌گشایی در جدول ۸ نشان داده شده است.

جدول ۶: میانگین حداقل مربعات ± خطای استاندارد فراسنجه‌های مختلف جنبایی در تیمارهای مختلف

فراسنجه	درصدهای مختلف عصاره رزماری افزوده شده در هر تیمار				
	۰	۲/۵	۵	۷/۵	۱۰
جنبایی کل	۳۴/۲۸±۱/۱۵^{d}	۴۲±۱/۲۵^{c}	۵۵/۵±۱/۱۵^{a}	۵۰/۷۵±۱/۱۵^{ab}	۳۹/۳۸±۱/۱۵^{bc}
جنبایی پیش‌رونده	۱۵/۵±۰/۷۵^{c}	۲۰/۷۸±۰/۸۲^{b}	۲۴/۳۸±۰/۷۵^{a}	۲۲/۵±۰/۷۵^{a}	۱۸/۷۵±۰/۷۵^{b}
سرعت در مسیر میانگین	۶۴/۳۴±۲/۴۹	۶۴/۹۳±۲/۷۱	۶۲/۸۶±۲/۴۹	۵۹/۹۵±۲/۴۹	۵۹/۳۸±۲/۴۹
سرعت در مسیر مستقیم	۴۹/۷۶±۲/۱۶	۵۱/۵۶±۲/۳۵	۴۸/۷۸±۲/۱۶	۴۵/۶۵±۲/۱۶	۴۶/۲۵±۲/۱۶
سرعت در مسیر منحنی	۱۰۲/۲۱±۴/۳۱	۹۹/۸۴±۴/۶۸	۹۶/۵۹±۴/۳۱	۹۵/۶۴±۴/۳۱	۹۱/۳۰±۴/۳۱
تحرک عرضی سر اسپرم	۶/۱۸±۰/۳۳	۶/۶۵±۰/۳۶	۵/۸۶±۰/۳۳	۵/۹۱±۰/۳۳	۶/۳۸±۰/۳۳
تناوب عرضی زنش	۲۲/۸۸±۰/۸۶	۲۵/۱۵±۰/۹۳	۲۲/۹۸±۰/۸۶	۲۲/۲۵±۰/۸۶	۲۳/۴۰±۰/۸۶
درصد خطی بودن حرکت اسپرم	۵۰/۲۲±۲/۴۱	۵۲/۷۶±۲/۶۲	۵۲/۴۰±۲/۴۱	۴۹/۹۴±۲/۴۱	۵۱/۸۱±۲/۴۱
درصد مستقیم الخط بودن حرکت اسپرم	۷۷/۶۵±۱/۸۰	۷۹/۸۵±۱/۹۵	۷۸/۰۷±۱/۸۰	۷۷/۱۳±۱/۸۰	۷۸/۲۷±۱/۸۰
نسبت سرعت در مسیر میانگین به سرعت در مسیر منحنی	۶۴/۳۲±۱/۶۲	۶۶/۰۴±۱/۷۶	۶۶/۷۸±۱/۶۲	۶۴/۳۱±۱/۶۲	۶۶/۱۳±۱/۶۲

$^{a, b, c}$ حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) در هر ردیف می‌باشد.

جدول ۷: میانگین حداقل مربعات ± خطای استاندارد یکپارچگی غشاء، زنده‌مانی و ناهنجاری‌های اسپرم در تیمارهای مختلف

فراسنجه	درصدهای مختلف عصاره رزماری افزوده شده در هر تیمار				
	۰	۲/۵	۵	۷/۵	۱۰
یکپارچگی غشاء	۳۶/۳۸±۰/۹۹^{a}	۴۲/۶۵±۱/۰۸^{b}	۴۷/۶۹±۰/۹۹^{d}	۴۱/۶۹±۰/۹۹^{b}	۳۴/۲۵±۰/۹۹^{d}
زنده‌مانی	۴۳/۵۶±۰/۸۹^{a}	۴۵/۴۵±۰/۹۷^{a}	۵۴/۶۶±۰/۸۹^{b}	۵۷/۴۱±۰/۸۹^{c}	۳۶/۵۹±۰/۸۹^{d}
ناهنجاری‌های اسپرم	۲۱/۳۴±۰/۷۴^{ab}	۱۹/۴۳±۰/۸۱^{b}	۱۵/۰۹±۰/۷۴^{c}	۱۷/۳۴±۰/۷۴^{d}	۲۱/۰۹±۰/۷۴^{a}

a، b، c، d حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) در هر ردیف می‌باشد.

جدول ۸: میانگین حداقل مربعات ± خطای استاندارد تولید MDA

فراسنجه	درصدهای مختلف عصاره رزماری افزوده شده در هر تیمار				
	۰	۲/۵	۵	۷/۵	۱۰
سطح مالون دی الدئید	۳/۵۴±۰/۰۶^{b}	۳/۱۱±۰/۰۶^{b}	۲/۴۳±۰/۰۶^{c}	۳/۰۱±۰/۰۶^{b}	۳/۹۵±۰/۰۶^{a}

a، b، c d حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۱) در هر ردیف می‌باشد.

بحث

در این مطالعه اثر عصاره آبی رزماری برای خنثی‌سازی اثرات مخرب انجماد بر اسپرم قوچ موردبررسی قرار گرفت. مطالعات فراوان در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفته است که نشان داد ترکیبات فنولیک می‌توانند به‌طور مستقیم رادیکال‌های آزاد را پاکسازی نموده و حتی اثرات بهتری از آنتی‌اکسیدانت‌های مصنوعی و ویتامین‌هایی مانند E, C داشته باشند (۱۸). اثرات آنتی‌اکسیدانتی این گیاهان به ویژه مربوط به این است که با انتقال گروه هیدروکسیل از ساختار خود به ترکیبات لیپیدی سبب حفاظت از آن‌ها از فرایند پراکسیداسیون لیپیدی می‌شوند (۱۹). بنابراین استفاده از محیط انجماد مناسب منی قوچ که بتواند از اسپرم‌ها در برابر آسیب‌های انجماد- ذوب محافظت کند و زنده‌مانی و تحرک اسپرم را بعد از انجماد-ذوب حفظ کند، گام مهمی در جهت استفاده از تلقیح مصنوعی در گوسفند است. بهبود فرایند انجماد منی قوچ با استفاده از رقیق‌کننده‌های حاوی آنتی اکسیدان‌ها در پژوهش‌های متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها در این تحقیق نشان داد که درصد پارامترهای حرکتی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، زنده‌مانی در رقیق کننده حاوی ۵ و ۷/۵ درصد عصاره آبی رزماری به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) بیش‌تر از گروه شاهد بود. هم‌چنین میزان تولید MDA در رقیق‌کننده حاوی ۵ درصد عصاره کم‌تر از گروه شاهد بود. Malo و همکاران، نشان دادند که استفاده از عصاره رزماری در رقیق‌کننده منی خوک موجب بهبود جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم شده و غلظت مالون‌دی‌آلدئید را به‌میزان زیادی کاهش می‌دهد (۱۰) که با نتایج آزمایش حاضر هم‌خوانی دارد. Daghigh Kia و همکاران، در بررسی سطوح مختلف عصاره الکلی مرزه بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده در گاو هلشتاین نشان دادند که سطح ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر از عصاره مرزه به‌طور معنی‌داری سبب بهبود پارامترهایی هم‌چون تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی در مقایسه با گروه شاهد شد (۱۴) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. Karimi و همکاران، در تحقیق خود نشان دادند که عصاره رازیانه با اثرات آنتی‌اکسیدانتی که دارد سبب کاهش اکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم در تیمارهای آزمایشی شد که در گروه با ۱۲ میلی‌لیتر کم‌ترین غلظت مالون‌دی‌آلدئید مشاهده شد. هم‌چنین در بررسی فراسنجه‌های زنده‌ماندنی، یکپارچگی غشایی و پارامترهای حرکتی حاکی از آن، نشان داده شد که در تیمار با ۶ میلی‌لیتر نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی افزایش معنی‌داری در این پارامترها مشاهده شد (۲۰) که با یافته‌های تحقیق اخیر هم‌خوانی دارد. Vahedi و همکاران، در مطالعه‌ای که به بررسی بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم منجمد با افزودن عصاره نعناع فلفلی در رقیق‌کننده بود، نشان دادند که افزودن در سطوح ۴ و ۸ میلی‌لیتر، درصد تحرک کلی اسپرم را افزایش داد. درصد زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم در گروه با ۴ میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. Herrara و همکاران، گزارش دادند که لقاح آزمایشگاهی، به‌طور قابل توجهی با حرکت پیش رونده اسپرم در ارتباط است، اما با VAP، LIN و BCF همبستگی ندارد. علاوه براین، VAP و VSL به‌طور معنی‌داری با تعداد اسپرمی که به تخمک نفوذ می‌کنند، مرتبط می‌باشند. هم‌چنین VSL، نشانه‌ای از تحرک رو به جلو و VAP، نشانه‌ای از ظرفیت‌دار شدن اسپرم هستند (۱۲). Robayo و همکاران، با بررسی ارتباط بین الگوهای جنبایی CASA و انتقال اسپرم در مخاط سرویکس میش پرداخته و آن‌ها گزارش دادند که VCL و VAP تنها پارامترهای حرکتی مرتبط با توانایی اسپرم برای انتقال در مخاط سرویکس میش هستند که همبستگی مثبتی دارند (۲۲). در این پژوهش از میان پارامترهای حرکتی ارزیابی شده اسپرم، جنبایی کل و پیش‌رونده و هم‌چنین یکپارچگی غشا در رقیق‌کننده حاوی ۵ درصد عصاره رزماری به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) بالاتر از سایر رقیق‌کننده‌ها بود. با توجه به این‌که جنبایی پیش‌رونده نقش مهمی در لقاح دارد، بنابراین پیش‌بینی می‌شود که استفاده از تیمار ۵ درصد عصاره رزماری باعث افزایش درصد آبستنی گردد. Malo و همکاران، اثر عصاره رزماری را برروی اسپرم خوک نر مورد بررسی قرار دادند، آن‌ها نشان دادند که جنبایی کل، میزان حرکت پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی بعد از یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد بهبود و میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و تولید ROS و MDA کاهش پیدا کرد (۱۰) که با نتایج یافته‌های اخیر مطابقت دارد. Zhao و همکاران، نیز در طی مطالعه‌ای اثر افزودن عصاره آبی گیاه *Rhodiola rosea* L. به محیط رقیق‌کننده اسپرم خوک را بررسی کردند و افزایش در جنبایی کل و یکپارچگی غشای پلاسمایی

و کاهش در ناهنجاری‌های مورفولوژیکی را در سطوح ۴ و ۶ میلی‌گرم درمیلی‌لیتر عصاره نسبت به گروه شاهد نشان دادند که تولید MDA نیز به‌طور معنی‌داری با افزایش سطوح عصاره نسبت به گروه شاهد کاهش پیدا کرد (۲۳). این نتایج نشان داد که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نقش مهمی را در جلوگیری از اکسیداسیون اسپرم و نیز حفظ جنبایی اسپرم در طی انجماد دارند. نتایج مطالعه Shafig و همکاران، روی منی خروس نشان داد که تیمار با اسانس الکلی رزماری به‌طور موثری جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی عملکرد غشاء را بعد از یخ‌گشایی در سطوح ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر بهبود می‌بخشد که این بهبود در جنبایی کل و پیش‌رونده ممکن است با یکپارچگی ساختاری و عملکردی غشاء، اشکال غیرطبیعی و زنده‌مانی اسپرم ارتباط داشته باشد (۱۶). با توجه به داده‌های حاصله، افزودن سطوح مشخص عصاره رزماری در رقیق‌کننده، اثر محافظتی در فرایند انجماد- یخ‌گشایی اسپرم قوچ زندی خواهد داشت. در این پژوهش، سطوح مختلف از اسانس رزماری استفاده شد تا بهترین سطح این عصاره مشخص شود. در نهایت مشخص شد که سطوح ۵ و ۷/۵ درصد عصاره رزماری نسبت به سایر سطوح از جنبایی و زنده‌مانی بیش‌تری پس از انجماد برخوردار بود، هم‌چنین این سطوح توانست با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی نقش محافظتی بیش‌تری را برای اسپرم‌ها ایفا کند.

منابع

1. **Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sarıozkan, S., Ulutas, P.A., Coyan, K., Baspınar, N. and Ozkalp, B., 2008.** Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. Research in Veterinary Science. 87(3): 468-472.
2. **Andreea, A.J. and Zamfirescucu, S., 2010.** Role of antioxidant additives in the protection of the cryopreserved semen against free radicals. Romanian Biotechnological Letters. 15(3): 33-41.
3. **Pena, F., Johannisson, A., Wallgren, M. and Rodriguez Martinez, H., 2003.** Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. Animal reproduction science. 78: 85-98.
4. **Sikka, S.C., 2004.** Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. J Androl. 25(1): 5-18.
5. **Krzyzosiak, J., Evenson, D., Pitt, C., Jost, L., Molan, P. and Vishwanath, R., 2001.** Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation during prolonged incubation at ambient temperature to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. Reproduction, Fertility and Development. 12(6): 251-261.
6. **Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S., 2011.** Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet Med Int. 1-7.
7. **Bucak, M.N., Sarıozkan, S., Tuncer, P.B., Ulutas, P.A. and H.I. Akcadag, H.I., 2009.** Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. Small Ruminant Research. 81: 90-95.
8. **Saddeghi, A., Ranjbar, E., Ghorbani, M. and Kashaninejad, M., 2014.** Antioxidant properties of individual vs . Combined extracts of Rosemary leaves and Oak fruit, J.Agr . Sci, Tech. 16: 1575-1585.
9. **Dragana, M., Stanisavljevic, S., Stojicevic, S., Dorcevic, M., Branislav, P., Zlatkovic, M., Dragan, T., Velickovic, I.T., Karabegovic, T. and Miodrag, L., 2012.** Antioxidant activity, the content of total phenols and flavonoids in the ethanol extracts of *mentha longifolia* (l.) Hudson dried by the use of different techniques. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly. 18(3): 411-420.
10. **Malo, C., Gil, L., Cano, R., Martínez, F. and Gale, I., 2011.** Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology. 75: 1735-1741.
11. **Nickavar, B., Alinaghi, A. and Kamalinejad, M., 2008.** Evaluation of the antioxidant properties of five Mentha species. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 7(3): 203-209.
12. **Herrara, C., Brogliatti, G., Cavia, R., Conde, P., Revora, M. and Pasqualini, R., 2005.** CASA sperm parameters and their relation with in vitro fertilization. Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction. 411.
13. **Huj, H., Li, Q.W., Zhang, T. and Jiang, Z., 2009.** Effect of *Gynostemma pentaphyllum* Polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing–thawing. Cryobiology. 59: 244-249.
14. **Daghigh-Kia, H., Olfati-Karaji, R., Hoseinkhani, A. and Ashrafi, I., 2014.** Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts and glutathione antioxidants on bull semen quality after cryopreservation. Spanish Journal of Agricultural Research. 12: 98-105.
15. **Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneh, A., Najafi, A., Mahdi Nabi, M. and Mohammadi-Sangcheshmeh, A., 2013.** Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Ruminant Research. 114: 120-125.
16. **Shafigh, H., Shakeri, M., Zeinoaldini, S., Kohram, H., Zhandi, M. and Moghbeli, M., 2016.** Improving sperm cryopreservation of rooster by using rosemary alcoholic essential oil. Animal Production. 18(3): 615-624. (In Persian)

17. **Najafi, A., Zandi, M., Towhidi, A., Sharafi, M., Akbarisharif, A., Khodaei Motlagh, M. and Marine, F., 2013.**Trehalose and glycerol have a dose- dependent synergistic effect on the post- thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. Cryobiology. 66: 275-282.
18. **Rice-Evans, C., Miller, N.J. and Peganga, G., 1997.** Antioxidant properties of phenolic Compounds. Trends in Plants Science. 2: 152-159.
19. **Osawa, T., 1994.** Novel natural antioxidants for utilization in food and biological system. In postharvest Biochemistry of plant Food- Materials in the Tropics. Japan Scientific Societies Press. Tokyo, Japan. 241-251.
20. **Karimi, A., Besharati, M. and Nemati, Z., 2018.** Protective effects of fennel (*Foeniculum vulgare*) extract on frozen-thowed sperm of Ghezel ram. Journal of Animal Environment. 10(4): 83-90. (In Persian)
21. **Vahedi, V. and Hedayat Evrigh, N., 2019.** Improvement in frozen-thawed ram sperm quality parameters by adding *Mentha piperita* L. extract in extender. Journal of Animal Environment. 11(1): 83-90. (In Persian)
22. **Robayo, I., Montenegro, V., Valdes, C. and Cox, J., 2008.** CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. Reproduction in Domestic Animals. 43: 393-399.
23. **Zhao, H.W., Li, Q.W., Ning, G.Z., Han, Z.S., Jiang, Z.I. and Duan, Y.F., 2009.** Rhodiola sacra aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen. Theriogenology. 71(5): 849-857.