نقش حفاظتی عصاره رازیانه بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ قزل

- **امیر کریمی***: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز
- **مقصود بشارتی**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز
- **ذبیح‌اله نعمتی**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: مهر ١٣٩٧ تاریخ پذیرش: دی ١٣٩٧

چکیده

با کمک انجماد منی می‌توان اسپرم را برای مدت طولانی ذخیره کرد، اما تغییرات به‌وجود آمده در طی انجماد منی می‌تواند باعث تنش اکسیداتیو شده و باعث کاهش قدرت باروری آن گردد. هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر عصاره آبی گیاه رازیانه بر پارامترهای کیفی اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی می‌باشد. برای این منظور از ٥ رأس قوچ قزل با سن ٤-٣ ساله هفته‌ای ٢بار برای مدت ٤هفته اسپرم‌گیری شد. نمونه‌های منی در هر بار پس از اطمینان از کیفیت لازم باهم مخلوط شدند. تیمارهای آزمایشی شامل ٧ سطح عصاره رازیانه (شامل ٠، ٢، ٤، ٦، ٨، ١٠ و ١٢ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر رقیق‌کننده) بودند که بر نمونه‌های منی رقیق شده افزوده شدند. نمونه‌ها برای مدت٣ هفته در ازت مایع انجماد و نگه‌داری شدند. پس از یخ‌گشایی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم، یک‌پارچگی غشای پلاسمایی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنالیزآماری نشان داد که عصاره رازیانه با اثرات آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش اکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم در تیمارهای آزمایشی شد که در این ارتباط در گروه ١٢میلی‌لیتر کم‌ترین غلظت مالون دی‌آلدهید مشاهده شد که نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌دار داشت ($P<0/05$). بررسی فراسنجه‌های زنده‌مانی، یک‌پارچگی غشایی و پارامترهای حرکتی حاکی از آن بود که تیمار ٦ میلی‌لیتر نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی به‌طور معنی‌داری باعث بهبودی شده است ($P<0/05$). به‌نظر می‌رسد که به‌طورکلی می‌توان از خاصیت آنتی‌اکسیدانی رازیانه جهت کاهش استرس اکسیداتیو پس از انجماد در اسپرم قوچ استفاده کرد و برای این منظور غلظت ٦ میلی‌لیتر عصاره در دسی‌لیتر رقیق‌کننده مناسب است.

کلمات کلیدی: استرس اکسیداتیو، انجماد اسپرم، قوچ

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

مقدمه

استفاده وسیع از تلقیح مصنوعی در صنعت دامپروری به‌طور قابل توجهی نرخ بهبود ژنتیکی و نیز بهبود تولید را درحیوانات در پی داشته‌است به‌طوری‌که باعث پیشرفت چشمگیر در پرورش و تولید در سراسر دنیا شده است (Batista و همکاران، ۲۰۰۹). یکی از اصلی‌ترین و کلیدی‌ترین فاکتور در تلقیح مصنوعی موفق دسترسی به اسپرم‌های بارور می‌باشدکه تنها از طریق فرآیندهای انجماد موفق به‌دست‌می‌آید (Watson، ۲۰۰۰). تنش‌های اسمزی، شیمیایی و مکانیکی در طی فرآیندهای انجماد-ذوب مهم‌ترین دلایلی است که تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی را در اسپرم به‌وجود می‌آورد که در نتیجه آن سلول اسپرم تحت تاثیر این فرآیند قرار گرفته و متعاقب آن مجموعه‌ای از اتفاقات آبشاری منجر به کاهش باروری اسپرم خواهد شد (Thomson و همکاران، ۲۰۰۹). رادیکال‌های آزاد را می‌توان اصلی‌ترین عامل تنش شیمیایی یا تنش اکسیداتیو در طی فرآیند انجماد-ذوب دانست. تاثیر منفی متابولیت‌های اکسیژن هم‌چون هیدروژن پراکسید نیز بر عملکرد و ساختار سلول‌ها مانند اسپرم به‌خوبی ثابت شده است و امروزه مجموعه مشتقات متابولیت‌های اکسیژن را یکی از اصلی‌ترین دلایل ناباروری در پستانداران و به‌خصوص جنس نر می‌دانند(Gharagozloo و Aitken، ۲۰۱۱).مجموعه این‌عوامل باعث استرس اکسیداتیو خواهند شد که نتیجه آن در فاز اول پراکسیداسیون چربی‌های غشاء است و سپس تخریب و عبور از غشای سلول و در نهایت دسترسی به اندامک‌های درون سلولی تاثیر بر فعالیت‌های آن، مهار فعالیت‌های آنزیمی و تغییر بر هم‌کنش‌های بیوشیمیایی در داخل سلول و نیز ایجاد شکستگی در دزوکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) سلول‌های اسپرم شده، که منجر به کاهش توان باروری اسپرم می‌شود(Çoyan و همکاران، ۲۰۱۰). این امر سبب می‌شود که محققین اقدام به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک در محیط‌های انجماد اسپرم به‌منظور حذف رادیکال‌های آزاد و خنثی‌سازی آنان در داخل و خارج سلول‌های اسپرم نمایند (Jensen و همکاران، ۲۰۱۱). امروزه به‌دلیل مشکلات ایمنی و هم‌چنین وجود ترکیبات سمی در برخی آنتی‌آکسیدان‌های سنتتیک و مسائل اقتصادی، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفته است (Malo و همکاران، ۲۰۱۱). به‌همین دلیل استفاده از ترکیبات طبیعی به‌جای افزودنی‌های صنعتی، رواج پیدا کرده است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان به‌طور عمده ناشی از وجود ترکیبات فنولیک، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و دی‌ترپن‌های فنولیک در آن‌ها می‌باشد (Velioglu و همکاران، ۱۹۹۸). رازیانه گیاهی است چندساله، علفی و معطر از خانواده چتریان که منشا آن نواحی مدیترانه و جنوب اروپا گزارش شده است و به‌دلیل کاربردهای متعدد آن در نواحی وسیعی ازدنیا،زمین‌های‌زراعی وسیعی زیر کشت آن قرار گرفته‌است و پراکنش طبیعی رازیانه در ایران نواحی شمال‌غرب ایران را در بر می‌گیرد (زنگنه و همکاران، ۱۳۹۵). بررسی عصاره استخراج شده از رازیانه به‌ویژه از برگ‌ها نشان می‌دهد که قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزادناشی از اکسیداسیون می‌باشد(Barros و همکاران، ۲۰۰۹). حضور ترکیبات فنولیک و اسیدهای چرب مانند اولئیک، لینولئیک و... می‌تواند در خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن سهیم باشد (Diao و همکاران، ۲۰۱۴). هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر عصاره آبی گیاه رازیانه بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ قزل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشی: در این تحقیق که در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه تبریز انجام پذیرفت، از پنج رأس قوچ نژاد قزل بالغ با سن ۴-۳ سال و میانگین وزنی ۷۰ کیلوگرم به‌صورت هفته‌ای دوبار و در فصل تولیدمثلی استفاده شد. جمع‌آوری منی قوچ‌های آموزش دیده به‌مدت ۴ هفته صورت گرفت. قوچ‌های مذکور در یک جایگاه نیمه مسقف با کف سیمانی تحت شرایط نور طبیعی قرار گرفته و با جیره در حد نگه‌داری تغذیه شدند. در طول تحقیق قوچ‌ها به‌صورت آزاد به آب دسترسی داشتند. بلافاصله پس از جمع‌آوری منی و انتقال آن به آزمایشگاه، بررسی‌های اولیه روی منی صورت گرفت.

جدول۱: جیره مورد استفاده برای حیوانات آزمایشی

ماده خوراکی	مقدار
یونجه خشک (گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۴۰۰
دانه ذرت (گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۲۷۰
دانه جو (گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۲۲۷
کنجاله سویا (گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۹۳
سنگ آهک (گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۱۰

جمع آوری و ارزیابی منی: نمونه‌های منی هفته‌ای دوبار به‌وسیله مهبل مصنوعی از قوچ‌های مورد آزمایش جمع‌آوری شدند. نمونه‌های منی مورد نیاز آزمایش با استفاده از واژن مصنوعی جمع‌آوری شد. از هر قوچ، دوبار در هفته به‌مدت دو هفته جمع‌آوری منی انجام گرفت.

برای ایجاد شرایط اصلی آزمایش، در چند مرحله تیمارها به‌صورت پیش‌آزمایش ارزیابی شدند. بلافاصله پس از جمع‌آوری منی، نمونه‌ها داخل بن‌ماری با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های منی گرفته شده در هر انزال که دارای رنگ کرمی و تحرک بیش‌تر از ۷۰ درصد بودند به‌عنوان منی نرمال در نظر گرفته شده و در غیر این‌صورت منی‌های جمع‌آوری شده حذف می‌شدند. به‌منظور حذف اثرات فردی دام و با در نظر گرفتن جمعیت اسپرم در مایع منی، نمونه‌های منی دام‌ها در مقدار مساوی باهم مخلوط شدند.

مواد و محیط‌های آزمایش: برای ساخت رقیق‌کننده اسپرم از یک محیط بر پایه سیترات حاوی ۷۳٪ بافر سیترات، ۲۰٪ زرده تخم مرغ و ۷٪ گلیسرول استفاده گردید. سپس سطوح مختلف عصاره رازیانه (۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰و۱۲ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر) به‌عنوان تیمارهای آزمایشی به منی رقیق شده افزوده شد. سپس، نمونه‌ها در داخل بشر حاوی آب ۲۵ درجه سانتی‌گراد به یخچال منتقل شده و برای رساندن دمای آن‌ها به ۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت در یخچال نگه‌داری شدند. بعد از سپری شدن زمان سردسازی و تعادل، نمونه‌ها در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری پر شده و سپس به‌مدت ۱۲ دقیقه در معرض بخار ازت مایع قرار داده شدند و بعد از انجماد برای نگه‌داری تا زمان ارزیابی به مخزن ازت منتقل گردیدند (Bucak و همکاران، ۲۰۰۷).

تهیه عصاره رازیانه: گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) مورد استفاده از استان آذربایجان‌شرقی جمع‌آوری شد. برای عصاره‌گیری از روش ماسراسیون استفاده شد (Handa و همکاران، ۲۰۰۸). به‌طور خلاصه ابتدا مقدار ۷۵ گرم از گیاه خرد شده را در ظرف حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد. عمل عصاره‌گیری ضمن گردش مکرر ظرف حاوی گیاه و حلال توسط دستگاه روتاری به‌مدت ۵ روز تمام در شرایط آزمایشگاه ادامه یافت و بعد از این زمان که میان غلظت مواد موجود در حلال و بافت گیاهی تعادل برقرار گردید، عمل عصاره‌گیری را خاتمه داده و سپس مخلوط حاصله از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شده و عصاره تهیه گردید (Arabshahi و Urooj، ۲۰۰۷).

ارزیابی آزمایشگاهی: در این پژوهش ۵ تکرار برای هر تیمار درنظر گرفته شد. در هر تکرار برای هر تیمار ۱۰ پایوت منجمد شد و جمعاً برای هر تیمار ۵۰ پایوت و برای کل آزمایش ۳۵۰ پایوت منجمد شد. برای یخ‌گشایی منی، پس از خارج‌کردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، به‌مدت ۱۰ ثانیه در دمای اتاق و مدت ۴۰ ثانیه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس نمونه اسپرم یخ‌گشایی شده به‌داخل میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری تخلیه شده و برای ارزیابی‌های مختلف کیفیت اسپرم در آزمایشگاه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، مورد استفاده قرار گرفت.

زنده‌مانی اسپرم‌ها (Sperm viability): برای ارزیابی زنده‌مانی اسپرم‌ها از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین، و برای بررسی یک‌پارچگی غشای اسپرم (Sperm Membrane Integrity) از محیط هاست (Hypo Osmotic Swelling Test=HOST)، استفاده شد. جهت تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، میزان مالون دی آلدهید (Malondialdehyde=MDA) اندازه‌گیری شد. هم‌چنین ویژگی‌های جنبایی اسپرم با استفاده از سیستم CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای ارزیابی زنده‌مانی اسپرم‌ها از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. این روش بر این اساس می‌باشد که اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را به‌خود جذب می‌کنند ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. رنگ نیگروزین به‌عنوان رنگ پس‌زمینه و ایجاد اختلاف رنگ میان اسپرم و رنگ زمینه برای دید بهتر استفاده می‌شود (Douglas و Kenneth، ۲۰۱۳). اسپرم‌هایی که رنگ به‌خود نگرفته بودند و یا تنها بخشی از گردن آن‌ها رنگ‌گرفته بود به‌عنوان اسپرم زنده درنظر گرفته شدند (Blom، ۱۹۵۰).

تست یک‌پارچگی غشای پلاسمایی: به‌منظور بررسی یک‌پارچگی غشای پلاسمایی از تست التهاب هایپواسموتیک استفاده شد. تست التهاب هایپواسموتیک براساس اسمولاریته محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریته پایین به سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. بدیهی است که تنها اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم قادر هستند به این نوع تغییر واکنش دهند و اسپرم‌های مرده که در این محیط قرار می‌گیرند هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند (Douglas و Kenneth، ۲۰۱۳).

بررسی فراسنجه‌های جنبایی اسپرم: جهت بررسی جنبایی اسپرم پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی از نرم‌افزار کامپیوتری CASA استفاده شد. بدین منظور چهار پایوت از هر گروه تیماری (هر پایوت یک تکرار) با روشی که در بالا توضیح داده شد یخ‌گشایی شده و به‌داخل میکروتیوب انتقال داده شدند. سپس با استفاده از سمپلر و برداشتن

۱۰ میکرولیتر از منی روی لام و گذاشتن یک لامل تمیز، نمونه بر روی لام پخش شد. لام مورد نظر به زیر میکروسکوپ معکوس فاز کنتراست منتقل‌شده و ویژگی‌های جنبایی اسپرم با استفاده از سیستم CASA ارزیابی شد. فراسنجه‌هایی که توسط این سیستم برآورد شدند شامل جنبایی کل (Total motility=TM)، جنبایی پیش‌رونده (PM= Progressive motility)، خطی بودن حرکت اسپرم (Linearity=LIN (lin=VSL/VCLx100)، سرعت در مسیر منحنی (Curvilinear =VCL velocity)، تحرک عرضی سر اسپرم (Amplitude of Lateral =ALH head displacement)، سرعت در مسیر میانگین (Average =VAP path velocity)، سرعت در مسیر مستقیم (Straight line =VSL velocity)و تناوب عرضی زنش (Beat cross frequency=BCF) بودند.

بررسی پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم: اندازه‌گیری غلظت MDA با استفاده از تیوباربیوتوریک اسید (TBA) انجام شد. ۱ مولکول MDA با ۲ مولکول TBA واکنش می‌دهد و فرآورده این واکنش، مولکول صورتی رنگ است که بیش‌ترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد. برای اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدئید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید، ابتدا پایوت‌ها در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه یخ گشایی شده و بلافاصله پس از افزودن یک میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۹ درصد، نمونه‌ها با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و به تعداد سه بار با بافر سیترات شستشو و مجدداً سانتریفیوژ گردیدند. در نهایت محلول رویی دور ریخته شده و رسوب باقی‌مانده اسپرم‌ها در یک میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شدند. برای اندازه‌گیری غلظت MDA مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه را برداشته و با یک میلی‌لیتر محلول اسید تری کلریدریک ۲۰٪ و تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد مخلوط کرده و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها در داخل یخ سرد شده و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در پایان عدد جذب مالون دی آلدئید محلول بالایی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شده و غلظت مالون دی آلدئید ثبت گردید (Draper و Hadley، ۱۹۹۰؛ Pinho و همکاران، ۲۰۰۶).

آنالیز آماری: این مطالعه با ۷ تیمار و هر تیمار شامل ۵ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. به‌دلیل ماهیت برخی داده‌های آزمایشی در صورت لزوم تبدیل عددی انجام شده و سپس به‌کمک نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱، تحت‌رویه GLM آنالیز آماری انجام شد. برای مقایسه میانگین تیمارها نیز از آزمون مقایسه دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

بررسی فراسنجه‌های تحرک اسپرم: نتایج حاصل از بررسی داده‌های آزمایشگاهی برای فراسنجه‌های حرکتی در جدول ۲ نشان داده شده است. بررسی نتایج حاصل از آن است که افزودن ۶ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره رازیانه باعث افزایش جنبایی کل در مقایسه با گروه شاهد تیمارهای ۲ و ۱۲ میلی‌لیتر عصاره در دسی‌لیتر رقیق کننده شد (P<۰/۰۵). هم‌چنین بررسی جنبایی پیش‌رونده نشان داد که گروه عصاره ۶ میلی‌لیتر دارای تحرک پیش‌رونده بیش‌تر نسبت به گروه‌های شاهد و ۱۲میلی‌لیتر عصاره در دسی‌لیتر رقیق‌کننده شد (P<۰/۰۵).فراسنجه سرعت در مسیر میانگین(VAP)در تیمار آزمایشی ۱۰ و ۱۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر رقیق‌کننده به‌طور مشخص از گروه شاهد پایین‌تر بود (P<۰/۰۵) اما سایر گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند (P>۰/۰۵). اما از لحاظ عددی بیش‌ترین سرعت در مسیر میانگین در تیمار ۶ مشاهده شد. به‌طور مشابه نیز گروه آزمایشی ۱۲ میلی‌لیتر عصاره در دسی‌لیتر رقیق‌کننده به‌طور معنی‌داری در فراسنجه سرعت در مسیر منحنی، نسبت به گروه شاهد پایین‌تر بود (P<۰/۰۵) و هم‌چنین تیمار ۶ میلی‌لیتر رقیق‌کننده اگرچه با شاهد تفاوت معنی‌داری در سرعت مسیرمنحنی نداشت اما نسبت به گروه‌های ۱۰و ۱۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر رقیق‌کننده سرعت تحرک بالاتری داشت (P<۰/۰۵). بیش‌ترین میزان سرعت در مسیر مستقیم در گروه ۶ میلی‌لیتر رقیق‌کننده نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی (به‌جز ۸ میلی‌لیتر عصاره در دسی‌لیتر رقیق‌کننده) مشاهده شد (P<۰/۰۵). دامنه تحرک عرضی و فرکانس (تناوب) سر اسپرم در گروه ۶ میلی‌لیتر عصاره در دسی‌لیتر رقیق‌کننده نسبت به گروه‌های ۱۰ و ۱۲ میلی‌لیتر به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر بود (P<۰/۰۵) اگرچه درعین حال با گروه شاهد و سایر گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). هم‌چنین بیش‌ترین میزان خطی بودن حرکت در گروه ۶ میلی‌لیتر عصاره مشاهده شد که با شاهد و سایر گروه‌های آزمایشی به‌جز ۸ میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از آنالیز اثرات سطوح مختلف عصاره رازیانه بر فراسنجه زنده‌مانی سلول‌های اسپرم در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که از مطالعه جدول مشخص است.بیش‌ترین درصد زنده‌مانی (شمار

سلول‌های اسپرم زنده)درگروه ۶میلی‌لیتر مشاهده شد که با تیمارهای شاهد، ۱۰ و ۱۲ میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)در حالی که سایر سطوح مورد بررسی نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول۲: مقایسه فراسنجه‌های تحرکی و کنتیکی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ قزل توسط توسط رقیق‌کننده حاوی سطوح مختلف عصاره رازیانه (میلی‌لیتر در دسی‌لیتر رقیق‌کننده)

فراسنجه	گروه‌های آزمایشی (سطوح مختلف عصاره رازیانه در رقیق کننده)							SEM	P-Value
	گروه شاهد	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲		
تحرک کل (درصد)	۴۷/۶۴^{bc}	۴۷/۶^{bc}	۵۰/۸۵^{a}	۴۹/۷۳^{ab}	۴۷/۸^{ab}	۴۸/۸۸^{ab}	۴۴/۶۵^{c}	۰/۶۹	۰/۰۰۸۱
تحرک پیش‌رونده (درصد)	۳۴/۵۱^{b}	۳۶/۹۸^{ab}	۳۲/۶۲^{ab}	۴۰/۰۵^{a}	۳۶/۹۶^{ab}	۳۵/۵۲^{ab}	۳۴/۹۹^{b}	۰/۸۷	۰/۰۴
سرعت در مسیر میانگین (میکرومتر در ثانیه)	۸۵/۸۹^{a}	۸۶/۶۸^{a}	۹۲/۲۶^{a}	۹۴/۳۳^{a}	۹۱/۸۳^{a}	۶۸/۹۹^{b}	۶۲/۵۸^{b}	۱/۴۴	۰<۰/۰۰۰۱
سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر در ثانیه)	۱۲۰/۲۹^{ab}	۱۲۴/۷^{ab}	۱۳۰/۱۸^{a}	۱۳۴/۶۶^{a}	۱۳۲/۱۵^{a}	۱۱۳/۵۲^{bc}	۱۴۰/۴۲^{c}	۱/۵۸	۰/۰۰۳۱
سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر در ثانیه)	۵۰/۶۳^{cd}	۵۴/۵۱^{bc}	۵۶/۱۷^{bc}	۶۵/۵۸^{a}	۶۰/۱۵^{ab}	۴۴/۹۵^{d}	۴۱/۶۴^{d}	۱/۲۲	۰/۰۰۰۲
تحرک عرضی سر اسپرم (میکرومتر)	۳/۶۹^{ab}	۳/۶۷^{ab}	۳/۷۸^{a}	۳/۹۵^{a}	۳/۷۲^{ab}	۳/۴۴^{bc}	۳/۳۲^{c}	۰/۲۲۶	۰/۰۰۶
تناوب عرضی زنش (هرتز)	۸/۴۴^{abc}	۸/۳۶^{abc}	۸/۶۱^{ab}	۸/۹۳^{a}	۸/۶۲^{ab}	۸/۰۶^{bc}	۷/۹۶^{c}	۰/۲۹۷	۰/۰۱۳
خطی بودن تحرک (درصد)	۳۴/۲۹^{bc}	۳۵/۸۶^{bc}	۳۵/۸^{bc}	۴۱/۰۲^{a}	۳۸/۰۳^{ab}	۳۲/۰۵^{c}	۳۱/۸۸^{c}	۰/۰۱۵	۰/۰۰۳

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

بررسی یک‌پارچگی غشای پلاسمایی: داده‌های حاصل از آنالیز اثرات سطوح مختلف عصاره رازیانه بر یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها در جدول ۳ نشان‌داده‌شده است. نتایج‌نشان داد که بیش‌ترین یک‌پارچگی غشای پلاسمایی در گروه ۴ میلی‌لیتر مشاهده شد که با گروه‌های ۱۰ و ۱۲ تفاوت معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵) اما با سایرین از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). به‌عبارتی دیگر به‌نظر می‌رسد افزودن ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر از عصاره رازیانه باعث بیش‌ترین محافظت غشایی پلاسمایی اسپرم‌ها از فرآیند پراکسیداسیون شده و از این‌رو سلامت غشایی اسپرم‌ها را بهبود داده است. بررسی غلظت مالون دی‌آلدهید به‌عنوان شاخصه‌ای از مقدار اکسیداسیون لیپیدهای غشایی نشان داد که بیش‌ترین اکسیداسیون در گروه شاهد دیده شد و هم‌زمان با افزایش غلظت عصاره استفاده شده در رقیق‌کننده، مشاهده شد که غلظت مالون دی‌آلدهید کاهش می‌یابد به گونه‌ای که کم‌ترین مقدار غلظت فراسنجه مالون دی‌آلدهید در گروه تیماری ۱۲ میلی‌لیتر عصاره در دسی‌لیتر رقیق‌کننده مشاهده شد (P<۰/۰۵). این نتایج نشان می‌دهد که افزودن عصاره رازیانه باعث کاهش معنی‌دار مالون دی‌آلدهید می‌شود که از عوامل مخرب غشای سلول اسپرم بوده و به حفظ سلامت غشا کمک شایان توجهی می‌کند (P<۰/۰۵).

جدول۳: مقایسه صفات زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و تولید مالون دی‌آلدهید در اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ قزل توسط رقیق کننده حاوی سطوح مختلف عصاره رازیانه (میلی‌لیتر در دسی‌لیتر رقیق‌کننده)

فراسنجه	گروه‌های آزمایشی (سطوح مختلف عصاره رازیانه در رقیق‌کننده)							SEM	P-Value
	گروه شاهد	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲		
زنده‌مانی (درصد)	۴۹/۰۲^{b}	۵۲/۶۴^{ab}	۵۶/۳۲^{ab}	۵۹/۰۲^{a}	۵۴/۳۷^{ab}	۵۷/۳^{ab}	۴۸/۶۵^{b}	۱/۲	۰/۰۴۸
یک‌پارچگی غشاء پلاسمایی (درصد)	۴۸/۵^{ab}	۴۷/۰۴^{ab}	۵۴/۲^{a}	۴۹/۵۵^{ab}	۴۵/۰۳^{ab}	۴۱/۹۲^{b}	۳۹/۵۴^{b}	۱/۲۵	۰/۰۳۷
غلظت مالون دی‌آلدهید (نانومول در دسی‌لیتر)	۱۱/۱۶^{a}	۱۰/۱^{ab}	۹/۱^{bc}	۸/۶۴^{bc}	۸/۵۵^{c}	۸/۰۴^{c}	۷/۶۲^{c}	۰/۴۹	۰/۰۰۰۶

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

بحث

در این مطالعه عصاره رازیانه برای خنثی‌سازی اثرات مخرب انجماد بر اسپرم قوچ مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاضر نشان دادند که تیمار اسپرم‌های انجمادی با عصاره رازیانه به‌طور مشخص می‌تواند فراسنجه‌های مختلف حرکتی مانند حرکت پیش‌رونده و جنبایی کل را بهبود بخشد و در این راستا غلظت ۶ میلی‌لیتر عصاره رازیانه در دسی‌لیتر رقیق‌کننده باعث بیش‌ترین حرکت پیش‌رونده و نیز جنبایی کل بعد از فرآیند ذوب گردید. این فراسنجه‌ها ممکن است با فراسنجه مهم و حیاطی یک‌پارچگی غشای اسپرم در ارتباط باشد زیرا مطالعات قبلی حاکی از آن بودند که اسپرم‌های دارای کیفیت غشایی بیش‌تر دارای تحرکت بیش‌تر و جنبایی کل بالاتر نیز می‌باشند (Malo و همکاران، ۲۰۱۱).هم‌چنین در مطالعه‌ای توسط Zanganeh و همکاران (۲۰۱۳) در مورد استفاده از عصاره رزماری در فرآیند انجماد- ذوب اسپرم بز نیز نشان داده‌شده است که اسپرم‌های با غشای سیتوپلاسمی یک‌پارچه دارای تحرک پیش‌رونده و کل بالاتر می‌باشند و نتایج آزمایش حاضر با نتایج مطالعات مذکور هم‌خوانی دارند.

در سالیان اخیر تلاش‌های زیادی برای بهبود فرآیند انجماد اسپرم‌ها شده است. در واقع انجماد اسپرم ابزاری اساسی و مهم برای تکنیک تلقیح مصنوعی و حفظ و انتقال منابع ژنتیکی در ابعاد جغرافیایی و سال‌های بعدی می‌باشد. در این بین بدون شک حفظ حرکت اسپرم در سطح بهینه و حداکثری مدنظر قرار می‌گیرد. در حالت عادی فرآیند انجماد باعث آسیب‌های شدید و برگشت ناپذیر به اندامک‌های درون سلولی اسپرم و تغییر در سیالیست غشاء و هم‌چنین فعالیت‌های آنزیمی می‌شود (Alvarez و Storey، ۱۹۹۲) و نهایتاً باعث کاهش فراسنجه‌های اسپرم مانند یک‌پارچگی غشای اسپرم، تحرک و در نهایت توانایی لقاح و باروری می‌شود (شهباززاده و همکاران، ۱۳۹۴). مهم‌ترین عامل در از بین بردن یک‌پارچگی غشای اسپرم، عوامل ROS موجود در محیط رقیق‌کننده اسپرم است که معمولاً پس‌از ذوب شدگی بعد از انجماد غلظت آن‌ها بالا بوده و می‌تواند با پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی باعث آسیب به غشای سلول‌های اسپرم و از بین بردن یک‌پارچگی غشای اسپرم گردد (Malo و همکاران، ۲۰۱۱).

رازیانه یکی از پرکاربردترین منابع گیاهی در صنایع غذایی و زمینه‌های وابسته می باشد (Choi و Hwang، ۲۰۰۴) که در صنایع دارویی و پزشکی نیز کاربرد فراوان دارد (Barros و همکاران، ۲۰۰۹). در مطالعه حاضر که نخستین مطالعه در مورد کاربرد عصاره گیاه رازیانه بر قابلیت انجمادپذیری اسپرم قوچ می‌باشد، نشان داده شده است که استفاده از آن باعث بهبود فراسنجه‌های حرکتی سپس از ذوب می‌شود.

رقیق‌کننده تریس و زرده تخم‌مرغ یک رقیق‌کننده تجاری پرکاربرد برای انجماد اسپرم‌های پستانداران به‌ویژه قوچ می‌باشد (Zanganeh و همکاران، ۲۰۱۳) هنگامی‌که مایع سیمن (منی) قوچ رقیق‌سازی می‌شود وجود آنتی‌اکسیدان‌ها اثرات منفی پراکسیداسیون لیپیدها را در اسپرم‌های در حال انجماد کاهش می‌دهد. رازیانه یک منبع قوی آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Ozkan و Chalchat، ۲۰۰۶) و این خاصیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با آلفاتوکوفرول و هیدروکسی تولوئن بوتیلات (به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های مرجع) مدنظر قرار می‌گیرد (Ruberto و همکاران، ۲۰۰۰).

ارتباط مثبتی بین خاصیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های گیاهان چتریان و فلاونوئیدها وجود دارد اما در رازیانه مقدار فلاونوئیدها نسبت به سایرین کم‌تر می‌باشد (Nickavar و Abolhasani، ۲۰۰۹). Baliga و همکاران(۲۰۰۳) توانایی رازیانه را با عصاره سایر گیاهان مورد بررسی قرار داده و تاثیرات آنتی‌اکسیدانی بالاتری را مشاهده کردند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی رازیانه به‌حضور آنتول(یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی قوی) نسبت داده می‌شود (De Martino و همکاران، ۲۰۰۹).

در مطالعه حاضر اضافه کردن عصاره رازیانه به محیط رقیق‌کننده اسپرم پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم را کاهش داد که نشانه آن کاهش تولید مالون دی‌آلدهید هم‌زمان با افزایش مصرف عصاره رازیانه در رقیق‌کننده مورد استفاده است. انتظار می‌رود اثر عصاره رازیانه بر کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم از طریق ۵- لیپواکسیژناز باشد (Miguel و همکاران، ۲۰۱۰).

نتایج مطالعه حاضر در تطابق با نتایج مطالعه Malo و همکاران (۲۰۱۱) می‌باشد مطالعه مذکور نیز اثرات مثبت آنتی‌اکسیدانی عصاره رازیانه را در رقیق‌سازی اسپرم خوک نشان داده است. البته خاطر نشان می‌گردد که مطالعات دیگر نیز تاثیرات آنتی‌اکسیدانی گیاهان دیگر نیز مورد بررسی قرار داده‌اند. در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۴ و ۶ میلی‌لیتر عصاره رازیانه در دسی‌لیتر رقیق‌کننده و گروه‌های با مصرف بیش‌تر عصاره مشاهده نشد و در عین حال نیز بیش‌ترین تاثیر مثبت در فراسنجه‌های جنبایی نیز در غلظت ۶ میلی‌لیتر عصاره مشاهده شد، استفاده از غلظت‌های بالاتر یا بی تاثیر بوده و یا درغلظت ۱۲میلی‌لیتر برخی فراسنجه‌های حرکتی شدیداً کاهش یافته است. در این رابطه Roca و همکاران (۲۰۰۴)

بیان داشته است که استفاده از غلظت‌های بالاتر عصاره می‌تواند اثرات منفی بر فعالیت‌های اسپرم داشته باشد. لذا مشخص کردن غلظت مناسب که بیش‌ترین تاثیرات مثبت را داشته و در عین حال تاثیر منفی ایجاد ننماید خیلی مهم و ضروری است (Malo و همکاران ۲۰۱۱). جنبایی اسپرم و فراسنجه‌های مربوطه شاخصه نهایی ارزیابی کیفیت اسپرم است و همان‌گونه که ذکر شد غلظت ۶ میلی‌گرم عصاره بهترین تاثیر را داشته است. درعین حال غلظت ۶ میلی‌گرم عصاره نیز بهترین پاسخ را در تست محیط هیپواسموتیک (HOST) باعث شده است. این نتایج با یافته‌های Malo و همکاران (۲۰۱۲) که از عصاره رازیانه در رقیق‌سازی اسپرم خوک استفاده شده بود، هم‌خوانی دارد. در مطالعات مذکور نیز استفاده از عصاره‌های گیاهی باعث افزایش یک‌پارچگی غشاء، بقا و تحرک سلول‌های اسپرم شده بود.

به‌طورکلی نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که استفاده از غلظت۶ میلی‌لیتر عصاره رازیانه در دسی‌لیتر رقیق‌کننده باعث افزایش خاصیت زنده‌مانی، کاهش پراکسیداسیون لیپید غشایی حفظ ساختار غشا و نهایتاً جنبایی اسپرم می‌شود.

منابع

۱. **شهباززاده، ر.؛ دقیق‌کیا، ح.؛ مقدم، غ.ع.؛ دهقان، غ.؛ حسینخانی، ع. و اشرفی، ا.، ۱۳۹۴.** تاثیر سطوح مختلف عصاره الکلی مرزه سهندی بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ گشایی شده گاو هلشتاین. پژوهش‌های علوم دامی. دوره ۲۵، شماره ۱، صفحات ۱۳ تا ۲۴.

۲. **فرهادی، ر.؛ دقیق‌کیا، ح.؛ حسینخانی، ع.؛ قاسمی‌پناهی، ب.؛ دهقان، غ. و اشرفی، ا.، ۱۳۹۴.** اثرعصاره اتانولی گیاه مرزنجوش بر فراسنجه‌های کیفی و غلظت مالون دی آلدهید اسپرم منجمد یخ گشایی شده گاو هلشتاین. پژوهش‌های علوم دامی. دوره ۲۵، شماره ۱، صفحات ۱ تا ۱۱.

۳. **فرهادی، ر.؛ دقیق‌کیا، ح. و اشرفی، ا.، ۱۳۹۴.** تأثیر عصاره اتانولی مریم‌گلی سهندی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی بر پارامترهای کیفی اسپرم منجمد-یخ گشایی شده گاو هلشتاین. پژوهش‌های تولیدات دامی. دوره ۶، شماره ۱۲، صفحات ۷۹ تا ۸۶.

۴. **زنگنه، ک.؛ فاخری، ب.؛ اروجی، ف.؛ افضلی‌فر، ا. و مخدومی، م.، ۱۳۹۵.** بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌هایی از گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) ایران با استفاده از نشانگر مولکولیISSR . مجله زیست‌فناوری گیاهان دارویی. دوره ۲، شماره ۴، صفحات ۱۰ تا ۱۹.

۵. **Alvarez, J.G. and Storey, B.T., 1992.** Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. Journal of Andrology. Vol. 13, pp: 232-241.

۶. **Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A., 2007.** Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry. Vol. 102, pp: 1233-1240.

۷. **Baliga, M.S.; Jagetia, G.C.; Rao, S.K. and Babu, K., 2003.** Evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain spices in vitro: a preliminary study. Nahrung. Vol. 47, pp: 261-264.

۸. **Barros, L.; Heleno, S.A.; Carvalho, A.M. and Ferreira, I.C., 2009.** Systematic evaluation of the antioxidant potential of different parts of *Foeniculum vulgare* mill. from portugal. Food Chemical Toxicology. Vol. 47, pp: 2458-2464.

۹. **Batista, M.; Niño, T.; Alamo, D.; Castro, N.; Santana, M.; González, F.; Cabrera, F. and Gracia, A., 2009.** Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. Theriogenology. Vol. 71, pp: 1307-1315.

۱۰. **Blom, E., 1950.** A one minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. Fertility and Sterility. Vol. 1, pp: 176-177.

۱۱. **Bucak, M.N.; Ateşşahin A.; Varişli, O.; Yüce, A.; Tekin, N. and Akçay, A., 2007.** The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Theriogenology. Vol. 67, pp: 1060-1067.

۱۲. **Choi, E.M. and Hwang, J.K., 2004.** Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare.* Fitoterapia. Vol. 75, pp: 557-565.

۱۳. **Çoyan, K.; Başpınar, N.; Bucak, M.N.; Akalın, P.P.; Ataman, M.B.; Omür, A.D.; Güngör, S.; Küçükgünay, S.; Ozkalp, B. and Sarıözkan, S., 2010.** Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. Research in Veterinary Science. Vol. 89, pp: 426-431.

۱۴. **De Martino, L.; De Feo, V.; Fratianni, F. and Nazzaro, F., 2009.** Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. Natural Product Communications. Vol. 4, pp: 1741-1750.

۱۵. **Diao, W.; Hu, Q.; Zhang, H. and Xu, J., 2014.** Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Food Control. Vol. 35, No. 1, pp: 109-116.

۱۶. **Douglas, T.C. and Kenneth, I.A., 2013.** Spermatogenesis, Methods and Protocols. Springer Science. pp: 14-15.

۱۷. **Draper, H.H. and Hadley, M., 1990.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods in Enzymology. Vol. 186, pp: 421-431.

۱۸. **Gharagozloo, P. and Aitken, R.J., 2011.** The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. Human Reproduction. Vol. 26, pp: 1628-1640.

۱۹. **Handa, S.S.; Khanuja, S.P.S.; Longo, G. and Rakesh, D.D., 2008.** Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology. 22 p.

۲۰. **Jensen, T.; Skakkebæk, N.; Jørgensen, N.; Jensen, M. and Juul. A., 2011.** Antioxidants and male subfertility-a survey of a Cochrane review. Ugeskrift for laeger. Vol. 173, 3253 p.

۲۱. **Malo, C.; Gil, L.; Gonzalez, N.; Martínez, F.; Cano, R.; de Blas, I. and Espinosa E., 2010.** Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Cryobiology. Vol. 61, pp: 142-147.

۲۲. **Malo, C.; Gil, L.; Cano, R.; Gonza´lez, N. and Lun˜o, V., 2011**. Fennel (*Foeniculum vulgare*) provides antioxidant protection for boar semen cryopreservation. Andrologia. Vol. 44, pp: 710-715.

۲۳. **Miguel, M.G.; Cruz, C.; Faleiro, L.; Simoes, M.T.; Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G. and Pedro, L.G., 2010.** *Foeniculum vulgare* essential oils: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. Natural Product Communications. Vol. 5, pp: 319-328.

۲۴. **Nickavar, B. and Abolhasani, F.A., 2009.** Screening of antioxidant properties of seven umbelliferae fruits from iran. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 22, pp: 30-35.

۲۵. **Ozkan, M.M. and Chalchat, J.C., 2006.** Effect of collection time on chemical composition of the essential oil of *Foeniculum vulgare* subsp. Piperitum growing wild in Turkey. European Food Research and Technology**.** pp: 224-279.

۲۶. **Pinho, R.A.; Andrades, M.E.; Oliveira, M.R.; Pirolo, A.C.; Zago, M.S.; Silveira, P.C.L.; Dal-Pizzol, F. and Moreira, J.C.F., 2006.** Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. Cell Biology International. Vol. 30, pp: 848-853.

۲۷. **Roca, J.; Gil M.A.; Hernandez, M.; Parrilla, I.; Vazquez, J.M. and Martinez, E.A., 2004.** Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. Journal of Andrology. Vol. 25, pp: 397-405.

۲۸. **Ruberto, G.; Baratta, M.T.; Deans, S.G. and Dorman, H.J., 2000.** Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and Crithmum maritimum essential oils. Planta Medica. Vol. 66, pp: 687-693.

۲۹. **Thomson, L.; Fleming, S.D.; Aitken. R.J.; De Iuliis, G.N.; Zieschang, J.A. and Clark, A.M., 2009.** Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Human Reproduction. Vol. 24, pp: 2061-2070.

۳۰. **Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L. and Oomah, B.D., 1998.** Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 46, pp: 4113-4117.

۳۱. **Watson, P., 2000.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science. Vol. 60, pp: 481-492.

۳۲. **Zanghaneh, Z.; Zhandi, M.; Zareh Shahneh, A.; Najafi, A.; Nabi, M.M. and Mohammadi-Sangcheshmeh, A., 2013.** Does Rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Ruminant Research. Vol. 114, No. 1, pp: 120-125.