تولیدات دامی
دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵
صفحه‌های ۸۴۰-۸۳۱

تأثیر عصاره زغال اخته در رقیق‌کننده منی بر کیفیت منی قوچ بعد از فرآیند انجماد - یخ‌گشایی

حسین دقیق‌کیا[1*]، فاطمه زارع قلعه جیق[2]، ابوذر نجفی[3]، حسین واثقی[3]

۱. استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز - ایران
۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز - ایران
۳. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز - ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۴/۰۳/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۸/۱۴

چکیده

تأثیر سطوح مختلف عصاره اتانولی گیاه زغال اخته در بهبود کیفیت منی قوچ طی فرآیند انجماد - یخ‌گشایی بررسی شد. در این مطالعه از ۵ قوچ، ۲ بار در هفته به کمک واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شد. به‌منظور از بین بردن اثرات فردی، نمونه‌های منی گرفته شده با هم مخلوط شدند. سطوح مختلف عصاره زغال اخته (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر) به رقیق‌کننده بر پایه تریس افزوده شد. نمونه های منی پس از سردسازی و انجماد تا زمان ارزیابی در داخل ازت مایع نگهداری شدند. بعد از یخ‌گشایی، پارامترهای تحرک توسط سیستم آنالیز اتوماتیک اسپرم (CASA)، زنده‌مانی با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین - نیگروزین، یکپارچگی غشاء با استفاده از محلول هیپواسموتیک، سنجش اسپرم‌های غیرنرمال توسط محلول هانکوک و پراکسیداسیون لیپیدها با اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که افزودن ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره زغال اخته سبب بهبود معنی‌دار پارامترهای اسپرم نسبت به گروه شاهد بعد از فرایند انجماد – یخ‌گشایی شد ($P<0/05$). باتوجه به نتایج تحقیق حاضر، می‌توان از عصاره زغال - اخته به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی، با کارایی بالا، ارزان و در دسترس در رقیق‌کننده‌های اسپرم قوچ استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: *ارزیابی اسپرم، رادیکال‌های آزاد، فرآوری منی، گوسفند قزل*

* نویسنده مسئول Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

مقدمه

به منظور حفظ دام‌های بومی و جلوگیری از انقراض ذخایر ژنتیکی ارزشمند آنها، ضروری است بخشی از تحقیقات در زمینه به‌کارگیری روش‌های مطلوب حفظ و انتقال این ژن-ها به نسل‌های آینده اختصاص یابد. انجماد اسپرم فناوری مهمی جهت حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی می‌باشد. اسپرم‌های منجمد شده به منظور تلقیح مصنوعی، بایستی از کیفیت لازم برخوردار باشند. بنابراین، فرآیند انجماد اسپرم فناوری دقیق و ماهرانه‌ای است که طی چند دهه اخیر به منظور بهبود آن فعالیت‌های عمده‌ای صورت گرفته است، با این حال، مقدار بازیافت اسپرم پس از انجماد کافی نبوده و بایستی بهبود یابد [22]. انجماد اسپرم با مشکلاتی از قبیل کاهش زنده‌مانی و تحرک اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی مواجه است. انجماد منی در واقع متوقف نمودن فعالیت‌های متابولیکی اسپرم طی انجماد است، به‌طوری‌که تحرک اسپرم تا زمان یخ‌گشایی و تلقیح به تعویق بیفتد [10]. ایجاد تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و پاکسازی آنها توسط آنتی‌اکسیدان‌ها، عامل مهمی در بقای سلول اسپرم و عملکرد آنها پیش و پس از حفاظت انجمادی است [۳]. ترکیب غشای اسپرم تعیین‌کننده مقدار پراکسیداسیون و شوک سرمایی وارده به اسپرم می‌باشد. رادیکال‌های آزاد تولید شده باعث اکسیداسیون لیپید غشای سلول شده که این امر منجر به ناپایداری غشا و متلاشی - شدن سلول می‌شود. تفاوت در ترکیب اسیدهای چرب و نسبت چربی اسپرم‌ها در بین گونه‌ها عامل مهم در قابلیت انجماد اسپرم می‌باشد. وجود غلظت‌های بالای اسیدهای چرب بلند زنجیر در ساختار لیپید سلول اسپرم نیازمند سیستم آنتی‌اکسیدانی مؤثر برای حفاظت اسپرم در مقابل آسیب پراکسیداسیون است [19]. در چند سال اخیر، تحقیقات در رابطه با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌ویژه از منشاء گیاهی افزایش یافته است. بعضی گیاهان دارویی به‌صورت وسیعی برای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه قرار گرفته است.

زغال اخته (*Cornus mas*) از مهم‌ترین منابع گیاهی دارای آنتی‌اکسیدان‌های فنولی و فلاونوئیدها می‌باشد. زغال اخته دارای مقادیر بالایی از اسید گالیک، پلی‌فنول‌هایی نظیر کوئینیک‌اسید و فلاونوییدهایی نظیر آنتوسیانین می‌باشد که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی به شمار می‌آیند. همچنین گیاه زغال اخته دارای مقادیر بالایی از ویتامین‌های E و C می‌باشد [13].

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی استفاده از سطوح مختلف عصاره زغال اخته برای بهبود کیفیت و عملکرد اسپرم قوچ طی فرآیند انجماد/ یخ‌گشایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

گیاه زغال اخته را در مدت ۱۰ روز در سایه خشک وسپس آسیاب شد. ۵۰ گرم پودر گیاه با ۳۵۰ میلی‌لیتر اتانول داخل بشر ۱ لیتری خیسانده شد. برای نفوذ بهتر الکل در پودر گیاه، محتویات بشر توسط همزن برقی به‌هم زده شد. بعد از گذشت ۶ ساعت مخلوط گیاه و الکل توسط صافی نمره یک صاف و محلول صاف شده در یک بشر دیگر جمع‌آوری شد. تفاله باقیمانده دوباره با ۳۵۰ میلی‌لیتر الکل اتانول خیسانده و روش قبلی عمل‌آوری تکرار شد. بعد از سه مرتبه تکرار، محلول جمع‌آوری شده، به‌وسیله دستگاه تقطیر در خلاء با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده و الکل آن به مرور تبخیر شد. بعد از جداسازی کامل الکل، عصاره غلیظ که حالت قیری داشت، در ته بشر باقی ماند. درنهایت عصاره تا زمان استفاده در دمای ۴ سانتی‌گراد نگهداری شد.

در تحقیق حاضر، از ۵ قوچ قزل (۲/۵ سال) ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز جهت استحصال منی

استفاده شد. جمع‌آوری منی هفته‌ای ۲ بار و با استفاده از واژن مصنوعی و در فصل تولیدمثلی صورت گرفت. برای از بین بردن اثرات فردی دام‌های نر مقادیر مساوی از نمونه‌های منی از هر ۵ رأس قوچ در هر تکرار آزمایشی با هم مخلوط شده و سپس مورد استفاده قرار گرفتند. منی با غلظت بیش از ۳×۱۰^{۹} اسپرم در میلی‌لیتر، جنبایی بیش از ۷۰ درصد و اسپرم‌های با ریخت غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد در هر انزال به عنوان منی طبیعی درنظر گرفته شدند.

برای ساخت رقیق‌کننده‌ها از یک محیط بر پایه بافر تریس استفاده شد (تریس ۲۷/۱ گرم/لیتر، اسیدسیتریک ۱۴ گرم/لیتر، گلوکز ۱۰گرم/لیتر). از گلیسرول و زرده تخم‌مرغ به عنوان عوامل محافظ انجمادی استفاده شد. اسمولاریته محیط پایه در ۳۲۵ میلی‌اسمول/کیلوگرم و اسیدیته آن در ۷/۲ تنظیم شد. پیش از شروع کار، محیط‌های انجمادی در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد سپس زرده تخم‌مرغ به نسبت ۲۰ و گلیسرول به نسبت ۷ درصد به محیط پایه تریس اضافه شد. تیمارهای آزمایشی شامل ۴ سطح عصاره گیاه زغال اخته (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر) به ۵ میلی‌لیتر از محیط‌های انجمادی آماده اضافه شد. رقیق‌سازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس، لوله منی را در ظرف محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس به مدت ۱۲۰ دقیقه در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. بلافاصله بعد از سردسازی نمونه‌ها به‌داخل پایوت‌های انجمادی ۰/۲۵ میلی‌لیتر کشیده شده و به فاصله ۵ سانتی‌متری بالای سطح ازت قرار گرفتند. پس از گذشت ۱۲ دقیقه، پایوت‌های منی با سرعت در داخل ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) غوطه‌ور شدند.

به‌منظور یخ‌گشایی منی، پس از خارج کردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، آنها به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آبگرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. اولین فراسنجه ارزیابی در این تحقیق، بررسی جنبایی اسپرم پس از فرایند انجماد - یخ‌گشایی بود. بدین‌منظور، ۲ پایوت از هر گروه تیماری یخ‌گشایی شده و به داخل لوله‌های میکروتیوب انتقال داده شدند. سپس، با برداشتن ۱۰ میکرولیتر از منی و گذاردن آن روی لام، پارامترهای تحرک‌کلی، تحرک پیش‌رونده و پارامترهای کینتیکی اسپرم با استفاده از سیستم کامپیوتری ارزیابی اسپرم (CASA,Video TesT Sperm 3.1 Russia) ارزیابی شدند.

برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از محلول هیپواسموتیک (فروکتوز ۹ گرم/لیتر، سیترات سدیم ۴/۹ گرم/لیتر و اسمولاریته ۱۰۰ میلی‌اسمول/کیلوگرم) استفاده شد. بعد از یخ‌گشایی، محتویات پایوت به داخل میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری تخلیه شده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس، قسمت بالای میکروتیوب که حاوی رقیق‌کننده بود، جداسازی شد. بعد از آن ۱۰ میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هیپواسموتیک اضافه شد و ۳۰ دقیقه در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت، وضعیت اسپرم‌ها با تهیه حداقل ۳ قطره (۱۰ میکرولیتر) از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست، بررسی شدند. در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شده و درصد اسپرم‌های با دم گره خورده (دارای غشای یکپارچه) نسبت به گره نخورده (دارای غشای آسیب دیده) و غیریکپارچه محاسبه شدند.

برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول هانکوک افزوده شد. سپس، یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شد. با شمارش

حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست اسپرم‌های غیرطبیعی محاسبه شدند.

برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده از محلول رنگ‌آمیزی ائوزین - نیگروزین استفاده شد. با توجه به سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها، درصد سلول‌های زنده و مرده در میدان دید میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰ شمارش شدند. برای رنگ‌آمیزی، ۲۰ میکرولیتر از اسپرم رقیق شده با ۱۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین - نیگروزین سریعاً روی لام مخلوط گردید و گسترشی از آن تهیه شد. سپس در مجاورت هوا خشک شدند. در این تکنیک رنگ ائوزین در اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند، درحالی‌که اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. سلول‌هایی که رنگ بنفش گرفته‌اند، به عنوان مرده و اسپرم‌هایی که به رنگ صورتی کم‌رنگ یا سفید دیده شوند به عنوان زنده در نظر گرفته شدند.

غلظت مالون‌دی‌آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها با استفاده از واکنش تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد. ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه منی با ۱ میلی‌لیتر اتیلن‌دی‌آمین تترااستیک اسید، ۱ میلی‌لیتر بوتیلیدهیدروکسی تولوئن و ۲ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید با هم مخلوط و به داخل لوله‌های مخروطی ریخته شدند. لوله‌های مخروطی در ۱۲۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، ۱ میلی‌لیتر از محلول بالای لوله مخروطی با ۱ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید در میکروتیوب مخلوط گردید. لوله مخروطی به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۹۵ سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند و سپس جذب نوری آنها در طول موج ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت مالون دی‌آلدئید (نانومول در میلی‌لیتر منی) با توجه به منحنی استاندارد محاسبه شد [8].

داده‌های حاصل از این مطالعه به صورت جداگانه با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS رویه GLM برای مدل ۱ تجزیه و میانگین‌ها به کمک آزمون توکی مقایسه شدند.

رابطه (۱)
$$T_i + e_{ij} + \mu = Y_{ij}$$

در این رابطه، Y_{ij} مشاهده ij ام، μ میانگین جمعیت، T_i اثر تیمار و e_{ij} اثر خطای آزمایشی هستند.

نتایج

بین گروه شاهد و تیمار دارای ۱۰۰ میکرولیتر عصاره تفاوت معنی‌داری از نظر زنده‌مانی اسپرم وجود نداشت، درحالی‌که تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها را به‌طور معنی‌داری بهبود بخشید (P<۰/۰۵) (جدول ۱). بیشترین درصد یکپارچگی غشای اسپرم‌ها در تیمار ۱۵۰ میکرولیتر عصاره به‌دست آمد که از سایر تیمارها بیشتر بود (P<۰/۰۵) (جدول ۱). تفاوتی بین تیمار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره و تیمار شاهد مشاهده نشد. تیمار ۲۰۰ میکرولیتر عصاره نسبت به تیمار ۱۵۰ میکرولیتر عصاره دارای درصد یکپارچگی غشای کمتر ولی در مقایسه با دو تیمار دیگر یکپارچگی غشای بیشتری بود (P<۰/۰۵).

کمترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در تیمار ۱۵۰ میکرولیتر عصاره به‌دست آمد (جدول ۱). تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر نسبت به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره و شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند و کمترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را نشان دادند (P<۰/۰۵). تفاوتی بین تیمار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره و تیمار شاهد مشاهده نشد. کمترین مقدار مالون‌دی آلدئید در تیمار ۲۰۰ میکرولیتر عصاره به‌دست آمد که تفاوت آن با گروه شاهد معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). مقدار مالون‌دی آلدئید در تیمارهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرولیتر عصاره با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت.

جدول ۱. مقایسه صفات زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، غیرطبیعی بودن ساختار اسپرم و تولید مالون‌دی آلدئید اسپرم منجمد شده قوچ در بین سطوح مختلف عصاره زغال اخته

صفات	شاهد	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	SEM
زنده‌مانی (٪)	۵۰/۳۵^{c}	۵۱/۰۹^{c}	۶۳/۱۱^{a}	۵۶/۶۴^{b}	۱/۲۱
یکپارچگی غشای پلاسمایی (٪)	۴۰/۳۲^{c}	۴۲/۸۶^{c}	۵۴/۸۲^{a}	۴۸/۴۳^{b}	۱/۹۰
اسپرم غیرطبیعی (٪)	۱۷/۹۹^{c}	۱۷/۱۴^{c}	۱۳/۵۴^{a}	۱۵/۳۴^{b}	۰/۴۰
غلظت مالون‌دی آلدئید (nmol/ml)	۲۲/۰۶^{ab}	۲۲/۹۶^{a}	۲۱/۴۴^{bc}	۱۹/۷۹^{c}	۰/۵۰

a-c: تفاوت میانگین‌ها با حروف غیرمشابه در یک ردیف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

اثرات سطوح مختلف عصاره گیاه زغال اخته بر پارامترهای تحرک در جدول ۲ آورده شده است. بیشترین درصد تحرک کل اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی متعلق به رقیق‌کننده حاوی ۱۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر عصاره زغال اخته است. تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره به‌طور معنی‌داری درصد تحرک کل اسپرم‌ها را افزایش دادند. بین تیمار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره و تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری از نظر تحرک کل مشاهده نشد. تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و تیمار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره افزایش داد. بین دو تیمار ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره از نظر تحرک کل و تحرک پیش‌رونده تفاوت معنی‌داری وجود دارد و تیمار ۱۵۰ میکرولیتر عصاره بالاترین تحرک اسپرم‌ها را ایجاد کرد (P<۰/۰۵).

نتایج نشان داد که هیچ‌یک از سطوح زغال اخته تأثیر مثبتی در خطی بودن حرکت نداشتند. تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره باعث کاهش معنی‌دار تحرک عرضی سر نسبت به گروه شاهد شده است (P<۰/۰۵). بین تیمار ۱۵۰ میکرولیتر عصاره و شاهد تفاوت معنی‌داری از نظر این پارامتر مشاهده نشد. افزودن ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره به‌طور معنی‌داری باعث افزایش راستی مسیر طی شده نسبت به گروه شاهد شد. تیمار ۲۰۰ میکرولیتر عصاره تأثیری در این پارامتر نداشت. افزودن ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره باعث کاهش معنی‌داری تناوب عرضی زنش نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره گیاه زغال‌اخته سرعت حرکت اسپرم‌ها را در مسیر مستقیم به‌طور معنی‌داری کاهش داد (P<۰/۰۵) و تیمار ۱۵۰ میکرولیتر عصاره نیز تفاوتی از این نظر نسبت به گروه شاهد نداشت. افزودن ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره زغال اخته به رقیق‌کننده باعث افزایش معنی‌داری در سرعت حرکت اسپرم‌ها در مسیر منحنی شد (P<۰/۰۵). افزودن ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره زغال اخته به رقیق‌کننده باعث افزایش معنی‌داری در تحرک کل و پیش رونده اسپرم‌ها شد (P<۰/۰۵).

جدول ۲ . مقایسه میانگین پارامترهای جنبایی اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد - یخ‌گشایی در سطوح مختلف عصاره زغال اخته

سطوح	TM (%)	PM (%)	VAP (µm/sec)	VSL (µm/sec)	VCL (µm/sec)	STR (%)	ALH (µm)	LIN (%)	BCF (Hz)
شاهد (صفر)	۴۴/۶c	۲۷c	۳۰/۴۸a	۲۴/۹۴a	۴۰/۳۲c	۶۰/۵۵c	۲/۰۸a	۲۶/۲ba	۱۶/۸۶a
۱۰۰	۴۶/۸c	۲۸c	۲۰/۸۶cb	۱۷/۳۱b	۵۰/۹۰b	۷۰/۳۳ba	۱/۵۵b	۲۶/۸a	۱۷/۶۱a
۱۵۰	۵۹/۲a	۳۵/۶a	۲۴/۰۶b	۲۰/۸۹ba	۷۲/۳۷a	۷۷/۶۷a	۱/۸ba	۲۳/۶ba	۱۶/۵۶a
۲۰۰	۵۲/۴b	۳۱/۴b	۱۸/۷c	۱۳/۰۲b	۴۴/۱۲c	۶۲/۲bc	۱/۳۸b	۲۲b	۱۸/۷۵a
SEM	۱/۲۳	۰/۷۸	۱/۴۱	۱/۵۱	۲/۶۱	۳/۰۱	۰/۱۵	۱/۴۶	۰/۶۸

TM: تحرک کل، PM: تحرک پیشرونده، VAP: سرعت در مسیر میانگین، VSL: سرعت در مسیر مستقیم، VCL: سرعت در مسیر منحنی، STR: مسیر صاف، ALH: جنبایی عرضی سر، LIN: خطی بودن جنبایی و BCF: فرکانس ضربات عرضی

a-c: تفاوت میانگین‌ها با حروف غیرمشابه در یک ردیف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

بحث

عصاره بسیاری از گیاهان از جمله زغال اخته، مرزنجوش، رزماری، آویشن، مریم‌گلی و مرزه حاوی ترکیبات بیواکتیو از جمله فنول‌ها و فلاونوییدها است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی مؤثری داشته و از آسیب وارده حاصل از رادیکال‌های آزاد ممانعت می‌کنند [21]. یکی از خصوصیات مهم فلاونوییدها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها است که می‌تواند با تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل در مولکول مرتبط باشد [5]. نتایج حاصل از بررسی تأثیر گیاه مرزنجوش بر کیفیت منی گاو نشان داد که افزودن عصاره این گیاه به رقیق‌کننده موجب بهبود پارامترهای تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم بعد از فرآیند انجماد - یخ‌گشایی شده و تولید مالوندی آلدئید را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش می‌دهد [۲]. گیاه زغال اخته دارای مقادیر بالایی از ترکیبات فنولی از جمله اسید گالیگ، پلی‌فنل‌هایی نظیر کوئینیک اسید و فلاونوییدهایی نظیر آنتوسیانین می‌باشد که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی به شمار می‌آیند. همچنین این گیاه دارای مقادیر بالایی از ویتامین‌های E و C می‌باشد [20]، از این‌رو این گیاه می‌تواند نظیر مرزنجوش موجب بهبود ویژگی‌های اسپرم بعد از یخ‌گشایی شود.

نتایج تحقیقات حاضر، اثرات مثبت عصاره رزماری را در رقیق‌کننده انجماد منی چندین گونه از جمله خوک [16]؛ سگ [12]؛ گوسفند [11] و بز [24] نشان داده است. استفاده از عصاره رزماری در رقیق‌کننده منی، موجب بهبود جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی آکروزوم شده و کاهش سطح مالوندی آلدئید شد بهبود تحرک کل و پیش‌رونده‌ی اسپرم‌ها با استفاده از عصاره رزماری می‌تواند به یکپارچگی غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم‌ها بعد از یخ‌گشایی مربوط باشد [14، 15 17، 23]. عصاره آبی رزماری باعث بهبود جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و کاهش میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در اسپرم بز می‌گردد [24]. اثرات مثبت و منفی عصاره رزماری بر روی تحرک کل و پیش‌رونده می‌تواند به آسیب‌های میتوکندریایی مربوط نباشد، زیرا فعالیت میتوکندریایی با غلظت‌های مختلف رزماری تغییر نمی‌کند. بنابراین، نتایج بیانگر آن است که تحرک اسپرم نسبتاً مستقل از فعالیت میتوکندیایی باشد،

همان‌طورکه محققین دیگر نیز به این امر اشاره دارند [6، 18]. اولین بررسی در رابطه با تأثیر عصاره مرزه سهندی بر پارامترهای اسپرم یخ‌گشایی شده گاو صورت گرفت. این گیاه با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس‌های اکسیداتیو باعث افزایش کیفیت اسپرم‌ها شده بود. استفاده از عصاره مرزه طی انجماد می‌تواند به‌طور مؤثری اسپرم را از آسیب سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت کرده و به‌طور قابل توجهی تحرک کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء را بهبود بخشد. بخشی از تأثیر مثبت رقیق‌کننده حاوی ۴ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره بر تحرک کل و پیش‌رونده احتمالاً با زنده‌مانی بالاتر و کاهش اسپرم‌های مرده در این رقیق‌کننده مرتبط باشد. بنابراین، می‌توان استنباط کرد که عصاره مرزه در این سطح تأثیر مثبتی بر غشای اسپرم داشت [۱]. به عبارت دیگر، نتایج تست تورم هیپواسموتیک نشان داد که افزودن عصاره مرزه سهندی به رقیق‌کننده اسپرم، باعث می‌شود غشای پلاسمایی اسپرم در طی فرآیند انجماد آسیب کمتری ببیند. استفاده از سایر سطوح در رقیق‌کننده، به‌ویژه دزهای بالاتر، نه تنها اثر محافظتی بر غشای اسپرم نداشت، بلکه به دلیل به‌هم زدن فشار اسمزی، بر غشای اسپرم آسیب وارد کرده است. نتایج مربوط به تست تورم هیپواسموتیک با نتایج یکسری مطالعات مطابقت دارد [17، 23، 24]. اطلاعات محدودی در مورد اثرات آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در فرآوری اسپرم دام‌های اهلی وجود دارد. گیاهان رزماری، مریم گلی، مرزه و مرزنجوش به‌طور عمده دارای مواد مؤثره اسید رزمارینیک، کارتنوئیدها، ویتامین‌های E و C است، گیاه زغال اخته نیز علاوه بر دارا بودن ترکیبات مختلف در نسبت‌های متفاوت عمدتاً حاوی این ترکیبات نیز می‌باشد، به همین خاطر نتایج حاضر با نتایج این مطالعات مقایسه شد. لازم به ذکر است که نوع حیوان، رقیق‌کننده مورد استفاده، روش انجماد و شرایط آزمایشی کاملاً متفاوت بوده و احتمالاً همین عوامل سبب شوند نتایج حاصل از به‌کارگیری سطوح مورد استفاده از زغال اخته تفاوت داشته باشند. بهترین نتایج آزمایش حاضر در سطح ۱۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر رقیق‌کننده به دست آمد. در یک بررسی بیشترین درصد تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر میانگین و تحرک عرضی سر، بعد از فرآیند انجماد - یخ‌گشایی، در رقیق‌کننده حاوی ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره مریم گلی سهندی به‌دست آمد، درحالی‌که در همین بررسی افزودن سطوح ۱۶ و ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره مریم گلی سهندی به رقیق‌کننده اثر منفی بر تمام پارامترهای تحرک اسپرم‌ها داشت [۲]. تأثیر منفی افزایش سطوح عصاره زغال اخته برای هر کدام از پارامترها می‌تواند ناشی از تغییرات اسمزی، pH و به‌هم خوردن تعادل ترکیبات رقیق‌کننده باشد، زیرا به‌هم خوردن میزان گلیسرول و زرده تخم‌مرغ که از عوامل محافظت‌کننده انجمادی و نگهدارنده اسپرم‌ها از شوک سرمایی در طول فرآیند انجماد محسوب می‌شوند، بسیار مهم بوده و درنتیجه زنده‌مانی، تحرک و عملکردهای اسپرم‌ها با خطر مواجه می‌شود [9]. این امر در حالی است که تیمارهای حاوی ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره زغال اخته باعث افزایش معنی‌دار تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها نسبت به گروه شاهد و تیمار ۱۰۰ شد ($P<0/05$).

نتایج پژوهش حاضر با نتایج مطالعه انجام یافته در رابطه با مریم گلی سهندی مطابقت دارد، زیرا استفاده از عصاره زغال اخته باعث بهبود زنده‌مانی اسپرم‌ها شد [۲]. در مقادیر بالاتر از ۱۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره در رقیق‌کننده میزان زنده‌مانی ضعیف‌تر شده و با داده‌های حاصل از عصاره زغال‌اخته هم‌خوانی دارد. استفاده از ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر مریم‌گلی تأثیر مطلوبی در خنثی‌کردن عوامل اکسیداسیونی و بهبود پارامتر تحرک پیش‌رونده

داشت، درحالی‌که غلظت‌های بالاتر تأثیر منفی داشتند. در این آزمایش، عصاره زغال‌اخته در سطوح بالاتر نیز نتایج بهتری نسبت به کمترین مقدار آن و گروه شاهد ایجاد کرد که از این نظر با نتایج دیگر مطالعات که در آنها سطوح بالاتر عصاره‌ها تأثیر منفی گرفتند، مغایرت داشت [۱، ۲]. در تحقیق دیگری بر روی عصاره گیاه میخک نشان داده شد که استفاده از این گیاه، اسپرم قوچ را در طول سردسازی و فرآیندهای انجماد - یخ‌گشایی به خوبی محافظت کرده و بهترین سطح مورد استفاده آن سطح ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. استفاده از سطوح بالاتر این گیاه نیز بر روی تمامی پارامترهای اسپرم تأثیر نامطلوب داشت [۴]. اثرات نامطلوب میخک در سطوح بالا ممکن است به اثر اسپرم‌کشی میخک در دزهای بالا مربوط باشد. مکانیسم اصلی تأثیر آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی در انجماد اسپرم‌ها هنوز مشخص نشده است، ولی احتمالاً نقش کمکی برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوییدهای موجود در این گیاهان برای پایدارسازی غشاها از طریق کاهش سیالیت غشاء دارد [13]. افزایش در سیالیت غشای پلاسمایی، نفوذپذیری و بی‌ثباتی غشاء موجب کاهش عمر اسپرم‌ها می‌شود. باتوجه به این مستندات زغال اخته نیز با دارا بودن فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی مختلفی از جمله خاصیت جاروب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد، فعالیت‌های محدودکنندگی هیدروژن پراکسید و فعالیت‌های کلیت‌کردن فلزی نظیر یون آهن (Fe^{2+}) [7] باعث افزایش زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم قوچ‌ها شد. تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ از عصاره زغال اخته تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و تیمار ۱۰۰ افزایش داد. این افزایش درمورد تیمار ۱۵۰ بیشتر بود، یعنی بین دو تیمار ۱۵۰ و ۲۰۰ ازنظر افزایش تحرک پیش‌رونده تفاوت معنی‌داری وجود داشت، درحالی‌که سطح ۴ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره مرزه منجر به بالاترین درصد تحرک کل گردید. در برخی پارامترها نیز سطوح پایین‌تر عصاره نتایج بهتری نشان داد. افزودن ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره به‌طور معنی‌داری باعث افزایش پارامتر راستی مسیر طی شده نسبت به گروه شاهد شد. تیمار ۲۰۰ تأثیری در این پارامتر نداشت، همچنین بین تیمارهای مختلف زغال اخته و تیمار شاهد تفاوتی ازنظر تناوب عرضی زنش مشاهده نشد. افزودن سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره تفاوتی از نظر کاهش میزان تولید مالون‌دی آلدئید نسبت به گروه شاهد ایجاد نکرد، درحالی‌که سطح بالاتر از این مقادیر یعنی افزودن ۲۰۰ میکرولیتر عصاره زغال اخته میزان تولید مالون‌دی آلدئید را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. این امر درحالی است که با افزایش مقادیر عصاره‌های مرزنجوش و مریم‌گلی سهندی میزان تولید مالون‌دی آلدئید افزایش یافته و تأثیر منفی داشت. نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که اثرات مفید عصاره این گیاه در سطوح بالا (۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر) بیشتر بود و افزایش سطوح عصاره در برخی پارامترها تأثیر منفی داشتند که می‌تواند به علت تغییرات اسمزی، pH و به‌هم خوردن تعادل ترکیبات رقیق‌کننده باشد. براساس نتایج حاصل عصاره زغال اخته می‌تواند به‌عنوان منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی قابل دسترس جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های ساختگی شود. با این وجود، برای بررسی و ارزیابی دقیق‌تر تأثیر آنتی‌اکسیدانی گیاه زغال اخته در راستای فرآوری اسپرم نیاز به تحقیقات و آزمایشات بیشتری است.

منابع

۱. شهباززاده ر، دقیق‌کیا ح، مقدم غ، دهقان غ، حسین‌خانی ع و اشرفی ا (۱۳۹۴) تأثیر سطوح مختلف عصاره الکلی مرزه سهندی بر کیفیت اسپرم منجمد/ یخ‌گشایی شده گاو هلشتاین. پژوهش‌های علوم دامی. ۲۵(۱): ۲۴-۱۳.

۲. فرهادی ر، دقیق‌کیا ح و اشرفی ا (۱۳۹۴) تأثیر عصاره اتانولی مریم‌گلی سهندی به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی بر پارامترهای کیفی اسپرم منجمد/ یخ‌گشایی شده گاو هلشتاین. پژوهش‌های تولیدات دامی. ۱۲: ۷۹-۸۶

3. Aitken RJ (1995) Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reproduction, Fertility, and Development 7(4): 659-668.

4. Baghshahi H, Riasi A, Mahdavi AH and Shirazi A (2014) Antioxidant effect of clove bud (*syzygium aromaticum*) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. Cryobiology. 69(3): 482-487.

5. Dragana M, Stanisavljević, Saša S, Stojiĉević, Sofija M, ĐorĊević, Branislav P, Zlatković, Dragan T, Veliĉković, Ivana T, Karabegović, Miodrag L and Lazić (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.

6. Emamverdi M, Zhandi M, Zare-Shahneh A, Sharafi M and Akbari-Sharif A (2013) Optimization of ram semen cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin-based extender. Reproduction in Domestic Animals. 48(6): 899-904.

7. Ersoy N, Bagci Y and Gok V (2011) Antioxidant properties of 12 cornelian cherry (*Cornus mas L.*) fruit types selected from Turkey. Scientific Research and Essays. 6(1) :98-102.

8. Esteraauer H and Cheeseman KH (1990) Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal. Methods in Enzymology. 186: 407-421.

9. Evans G, Maxwell WMC and Salamon S (1987) Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney.

10. Forouzanfar M, Fazilati M and Hosseini S (2007) Investigation of different glycerol and Egg Yolk concentration on freezing Bakhtiari Ram Semen. Journal of Iranian Anatomical Sciences. 5(18): 17-25.

11. Gil L, Mascaró F, Mur P, Gale I, Silva A, González N, Malo C and Cano R (2010) Freezing ram semen: The effect of combination of soya and rosemary essences as a freezing extender on post-thaw sperm motility. Reproduction in Domestic Animals. 45: 91.

12. González N, Gil L, Martinez F, Malo C, Cano R, Mur P and Espinosa E (2010) Effect of natural antioxidant Rosemary in canine soya freezing extender. Reproduction in Domestic Animals. 45: 88.

13. Hassanpour H, Hamidoghli Y and Adlipour M (2011) Antioxidant capacity and phytochemical properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes in Iran. Scientia Horticulturae. 129(3): 459-463.

14. Hu JH, Li QW, Zhang T and Jiang ZL (2009) Effect of Gynostemma pen-taphyllum polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing–thawing. Cryobiology. 59(3): 244 249.

15. Malo C, Bathgate R, Gil L and De Graaf SP (2010) Influence of natural antioxidants on boar spermatozoa quality and DNA integrity of frozen-thawed boar semen. Reproduction in Domestic Animals. 45: 98.

16. Malo C, Gil L, Gonzalez N, Martínez F, Cano R, de Blas I and Espinosa E (2010b) Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Cryobiology. 61(1): 142-147.

17. Malo C, Gil L, Cano R, Martínez F and Galé I (2011) Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology. 75(9): 1735-1741.

18. Martinez-Pastor F, Fernandez-Santos MR, Domınguez Rebol-ledo A, Esteso MC and Garde JJ (2009) DNA status on thawed semen from fighting bull: a comparison between the SCD and the SCSA tests. Reproduction in Domestic Animals. 44(3): 424-431.

19. Maxwell WMC and Watson PF (1996) Recent progress in the preservation of ram semen . Animal Reproduction Science. 42(1-4): 55-65.

20. Otakar R, Jira M, Daniela K and Tunde J (2010) Selected cultivars of cornelian cherry (*cornus mas*) as a new food source for human nutrition. African Journal of Biothecnology. 9(8): 1205-1210.

21. Sadeghi Ghotbabadi F, Alizadeh A, Zadehbagheri M, Kamelmanesh MM and Shaabani M (2012) Phytochemical composition of the essential oil, total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity in Iranian Satureja Sahendica Bornm at different ontogenesis conditions. Journal of Medicinal Plants Research. 6(19): 3525-3534.

22. Vaseghi Dodaran H, Zhandi M, Sharafi M, Nejati-Amiri E, Nejati-Javaremi A, Mohammadi Sangcheshmeh A, Shehab-El-Deen MA and Malak Shakeri (2015) Effect of ethanol induced mild stress on post thawed bull sperm quality. Cryobiology. 71(1): 12-17.

23. Zhao HW, Li QW, Ning GZ, Han ZS, Jiang ZL and Duan YF (2009) Rhodiola sacra aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen. Theriogenology. 71(5): 849-57.

24. 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(1): 120-125.