تولیدات دامی
دوره ۱۸ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۵
صفحه‌های ۶۲۴-۶۱۵

# بهبود ذخیره‌سازی اسپرم خروس با استفاده از اسانس الکلی رزماری

هانیه شفیق[۱]، ملک شاکری[۲*]، سعید زین‌الدینی[۳]، حمید کهرام[۲]، مهدی ژندی[۳]، مرتضی مقبلی[۱]، رضا معصومی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج – ایران
۲. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج – ایران
۳. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج – ایران
۴. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان– ایران

تاریخ وصول مقاله:۱۳۹۴/۱۱/۰۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۶/۰۱

## چکیده

هدف تحقیق حاضرکه در گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۳ به اجرا درآمد، بررسی تأثیر سطوح مختلف اسانس رزماری (صفر، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۶/۶، ۲۵ و۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در رقیق‌کننده منی، بر کمیت و کیفیت اسپرم خروس، بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی بود. از ۱۰ قطعه خروس سویه تجاری راس در این مطالعه استفاده شد. نمونه‌های منی هفته‌ای دو بار جمع‌آوری و پس از افزودن مایع رقیق‌کننده بر پایه لستین به آنها در دمای پنج درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. رقیق-کننده حاوی غلظت‌های ۱۰ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر اسانس رزماری، جنبایی کل و رقیق‌کننده حاوی غلظت‌های ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۶/۶ میلی‌گرم در لیتر اسانس رزماری، حرکت پیشرونده اسپرم و نیز زنده‌مانی آنها قبل از انجماد را بهبود بخشید (P≤۰/۰۵). کمترین و بیشترین تحرک اسپرم‌ها به ترتیب در رقیق‌کننده بدون رزماری و رقیق‌کننده حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر از اسانس رزماری مشاهده شد (P≤۰/۰۵). یکپارچگی غشای سلولی اسپرم‌ها در رقیق‌کننده حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس رزماری نسبت به سایر غلظت‌ها (به‌جز غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) افزایش یافت (P≤۰/۰۵). آپوپتوز اسپرم‌ها در رقیق‌کننده حاوی ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۶/۶ میلی‌گرم در لیتر اسانس رزماری، کاهش یافت (P≤۰/۰۵). براساس نتایج تحقیق حاضر، اسانس رزماری در سطوح ۱۰ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر در مایع رقیق‌کننده، کیفیت اسپرم خروس را پس از یخ‌گشایی بهبود می‌بخشد.

**کلیدواژه‌ها:** آنتی‌اکسیدان، اسانس رزماری، اسپرم خروس، انجماد – یخ‌گشایی، رقیق‌کننده

* نویسنده مسئول Email: mshaker@ut.ac.ir

**مقدمه**

امروزه تولید فراورده‌های غذایی با منشاء پروتئین حیوانی جایگاه ویژه‌ای در حفظ سلامت جسمانی و رشد فکری افراد جامعه دارد و نیز پرورش طیور از شناخته شده‌ترین روش‌ها جهت تولید پروتئین حیوانی به حساب می‌آید. تلقیح مصنوعی یکی از ابزارهای مدیریتی کارآمد برای بهینه‌سازی تولیدمثل ماکیان در جهت افزایش تولید گوشت مرغ و تخم‌مرغ است اما دارای محدودیت‌هایی است که از آن جمله می‌توان به هزینه بالا، نیاز به نیروی متخصص و همچنین، کاهش سریع توان باروری اسپرم، هنگامی‌که به شکل مایع یا منجمد نگهداری می‌شود، اشاره کرد. لذا ارتقای روش‌های ذخیره و نگهداری اسپرم می‌تواند این محدویت‌ها را کاهش دهد.

لیپیدها از اجزای مهم غشای اسپرم هستند و نقش عمده‌ای در فرایندهایی دارند که بر توان باروری اسپرم‌ها تأثیر می‌گذارند [۲۱]، زیرا فسفولیپیدهای اسپرم پرندگان مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع دارند [۲۳]. مقادیر زیاد اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه موجب می‌شود اسپرم به پراکسیداسیون لیپیدی بسیار حساس شود که این مطلب با ناباروری جنس نر همبستگی مثبت دارد [۹].

به منظور جلوگیری از آسیب‌ها به‌طور طبیعی در مایع منی، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی وجود دارد، اما سیستم آنتی‌اکسیدانی موجود در پلاسمای منی پرندگان اهلی در تولیدمثل طبیعی تنها برای مدت کوتاهی مؤثر است. از پی‌آمدهای پراکسیداسیون لیپید، کاهش اسیدهای چرب غیراشباع و تولید رادیکال‌های آزاد است. این رادیکال‌ها سبب تشدید پراکسیداسیون لیپید خواهند شد و از آنجا که غلظت‌های بالای اسیدهای چرب غیراشباع برای حفظ سیالیت غشاء و جنبایی اسپرم ضروری است، می‌توان کاهش جنبایی اسپرم را در شرایط کاهش اسیدهای چرب توجیه کرد [۱]. اگرچه فراورده‌های پراکسیداسیون در منی پرندگان در زمان انزال وجود دارند، اما بیشترین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم خروس [۱]، بوقلمون و ماکیان در چند ساعت آغازین نگهداری برون‌تنی دیده می‌شود [۶ و ۱۰].

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) آثار مخربی بر فرآیندهای متابولیکی می‌گذارند و می‌توانند سبب آغاز پراکسیداسیون لیپید و تخریب ساختار DNA اسپرم و در پایان موجب مرگ سلولی شوند [۸]. بسیاری از مطالعات اثرات سودمند آنتی‌اکسیدان‌های افزوده شده به مایع رقیق‌کننده منی را برای جلوگیری از اثرات سوء ROS نشان دادند. با این حال، گزارشات محدودی در رابطه با بررسی اثر عصاره‌های گیاهان دارویی به عنوان یک مخزن آنتی‌اکسیدانی بر کیفیت اسپرم وجود دارد [۱۴].

گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) حدوداً حاوی یک تا ۲/۵ درصد اسانس می‌باشد. بورنئول، لیمونن، کامفن، ۱ و ۸ سینئول، کامفر و آلفا-پینن از ترکیبات عمده اسانس رزماری هستند. اسیدهای فنلی نظیر کارنوسیک اسید، اسید رزماریک، اسید کافئیک و اسید کلرخیوژنیک از ترکیبات دیگر موجود در این گیاه هستند [۱۷].

آنتی‌اکسیدان‌های فنولیک نوع صنعتی، نظیر هیدروکسی آنیزول بوتیله شده (BHA) و هیدروکسی تواوئن بوتیله شده (BHT)، با داشتن یک حلقه آروماتیک با یک گروه الکلی، قادر به اهدای یون هیدروژن به عوامل اکسیدکننده هستند، درحالی‌که کارنوسیک اسید موجود در اسانس رزماری دارای یک حلقه آروماتیک، اما دو گروه الکلی می‌باشد که می‌تواند به طور مؤثری به عنوان دهنده یون هیدروژن به عوامل اکسیدکننده، عمل کند. همچنین پلی‌فنل و رزمارینیک اسید دارای دو حلقه آروماتیک با دو گروه الکلی هستند که می‌توانند اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری را ایجاد کنند. بنابراین نقش مؤثرتری در خنثی کردن عوامل اکسیدکننده دارند [۵ و ۱۷]. رقیق‌کننده انجماد حاوی عصاره

رزماری می‌تواند کیفیت اسپرم خوک [۱۳ و ۱۴]، گاو [۷]، بز [۲۵] و گوسفند [۱۵] را پس از یخ‌گشایی بهبود بخشد. بهبود در کیفیت اسپرم منجمد شده توسط سایر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از جمله آیلکس پاراگویسنسس (Ilex paraguayensis) نیز نشان داده شده است [۱۴].

هدف از انجام پژوهش حاضر، ایجاد بررسی تأثیر استفاده اسانس رزماری به عنوان یک آنتی‌اکسیدان گیاهی در رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم خروس بعد از فرایند انجماد - یخ‌گشایی است.

## مواد و روش‌ها

در این آزمایش، از ۱۰ خروس بالغ سویه تجاری رأس (۳۲ هفته) که به طور تصادفی از گله موردنظر انتخاب شده بودند، استفاده شد. تمامی خروس‌ها برای یک دوره سه هفته‌ای، به اسپرم‌گیری با روش مالش شکمی، عادت داده شدند. مایع منی به وسیله ماساژ شکمی به صورت هفته‌ای دو بار جمع‌آوری شد.

از محیط انجماد بر پایه لستین برای حفاظت اسپرم استفاده شد. رقیق‌کننده مورد استفاده در این پژوهش، با شماره ثبت ۷۸۹۸۶ و دارای ترکیبات گلوتامات سدیم، مونو پتاسیم فسفات، پتاسیم سیترات، منیزیم کلراید، دی‌پتاسیم فسفات، تریس، سدیم استات، فروکتوز و گلیسرول (سه درصد) بود، برای پردازش مایع منی، حجم (۰/۳-یک) میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از $۳ \times ۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک بیش از ۷۵ درصد و مورفولوژی کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیرطبیعی، در هر انزال به عنوان مایع منی نرمال در نظر گرفته شد، در غیر این صورت مایع منی‌های جمع‌آوری شده حذف شدند.

بلافاصله بعد از جمع‌آوری مایع منی، به نسبت یک حجم منی و ۲۰ حجم محیط انجماد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رقیق شد. سپس لوله مایع منی در ظرف محتوی ۱۰۰ سی‌سی آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در مدت کمتر از ۱۵ دقیقه به آزمایشگاه منتقل شد. پس از مخلوط‌سازی، نمونه‌ها از نظر غلظت، مورفولوژی و تحرک بررسی شدند تا از سلامت آنها برای انجماد اطمینان حاصل شود. تیمارهای آزمایشی حاوی شش سطح (صفر، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۶/۶، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) از اسانس رزماری با شش تکرار بودند.

سطوح مورد نظر ابتدا براساس درصد انتخاب شدند. یعنی نسبت ۱ به ۲۰۰، ۱ به ۴۰۰، ۱ به ۶۰۰، ۱ به ۸۰۰ و ۱ به ۱۰۰۰ رقیق‌سازی انجام گرفت و برای سهولت بیشتر به میلی‌گرم بر لیتر تبدیل شدند. استفاده از رقیق‌کننده بدون اسانس رزماری به عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. اسانس استفاده شده در این پژوهش، ویال ۵۰ میلی‌گرمی تولید شرکت باریج اسانس کاشان به شماره ۷۲۹۰۱۹ با خلوص ۱۰۰ درصد بود.

پس از تجزیه و تحلیل اولیه شاخص‌های اسپرمی (غلظت، مورفولوژی و تحرک اسپرم‌ها)، برای سرد شدن تدریجی و تعادل با محیط انجماد (به‌ویژه گلیسرول)، ظرف آب محتوی لوله‌های اسپرم به مدت دو ساعت در یخچال پنج درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت نهایی اسپرم به میزان $۱۰^{۶} \times ۱۰۰$-۲۰۰ اسپرم در هر میلی‌لیتر تعیین شد. پس از گذشت یک ساعت جهت حفظ دمای مایع منی، ظرف آب محتوی مایع منی روی کریستال‌های یخ قرار داده شد و بلافاصله در داخل نی‌های انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتر کشیده شد. نی‌های محتوی اسپرم به مدت هفت دقیقه در بالای سطح ازت مایع (پنج سانتی‌متر) قرار گرفتند و سپس به سرعت در ازت مایع غوطه‌ور شده و برای نگهداری به تانک ازت منتقل شدند. در این تحقیق، به ازای هر یک از گروه‌های تیماری شش بار تکرار انجام شد و در هر تکرار ۱۰ نی منجمد و پس از یخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای یخ‌گشایی مایع منی، نی‌ها از ازت مایع خارج و به مدت سه دقیقه در آب چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس محتوای آنها به داخل میکروتیوپ‌ها تخلیه شدند.

برای ارزیابی اسپرم‌ها پس از یخ‌گشایی، سه نمونه از هر گروه تیماری با روشی که در بالا توضیح داده شد، یخ‌گشایی شده و به داخل میکروتیوپ انتقال داده شدند. سپس با استفاده از سمپلر متغیر، ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از منی، روی لام ریخته و با گذاشتن یک لامل تمیز روی آن، لام مورد نظر با استفاده از سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (CASA) مورد بررسی قرار گرفت و میزان تحرک اسپرم‌ها ثبت شد. پارامترهای ارزیابی تحرک نظیر درصد کل اسپرم‌های متحرک و درصد اسپرم‌های پیشرونده محاسبه شد [۱۶].

برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده پس از یخ-گشایی، از رنگ‌آمیزی ائوزین – نگروزین (رنگ ائوزین ۱۶/۷ گرم در لیتر، رنگ نگروزین ۱۰۰ گرم در لیتر و سدیم سیترات ۲۹ گرم در لیتر) استفاده شد [۲]. اساس این رنگ‌آمیزی به این صورت است که رنگ ائوزین به داخل اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند، درحالی‌که اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند (شکل ۱). برای انجام رنگ‌آمیزی، ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم روی لام قرار داده شد، سپس ۱۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین- نگروزین به نمونه اضافه و با سمپلر به آرامی با هم مخلوط شدند. سپس با یک لام دیگر روی لام به آرامی گسترش داده شد. پس از خشک نمودن سریع، لام را زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ قرار داده و به منظور شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. اسپرم‌ها در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. از هر نمونه حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد.

**شکل ۱. رنگ‌آمیزی اسپرم توسط رنگ‌آمیزی ائوزین – نگروزین، رنگ ائوزین به داخل اسپرم‌های مرده نفوذ کرده، درحالی‌که اسپرم‌های زنده رنگ نگرفته‌اند.**

در این مطالعه، برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از تست‌هاست (hypo-osmotic swelling test) استفاده شد [۲۰]. بدین‌منظور، ۳۰ میکرولیتر از منی رقیق شده با غلظت $۲۰ \times ۱۰^{۶}$ میلیون بر میلی لیتر را برداشته و به ۳۰۰ میکرولیتر از محلول هایپواسمتیک با فشار اسمزی ۱۰۰ mOsm/kg (ترکیبات محلول HOST عبارتند از: نه گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سدیم سیترات در یک لیتر آب دو بار تقطیر)، اضافه شد. نمونه حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در

دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل سه قطره (۱۰ میکرولیتر) از نمونه انکوبه شده و با استفاده از یک صفحه گرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به وسیله میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰۰ بررسی شدند. در هر گرو، تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های با دم گره خورده (زنده) نسبت به اسپرم‌های با دم صاف محاسبه شد.

درصد اسپرم‌های زنده، متحمل آپوپتوز و مرده به وسیله کیت آنکسین ارزیابی شد [۲۲]. به‌طور خلاصه، بعد از یخ‌گشایی نمونه‌های منی ۵۰۰ میکرولیتر از رقیق‌کننده منی (بدون لستین و گلیسرول) به آن اضافه شد و بعد از سانتریفیوژ (۱۲۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه) و جدا نمودن مایع رویی، پلت تشکیل شده با ۵۰۰ میکرولیتر از رقیق‌کننده منی مخلوط شد. سپس ۱۵ میکرولیتر از مخلوط برداشته شد و با ۱۰۰ میکرولیتر بافر کلسیم مخلوط شد، سپس ۱۰ میکرولیتر محلول آنکسین به آن افزوده شد و در مکان تاریکی با دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. سپس مقدار پنج میکرولیتر محلول پروپودیم آیداد (Propidium Iodide = PI) به نمونه اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. پس از آن میزان جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین غشای اسپرم به وسیله دستگاه فلوسایتومتر اندازه‌گیری شد.

داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۲) و رویه مدل‌های خطی عمومی برای مدل ۱ تجزیه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ مقایسه شدند.

$$Y_{ijkl} = \mu + a_i + e_{ijkl}$$ رابطه ۱

در این رابطه، $Y_{ij}$ خصوصیات کمی و کیفی اسپرم، $\mu$ میانگین جامعه، $a_i$ اثر تیمارهای مختلف و $e_j$ اثر خطای آزمایشی است.

## نتایج و بحث

جنبایی اسپرم در رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر اسانس رزماری، بیشتر بود ($P\leq۰/۰۵$) (جدول ۱). همچنین درصد اسپرم‌های دارای جنبایی پیشرونده در رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۶/۶ میلی‌گرم در لیتر اسانس، بیشتر از سایر رقیق‌کننده‌ها بود ($P\leq۰/۰۵$). به علاوه درصد اسپرم‌های غیرمتحرک در رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۶/۶ میلی‌گرم در لیتر اسانس رزماری، نسبت به سایر تیمارها کمتر بود ($P\leq۰/۰۵$)، اما هیچ یک از فراسنجه‌های دیگر جنبایی اسپرم در تمامی تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P\leq۰/۰۵$).

**جدول ۱. اثر اسانس رزماری (میلی‌گرم بر لیتر) بر پارامترهای حرکتی اسپرم خروس پس از انجماد - یخ‌گشایی**

| صفت | تیمار | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | شاهد | ۵۰ | ۲۵ | ۱۶/۶ | ۱۲/۵ | ۱۰ | SEM |
| جنبایی کل | ۶۳/۱۶$^{c}$ | ۶۵/۸۳$^{bc}$ | ۶۶/۵۰$^{bc}$ | ۶۸/۵۰$^{abc}$ | ۷۰/۱۶$^{ab}$ | ۷۲/۶۶$^{a}$ | ۲/۰۰ |
| حرکت پیش‌رونده | ۸/۹۲$^{c}$ | ۱۰/۰۸$^{c}$ | ۱۰/۵۷$^{c}$ | ۱۱/۱۹$^{b}$ | ۱۱/۹۸$^{ab}$ | ۱۳/۶۵$^{a}$ | ۰/۳۲ |

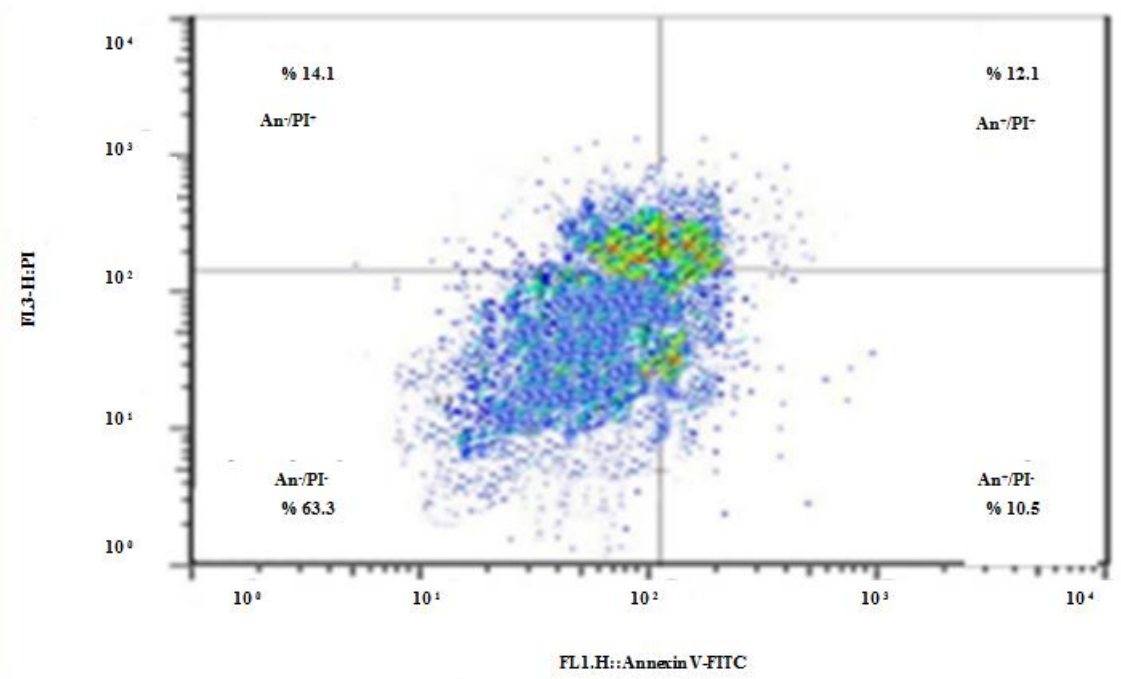
حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت میانگین سطوح (با سطح احتمال پنج درصد) در هر ردیف می‌باشد.

زنده‌مانی قبل از انجماد (بعد از دوره سردسازی) اسپرم در رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۶/۶ میلی‌گرم در لیتر اسانس، نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (P≤۰/۰۵) (جدول ۲). همچنین رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر اسانس، زنده‌مانی پس از انجماد - یخ‌گشایی را نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری افزایش دادند (P≤۰/۰۵) (جدول ۲). یکپارچگی غشاء در رقیق‌کننده حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس نسبت به تمام تیمارها، به‌جز ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (P≤۰/۰۵) (جدول ۲). تعیین مراحل مختلف آپوپتوز توسط روش فلوسایتومتری در شکل (۲) نشان داده شده است.

**جدول ۲. اثر اسانس رزماری (میلی‌گرم بر لیتر) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس پس از انجماد - یخ‌گشایی**

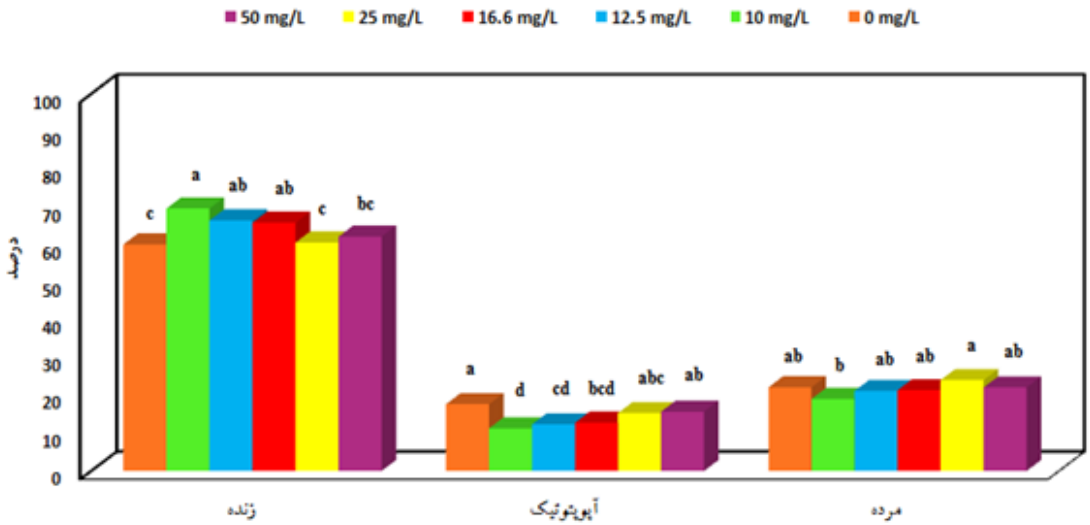
| صفت | تیمار | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | شاهد | ۵۰ | ۲۵ | ۱۶/۶ | ۱۲/۵ | ۱۰ | SEM |
| اسپرم زنده | ۶۸/۱۶$^{c}$ | ۷۰/۵۰$^{bc}$ | ۷۰/۱۶$^{bc}$ | ۷۲/۸۳$^{abc}$ | ۷۳/۶۶$^{ab}$ | ۷۶/۸۳$^{a}$ | ۱/۸۳ |
| سلامت غشاء | ۷۹/۲۳$^{b}$ | ۷۶/۶۲$^{b}$ | ۷۷/۹۲$^{b}$ | ۷۵/۱۱۳$^{b}$ | ۸۰/۹۵$^{ab}$ | ۸۵/۱۴$^{a}$ | ۲/۳۸ |

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت میانگین سطوح (با سطح احتمال پنج درصد) در هر ردیف می‌باشد.




**شکل ۲. تعیین مراحل مختلف آپوپتوز توسط روش فلوسایتومتری**

اثر اسانس رزماری بر درصد اسپرم‌های زنده (An-/PI-)، اسپرم‌های آپوپتوتیک (An+/PI-) و اسپرم‌های مرده (مرگ توسط آپوپتوز (An+/PI+) و نکروز شده (An-/PI+)) در شکل (۳) نشان داده شده است. درصد اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۶/۶ میلی‌گرم در لیتر اسانس، بیشتر از سایر رقیق‌کننده‌ها بود (P≤۰/۰۵). همچنین درصد اسپرم‌های دچار آپوپتوز در رقیق‌کننده‌های حاوی ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۶/۶ میلی‌گرم در لیتر اسانس، در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری پایین‌تر بود (P≤۰/۰۵) و اسپرم‌های مرده در بین تمامی تیمارها در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند، اما بین رقیق‌کننده حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس با رقیق‌کننده حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌دار بود (P≤۰/۰۵).




**شکل ۳. اثر اسانس رزماری (میلی‌گرم در لیتر) بر زنده‌مانی اسپرم پس از انجماد - یخ‌گشایی با استفاده از تست آپوپتوز. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت میانگین سطوح (با سطح احتمال پنج درصد) در هر ستون می‌باشد.**

در انتخاب روش ذخیره و نگهداری اسپرم فاکتورهایی نظیر میزان باروری، استفاده از کمترین میزان اسپرم همراه با بیشترین مدت باروری (تولید مقدار بیشتر تخم بارور پس از یک تلقیح)، افزایش توانایی هچ تخم‌های بارور و استفاده از حداقل تعداد نر مورد توجه می‌باشد [۱۱]، استفاده از روش‌های مناسب انجماد اسپرم که بتواند فاکتورهای مذکور را در مقایسه با اسپرم تازه بیشتر فراهم کند و نزدیکترین باروری و هچ را نسبت به آن داشته باشد، می‌تواند گامی بزرگ در دستیابی به هدف باشد [۱۲ و ۲۴].

با توجه به اینکه در رقیق‌سازی اسپرم برای نگهداری به صورت مایع، با افزایش زمان ذخیره‌سازی، تحرک و باروری کاهش می‌یابد [۳ و ۴]. همچنین در اثر انجماد اسپرم، فاکتورهای غشایی از جمله سیالیّت، نفوذپذیری و ترکیبات لیپیدی تحت تأثیر قرار می‌گیرند، به‌طوری‌که پس از ذوب میزان سیّالیّت غشاء و مقدار ترکیبات لیپیدی اسپرم کاهش می‌یابد و این خود سبب کاهش قدرت تحرک، باروری و اسپرم‌های زنده می‌شود [۴].

به نظر می‌رسد اسانس الکلی رزماری به عنوان یک

آنتی‌اکسیدان می‌تواند تأثیر مناسبی روی فراسنجه‌های کیفی اسپرم، پس از یخ‌گشایی بگذارد. اقدام به انجماد اسپرم، قابلیت تحرک و زنده‌مانی اسپرم را بعد از یخ‌گشایی تحت تأثیر قرار می‌دهد. همچنین غشای پلاسمایی و یکپارچگی غشای آکروزوم که از عوامل مهم لقاح محسوب می‌شوند نیز آسیب می‌بینند. در همین رابطه، به نظر می‌رسد که استرس اکسیداتیو از فاکتورهای کنترل‌کننده ضروری محسوب می‌شود [۱۹].

اثر گیاه رزماری در مطالعات مختلف به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مورد بررسی قرار گرفته است و ثابت شده است که اسانس و عصاره آن می‌تواند مانع از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی گردد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با اسانس الکلی رزماری به طور مؤثری جنبایی کل و پیشرونده، زنده‌مانی و یکپارچگی عملکرد غشاء را بعد از یخ‌گشایی در غلظت ۱۰ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بهبود می‌بخشد. به نظر می‌رسد که این بهبود در جنبایی کل و پیشرونده ممکن است با یکپارچگی ساختاری و عملکردی غشاء و زنده‌مانی اسپرم ارتباط داشته باشد. به عبارت دیگر، به علت وجود ترکیبات آنتی-اکسیدانی موجود در گیاه رزماری نظیر کارنوسیک اسید و رزمارینیک اسید که دارای دو حلقه آروماتیک با دو گروه الکلی بوده و قادر به اهدای یون هیدروژن به عوامل اکسیدکننده هستند، موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند [۵ و ۱۸].

لازم به ذکر است که تاکنون، مطالعات اندکی روی اثرات رزماری و دیگر گیاهان دارویی بر اسپرم پستانداران انجام شده است [۱۳]، ولی گزارشی در خصوص اثر آن بر اسپرم ماکیان ارائه نشده است. لذا، در بررسی اثر عصاره گیاه پلی‌ساکاریدی *گاینستما پنتافیلوم* (*Gynostemma pentaphyllum*) بر روی اسپرم خوک، جنبایی کل و یکپارچگی آکروزم و غشاء بعد از یخ‌گشایی در سطوح ۰/۵ و یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این عصاره بهبود یافته است [۲۶]. در تحقیقی که در آن عصاره آبی گیاه رودیولاروسی (Rhodiolarosea) به محیط رقیق‌کننده اسپرم خوک افزوده شده بود، افزایش در جنبایی کل و یکپارچگی غشای پلاسمایی و کاهش ناهنجاری‌های مورفولوژی در سطوح چهار و شش میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره نسبت به گروه شاهد گزارش شد و اثر رزماری تنها مربوط به بعد از یخ‌گشایی نمی‌شود، زیرا نرخ‌های بالاتری از جنبایی طی انکوباسیون به‌دست آمد [۷].

بنابراین نتایج حاصل از دیگر مطالعات، در استفاده از اسانس رزماری و عصاره‌های گیاهی دیگر در ذخیره‌سازی اسپرم پستانداران هم راستا با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. افزایش آپوپتوزیس نشان‌دهنده یک مکانیسم احتمالی دخیل در القای آسیب به DNA اسپرم در طی فرایند انجماد است [۱۴]. در همین رابطه، فسفاتیدیل سرین قرار گرفته در خارج از غشای پلاسمایی اسپرم آپوپتوتیک به ایزوتیوسیانات فلورسنس جفت شده با آنکسین-V تمایل بالایی را نشان می‌دهد. آپوپتوزیس سلولی (تعیین شده به وسیله آنکسین-V) در ارتباط با قطعه قطعه شدن DNA نیز است [۱۴]. در مطالعه حاضر، اسانس الکلی رزماری در سطح ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش زنده‌مانی و نیز کاهش درصد اسپرم‌هایی که دچار آپوپتوز شده بودند، شد. بنابراین اسانس رزماری در رقیق‌کننده می‌تواند موجب کاهش مرگ سلول و قطعه قطعه شدن DNA بعد از یخ-گشایی در مقایسه با سایر تیمارها شود. بخشی از اثرات مثبت غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس الکلی رزماری بر جنبایی کل و پیشرونده ممکن است در ارتباط با زنده‌مانی بالاتر و آپوپتوز کمتر در این محیط با سایر تیمارها باشد. نکته قابل توجه آنست که تاکنون هیچ شاهدی دال بر اثر عصاره‌های آبی و الکلی گیاهان دارویی بر وضعیت و حالات آپوپتوتیک اسپرم ماکیان وجود ندارد، لذا مطالعه

حاضر اولین مطالعه درباره اثر اسانس الکلی رزماری بر این فراسنجه بعد از یخ‌گشایی است. افزودن اسانس رزماری به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در سطح ۱۰ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر در رقیق‌کننده بر پایه لسیتین سبب بهبود معنی‌دار کیفیت اسپرم خروس نژاد رأس پس از فرآیند انجماد – یخ‌گشایی می‌شود.

## منابع


1. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V and Davies-Morel MC (2000) The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. Journal of Andrology. 21: 895-902.
2. Barth AD and RJ Oko (1989) Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press.
3. Blanco JM, Gee G, Wildt DE and Donoghue AM (2000) Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle and peregrine falcon spermatozoa. Biology of Reproduction. 63: 1164-1171.
4. Blesbois E, Grasseau I and Seigneurin F (2005) Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. Reproduction. 129: 371-378.
5. Brown JE and Kelly MF (2007) Inhibition of lipid peroxidation by anthocyanins, anthocyanidins and their phenolic degradation products. European Journal of Lipid Science and Technology. 109: 66-71.
6. Cecil H and Bakst M (1993) *In vitro* lipid peroxidation of turkey spermatozoa. Poultry Science. 72: 1370-1378.
7. 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.
8. Donoghue A and Donoghue D (1997) Effects of water-and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. Poultry Science. 76: 1440-1445.
9. Fujihara N and Howarth B (1978) Lipid peroxidation in fowl spermatozoa. Poultry Science. 57: 1766-1768.
10. Fujihara N and Koga O (1984) Prevention of the production of lipid peroxide in rooster spermatozoa. Animal Reproduction Science. 7: 385-390.
11. Hammerstedt RH and Graham JK (1992) Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. Cryobiology. 29: 26-38.
12. Han X, Niu Z, Liu F and Yang C (2005) Effects of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. International Journal of Poultry Science. 4: 197-201.
13. HuJ H, Li QW, Zhang T and Jiang Z-L (2009) Effect of Gynostemma Pentaphyllum Polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing–thawing. Cryobiology. 59: 244-249.
14. 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: 1735-1741.

15. 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. 61: 142-147.

16. Makhafola M, Umesiobi D, Mphaphathi M, Masenya B and Nedambale B (2012) Characterization of sperm cell motility rate of Southern African Indigenous Cockerel semen following analysis by sperm class analyser. Journal of Animal Science Advances. 2(4): 416-424.

17. Min D and Boff J (2002) Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 1: 58-72.

18. Nakatani N (2003) Biologically functional constituents of spices and herbs (2002's JSNFS award for excellence in research). Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science. 56: 389-395.

19. Partyka A, Niżański W, Bajzert J, Łukaszewicz E and Ochota M (2013) The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. Cryobiology. 67: 132-136.

20. Saemi F, Zamiri M J, Akhlaghi A, Niakousari M, Dadpasand M and Ommati M M (2012) Dietary inclusion of dried tomato pomace improves the seminal characteristics in Iranian native roosters. Poultry Science. 91(9): 2310-2315.

21. Scott T (1973) Lipid metabolism of spermatozoa. Journal of reproduction and fertility. Supplement 18: 65.

22. Shahverdi A, Sharafi M, Gourabi H, Yekta A A, Esmaeili V, Sharbatoghli M, and Mostafayi F (2015). Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. Theriogenology. 83(1): 78-85.

23. . Surai P, Kostjuk I, Wishart G, Macpherson A, Speake B, Noble R, Ionov I and Kutz E (1998) Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. Biological Trace Element Research. 64: 119-132.

24. Tselutin K, Seigneurin F and Blesbois E (1999) Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. Poultry Science. 78: 586-590.

25. Zanganeh Z, Zhandi M, Zare-Shahneh A, Najafi A, Nabi M and Mohammadi-Sangcheshmeh A (2013) Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Ruminant Research. 114: 120-125.

26. 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: 849-857.