

ذخیره‌سازی منی خروس به صورت مایع با استفاده از عصاره الکلی رزماری

هانیه رمضانی‌نژاد^۱ و محمد روستائی‌علی‌مهر^{۲*}

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۳)

چکیده

این آزمایش برای بررسی عصاره الکلی برگ رزماری بر ذخیره‌سازی اسپرم خروس در ۴ °C آزمایشی با استفاده از هشت قطعه خروس بالغ انجام شد. گردآوری منی سه روز یکبار در پنج نوبت انجام شد. انزال‌ها در هر نوبت پس از تجمع به شش قسمت تقسیم و مقدار ۰ (R0)، ۱۰ (R10)، ۲۰ (R20)، ۳۰ (R40)، ۴۰ و ۵۰ (R50) میکروگرم عصاره الکلی رزماری در میلی‌لیتر به هر قسمت اضافه شد. سپس نمونه‌ها تا ۴ °C سرد شد و به مدت ۷۲ ساعت در این دما نگهداری شد. در زمان‌های ۰ (T0)، ۲۴ (T24)، ۴۸ (T48) و ۷۲ (T72) ساعت ذخیره‌سازی، سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی (رنگ‌آمیزی هوخست ۳۳۲۵۸) و تحرک اسپرم ارزیابی شد. در زمان ۴۸ به‌منظور بررسی پراکسیداسیون چربی، غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) در یک میلیون اسپرم اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، غلظت MDA در تیمار R50 (۰/۹۳ nM) کمتر از شاهد (۱/۱۵ nM) و بیشتر از R40 (۰/۸۲ nM) بود ($P < 0/05$). سلامت غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم در غلظت‌های ۴۰ $\mu\text{g/mL}$ عصاره الکلی رزماری (به ترتیب ۷۵/۷۲ درصد و ۷۳/۵۶ درصد) از غلظت‌های ۰ (به ترتیب ۷۰/۶۰ درصد و ۶۹/۰۸ درصد) و ۱۰ $\mu\text{g/mL}$ (به ترتیب ۷۱/۵۶ درصد و ۶۹/۷۲ درصد) عصاره بیشتر بود ($P < 0/05$). اثر متقابل عصاره الکلی رزماری و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک پیش‌رونده اسپرم خروس معنی‌دار بود ($P < 0/05$). پس از ۷۲ ساعت، تحرک پیش‌رونده اسپرم در تیمار R40 (۴۶ درصد) بیشتر از تیمارهای R0 (۳۴ درصد)، R10 (۳۵/۶ درصد) و R20 (۳۸/۸ درصد) بود ($P < 0/05$). بنابراین عصاره الکلی رزماری سبب بهبود کیفیت اسپرم خروس طی ذخیره‌سازی در ۴ °C شد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، پراکسیداسیون چربی، خروس، عصاره زرماری.

Storage of rooster semen in liquid form using alcoholic extract of rosemary

Haniyeh Ramezaninejad¹ and Mohammad Roostaei-Ali Mehr^{2*}

1, 2. Former M. Sc. Student and Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Iran
(Received: Dec. 5, 2016 - Accepted: Feb. 21, 2017)

ABSTRACT

Current experiment was conducted to evaluate the effect of alcoholic extract of rosemary leaves on rooster sperm storage at 4 °C by using eight mature roosters. Semen collection was performed three days' interval in 5 times. In each session, ejaculates were pooled, split into six parts and the amounts of 0 (R0), 10 (R10), 20 (R20), 30 (R30), 40 (R40) and 50 $\mu\text{g/mL}$ (R50) of rosemary extract were added to each part. After that, samples were chilled to 4 °C and kept until 72 h. Sperm viability (by staining Hoechst 33258), motility and functional membrane integrity were evaluated at 0 (T0), 24 (T24), 48 (T48) and 72 h (T72). Concentration of malondialdehyde (MDA) was determined to assay lipid peroxidation by one million spermatozoa at 48 h. The results showed that the concentration of MDA was lower in R50 (0.93 nM) than control (1.15 nM), but, it was higher than R40 (0.82 nM, $P < 0.05$). Membrane integrity and sperm viability were higher in 40 $\mu\text{g/mL}$ rosemary extract (75.72% and 73.56%, respectively) than control (70.6% and 69.08%, respectively) and 10 $\mu\text{g/mL}$ extract (71.56% and 69.72%, respectively; $P < 0.05$). There was interaction between rosemary extract and storage time on sperm motility ($P < 0.05$). After 72 h, sperm motility was higher R40 (46%) than R0 (34%), R10 (35.6%) and R20 (38.8%, $P < 0.05$). Therefore, rosemary extract improves quality of rooster spermatozoa during storage at 4 °C.

Keywords: Lipid peroxidation, rooster, rosemary extract, spermatozoa.

مقدمه

اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی نیازمند مدیریت دقیق تولیدمثل در گله‌های هدف است. در راستای شجره‌دار کردن گله و تولید نتایج بیشتر از والدین انتخاب‌شده، استفاده از روش‌های ذخیره‌سازی منی و تلقیح مصنوعی سبب آسانگری و تسریع در دستیابی به هدف‌های برنامه‌های مورد نظر خواهد شد. پس از ذخیره‌سازی برون تنی منی طیور به‌صورت مایع یا یخ‌زده، کاهش برگشت‌ناپذیر تحرک و تغییرپذیری ریخت‌شناختی و ظاهری (مورفولوژیکی) اسپرم بروز خواهد کرد که این خود یکی از علت‌های توسعه نداشتن فناوری‌های تولیدمثلی مانند تلقیح مصنوعی در پرندگان است (Donoghue & Wishart, 2000). نتایج بررسی‌های چندی نشان می‌دهند که امکان استفاده اسپرم طیور در روش تلقیح مصنوعی پس از ذخیره‌سازی منی به‌صورت سرد در دوره‌های کوتاه (تا ۱۲ ساعت) وجود دارد ولی با افزایش دوره ذخیره‌سازی باروری اسپرم طیور دچار کاهش می‌شود (Blesbois et al., 2005).

گونه‌های فعال اکسیژن در یاخته زنده و تجمع آن در زمان ذخیره‌سازی یاخته امری پرهیزناپذیر است (Kim et al., 2010). گونه‌های فعال اکسیژن به‌عنوان واسطه‌های مهم آسیب‌غشای پلاسمای اسپرم شناخته شده است (Christova et al., 2004). تجمع گونه‌های فعال اکسیژن سبب تخریب پروتئین‌های غشا و کروماتین اسپرم و سرانجام کاهش تحرک و توان باروری اسپرم می‌شود (Zaniboni & Cerolini, 2009). از سوی دیگر تولید میزان اسیدهای چرب غیراشباع موجود در غشاء پلاسمای اسپرم پرندگان بیش از دیگر بافت‌های آن‌هاست (Syrai et al., 1998). بنابراین، به‌نظر می‌رسد پراکسیداسیون چربی‌های غشا اسپرم در فرآیند ذخیره‌سازی این یاخته (در شرایط برون تنی) از جمله علل زوال اسپرم و کاهش باروری آن است (Cecil & Bakst, 1993). البته منی پرندگان واجد سامانه پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) است که می‌تواند برای مدت کوتاهی اسپرم را در برابر گونه‌های آزاد اکسیژن حفظ کند (Breque et al., 2003). یافته‌ها نشان می‌دهد که افزودن پاداکسندها به منی پرندگان برای حفظ کیفیت

اسپرم در زمان ذخیره‌سازی ضروری به‌نظر می‌رسد (Cecil & Bakst, 1993; Sarica et al., 2007).

در سال‌های اخیر، استفاده از پاداکسندهای طبیعی، مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است (Capucho et al., 2012; Aghaei et al., 2014). رزماری یکی از گیاهان دارویی است که قابلیت زیادی در تولید پاداکسندهای طبیعی از خود نشان داده است. گیاه رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* متعلق به خانواده نعنائیان Lamiaceae جز گیاهان دارویی به‌شمار می‌آید. ویژگی‌های پاداکسندگی و ضد باکتریایی و ضد سرطانی این گیاه به‌خوبی مشخص شده است (Del Campo et al., 2000; Ozcan, 2003). این گیاه حاوی ترکیب‌های پاداکسندگی مهم مانند رزمارینیک، کارنوزول و اسید کارنوزیک است (Allen & Hamilton, 1989). با توجه به این یافته‌ها هدف این پژوهش، بررسی عصاره رزماری بر کیفیت و ماندگاری منی خروس در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

برای تهیه عصاره الکلی رزماری در آغاز ۱۰ گرم از برگ‌های تازه گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) گردآوری شده از باغ دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان در فصل بهار با هاون به‌طورکلی خرد شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد به آن اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای اتاق روی شیکر قرار گرفت. برای جدا کردن باقی‌مانده برگ‌ها، در آغاز محلول از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد و سپس به‌مدت سی دقیقه با ۳۸۰۰ g سانتریفیوژ شد. مایع به‌دست‌آمده با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخشی (Rotary evaporator, Switzerland) در دمای ۷۵ درجه سلسیوس تغلیظ و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک شد. به‌منظور حل کردن عصاره خشک الکلی رزماری از (Sigma, USA) DMSO استفاده شد. آزمایش با استفاده از هشت خروس بومی سالم و بارور از استان گیلان با سن شش تا هشت ماه انجام شد. پرندها به‌صورت انفرادی در قفس‌های ۱×۱ متر، در دمایی در حدود ۴-۲۰°C، تحت برنامه نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی

طیف‌سنج نوری (اسپکتوفتومتر) (Biochrome Libra S22, China) در طول موج ۵۳۵ نانومتر تعیین شد. برای تعیین غلظت مالون‌دی‌الدهید منحنی استاندارد با استفاده از تترامتوکسی‌پروپان تهیه شد.

غلظت اسپرم خروس با استفاده از یک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 400$ و یک لام هموسایتومتر تعیین شد. به‌منظور بررسی تحرک پیش‌رونده اسپرم، ۵ میکرولیتر از نمونه رقیق شده روی یک لام قرار داده شده و با گذاشتن یک لامل روی آن تحرک اسپرم با کمک میکروسکوپ فاز کنتراست مجهز به صفحه گرم با بزرگنمایی $\times 400$ توسط یک کاردان کارآموده در پنج میدان دید میکروسکوپی برای هر نمونه تعیین شد. تحرک اسپرم با اختلاف ۱۰ درصد برآورد شد و در انتها میانگین به‌دست‌آمده از این برآوردها به‌عنوان درصد تحرک پیش‌رونده ثبت شد. ارزیابی زنده‌مانی اسپرم با استفاده از رنگ هوخست بیس بنزامید H33258 (AppliChem, Germany) انجام شد (Leeuw *et al.*, 1991). به‌طور خلاصه، پس‌ازاینکه نمونه‌ها به غلظت $10^9 \times 0.3$ اسپرم در میلی‌لیتر رسانده شد، $10 \mu\text{L}$ از این نمونه‌ها با $10 \mu\text{L}$ از محلول رنگ هوخست بیس‌بنزامید ($20 \mu\text{g/mL}$) از هوخست 33258- در بافر سدیم کلرید (0.154 مول) و تری سدیم سیترات (0.15 مول) ($\text{pH}=7$) مخلوط شد و پس از ۳۰ ثانیه در دمای اتاق $5 \mu\text{L}$ از نمونه روی لام قرار داده شده و با گذاشتن لامل روی آن، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus IX70, Japan) و صافی WU با بزرگنمایی $\times 400$ ، عدد اسپرم در شرایط نور بسیار کم بررسی و اسپرم‌های با رنگ آبی به‌عنوان پاسخ منفی (مرده) و اسپرم‌های بدون رنگ به‌عنوان پاسخ مثبت (زنده) در نظر گرفته شدند. برای تعیین میزان سلامت غشای پلاسمایی اسپرم $25 \mu\text{L}$ از نمونه اسپرم با $500 \mu\text{L}$ از محلول هایپواسموتیک (۱ گرم سیترات سدیم در 100 میلی‌لیتر آب مقطر با فشار اسمزی معادل 100 میلی‌اسمول در کیلوگرم، $\text{pH}=7$) مخلوط شد و به مدت سی دقیقه در دستگاه آون با دمای 37°C قرار گرفت. سپس با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی $\times 400$ ، حداقل در پنج میدان دید دوپست عدد اسپرم بررسی شد. اسپرم‌های با دم متورم به‌عنوان

نگهداری شدند. آب به‌صورت آزاد و خوراک (حاوی: $12/7$ درصد پروتئین خام، 2760 kcal/kg انرژی سوخت‌وسازی (متابولیسمی)، $1/2$ درصد کلسیم و $0/4$ درصد فسفر) به میزان روزانه $100-90$ گرم در اختیار پرندوها قرار گرفت. پس از یک هفته عادت‌دهی خروس‌ها، نمونه منی با روش مالش شکمی هر سه روز یک‌بار در پنج نوبت گردآوری شد (Burrows & Quinn, 1937; Buckland *et al.*, 1980). انزال‌ها پس از گردآوری با رقیق‌کننده سکستون (سیترات پتاسیم مونوهیدرات $0/64 \text{ g}$ ، ال-گلوتامات سدیم $8/07 \text{ g}$ ، کلرید منیزیم $0/34 \text{ g}$ ، فروکتوز 5 g ، فسفات دی پتاسیم تری هیدرات $12/7 \text{ g}$ ، فسفات مونو پتاسیم $0/65 \text{ g}$ ، TES $3/95$ ، استات سدیم $4/3 \text{ g}$ در یک لیتر آب مقطر و $\text{pH}=7/4$) به نسبت ۱ به ۲ رقیق شده و بی‌درنگ درون فلاسکی حاوی آب 39°C به دور از نور و تکان شدید به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه در آغاز غلظت و تحرک پیش‌رونده هر نمونه تعیین شد و بر پایه آن نمونه‌هایی با غلظت کمتر از 3×10^9 اسپرم/mL و تحرک پایین‌تر از ۷۰ درصد از آزمایش حذف شدند. با رقیق‌کننده سکستون محلول $100 \mu\text{g/mL}$ عصاره الکلی رزماری تهیه و از فیلتر $0/2 \mu\text{m}$ عبور داده شد. نمونه‌های منی تجمع‌شده به شش بخش مساوی تقسیم و میزان ۰ (R0)، ۱۰ (R10)، ۲۰ (R20)، ۳۰ (R40)، ۴۰ و ۵۰ (R50) میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره الکلی رزماری به هر بخش اضافه شد. غلظت نهایی اسپرم نمونه‌ها برابر 2×10^9 در میلی‌لیتر بود. سپس نمونه‌ها به کمک دستگاه آزمون چمبر (Kaito, Japan) با سرعت $0/25$ درجه در دقیقه تا 4°C سرد شد و به مدت ۷۲ ساعت در این دما ذخیره شد. تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها در ساعت ۰ (T0)، ۲۴ (T24)، ۴۸ (T48) و ۷۲ (T72) ذخیره‌سازی اندازه‌گیری شد. به‌منظور تعیین میزان پراکسیداسیون چربی‌ها اسپرم پس از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی، میزان 100 میکرولیتر از نمونه‌ها (که حاوی اسپرم $10^9 \times 0/2$ بود) برداشت شد و بر پایه روش (Kumaresan *et al.*, 2008) آماده شد. سپس غلظت مالون‌دی‌الدهید ($\mu\text{M/mL}$) بر پایه روش (Buege & Aust, 1978) به کمک دستگاه

نتایج این بررسی نشان داد که افزودن عصاره الکلی رزماری به منی خروس سبب کاهش تولید میزان MDA در روند ذخیره‌سازی اسپرم در دمای ۴ °C می‌شود. بررسی‌ها نشان داده است، استفاده از عصاره رزماری در نگهداری منی قوچ و خوک سبب کاهش تولید MDA می‌شود (Malo *et al.*, 2011; Khodaei Motlagh *et al.*, 2014). در دماهای نزدیک صفر روند سوخت‌وساز انرژی یاخته کند می‌شود ولی متوقف نمی‌شود، لذا تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط میتوکندری‌ها حتی در دماهای زیر دمای اتاق نیز ادامه خواهد یافت (Storey, 2008). نتیجه تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن، پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع یاخته و تولید مالون‌دی‌آلدهید است (Aitken, 1995). به همین دلیل مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی وضعیت اکسایش - احیا (Redox) یاخته استفاده می‌شود (Aitken *et al.*, 2004). عصاره الکلی رزماری حاوی ترکیب‌های فنولیک مانند: کارنوزول، کارنوزیک اسید، رزمارینیک اسید و رزمانول که ویژگی پاداکسنده قوی هستند (Erkan *et al.*, 2008). کارنوزیک اسید بیشترین تأثیر پاداکسنده را در میان دیگر ترکیب‌های فنولیک دارد. گزارش شده است که کارنوزیک اسید می‌تواند در شرایط تنش اکسایشی (اکسیداتیو)، پراکسیداسیون لیپیدی را بین ۸۸ تا ۱۰۰ درصد کاهش دهد. (Huang *et al.*, 1996). بنابراین، عصاره الکلی رزماری می‌تواند به‌عنوان یک پاداکسنده مؤثر سبب مهار پراکسیداسیون لیپیدی در روند ذخیره‌سازی اسپرم به شمار آید.

نتایج نشان دادند، با افزایش میزان عصاره هیدروالکلی رزماری غلظت MDA کاهش یافت ولی غلظت MDA در تیمار R40 کمتر از R50 بود. نتایج همسانی در آزمایش‌های انجام‌شده با عصاره الکلی رزماری (González *et al.*, 2010)، پاداکسنده‌های گیاهی مانند عصاره علف چشمه (Roostaeei-Ali & Mehr & Adishi, 2015)، روغن‌زیتون (Al-Daraji, 2012) و عصاره چای سبز (Chung *et al.*, 2001) مشاهده شده است. عملکرد بهینه پاداکسنده‌ها در غلظت‌های معینی رخ می‌دهد و در صورت افزایش زیاد غلظت، عملکرد آن‌ها معکوس شده (به‌صورت پرواکسیدان عمل کرده) و سبب القای اکسایش

پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌های با دم بدون تورم به‌عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی ناسالم) در نظر گرفته شدند.

نتایج به‌دست‌آمده از تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در قالب طرح کامل تصادفی و به‌صورت داده‌های تکرار شده در زمان با استفاده از نرم‌افزار SAS و رویه Mixed تجزیه شدند. نتایج به‌دست‌آمده از غلظت MDA در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS و رویه GLM تجزیه شد. نتایج به‌صورت میانگین حداقل مربعات و خطای معیار (LSMean±SE) ارائه و سطوح معنی‌داری در سطح ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج تأثیر عصاره الکلی رزماری بر پراکسیداسیون چربی اسپرم خروس طی ذخیره‌سازی در ۴ °C در جدول ۱ نشان داده شده است. استفاده از عصاره الکلی رزماری به میزان R20 و بیشتر سبب کاهش غلظت MDA شد. پراکسیداسیون چربی در تیمار R40 در حد مطلوب‌تری بود.

جدول ۱. تأثیر عصاره الکلی رزماری بر پراکسیداسیون چربی اسپرم (سلول 10×10^6) پس از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی در ۴ °C

Table 1. Effect of alcoholic extract of rosemary on sperm (10×10^6 cell) lipid peroxidation after 48 h storage at 4 °C

Rosemary* (µg/mL)	Concentration of malondialdehyde (nM)
R0	1.15 ± 0.03 ^c
R10	1.09 ± 0.03 ^{de}
R20	1.02 ± 0.03 ^{cd}
R30	0.91 ± 0.03 ^{ab}
R40	0.82 ± 0.03 ^a
R50	0.93 ± 0.03 ^{bc}

* R0: 0 µg/mL عصاره الکلی رزماری، R10: 10 µg/mL عصاره الکلی رزماری، R20: 20 µg/mL عصاره الکلی رزماری، R30: 30 µg/mL عصاره الکلی رزماری، R40: 40 µg/mL عصاره الکلی رزماری، R50: 50 µg/mL عصاره الکلی رزماری.

a-e: حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار است ($P < 0.05$)

* R0: 0 µg/mL alcoholic rosemary extract; R10: 10 µg/mL alcoholic rosemary extract; R20: 20 µg/mL alcoholic rosemary extract; R30: 30 µg/mL alcoholic rosemary extract; R40: 40 µg/mL alcoholic rosemary extract; R50: 50 µg/mL alcoholic rosemary extract.

a-e) Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

است (Saemi et al., 2012; Ommati et al., 2012). ماده اصلی تشکیل‌دهنده غشای پلاسمایی اسپرم چربی است و پراکسیداسیون چربی‌های غشا پلاسمایی در نتیجه تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از سوخت‌وساز سبب اختلال در استحکام و عملکرد غشا و همچنین باعث کاهش زنده‌مانی و باروری اسپرم می‌شود (Cerolini et al., 2006). مشخص شده است، در روند عمل‌آوری منی افزودن پاداکسنده‌های گیاهی سبب کاهش پراکسیداسیون چربی و حفظ کیفیت اسپرم می‌شود (Slamenova et al., 2011). به دلیل وجود مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع در غشای اسپرم وجود ترکیب‌های پاداکسنده‌گی برای خنثی‌سازی تأثیر رادیکال‌های آزاد اکسیژن در رقیق‌کننده منی ضروری است (Bansal & Bilaspuri, 2011). بنابراین، عصاره الکلی رزماری به‌عنوان یک پاداکسنده طبیعی به‌احتمال مانع از اثرگذاری زیان‌بار رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر غشاء پلاسمایی اسپرم می‌شود.

نتایج تأثیر مستقل عصاره الکلی رزماری بر تحرک پیش‌رونده اسپرم نشان داد، این فراسنجه در سطح R40 و R50 از سطح R0، R10 و R20 عصاره الکلی رزماری بیشتر بود (جدول ۲، $P < 0.05$). اثر متقابل عصاره الکلی رزماری و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک پیش‌رونده اسپرم خروس معنی‌دار بود (شکل ۱، $P < 0.05$). تحرک اسپرم در تیمار R40 در زمان‌های T24، T48 و T72 (به ترتیب) $0.74/6 \pm 1/54$ ، $0.62/8 \pm 1/54$ ، $0.46/10 \pm 1/56$ (مطلوب‌تر از دیگر تیمارها بود).

نتایج نشان می‌دهند، اگرچه در ساعت‌های اولیه ذخیره‌سازی تحرک پیش‌رونده اسپرم تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند، ولی با گذشت زمان تحرک پیش‌رونده در تیمارهای حاوی عصاره الکلی رزماری به‌ویژه تیمار R40 بهتر بود. بنابراین، به نظر می‌رسد افزودن ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره الکلی رزماری به منی خروس سبب بهبود تحرک پیش‌رونده اسپرم خروس طی ذخیره‌سازی در دمای ۴ درجه سلسیوس می‌شود. مشخص شده است، استفاده از اسانس رزماری در روند انجماد و یخ‌گشایی منی خروس به میزان ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تأثیر

می‌شوند (Cao & Cutler, 1993). پرواکسیدان‌ها می‌توانند با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و یا با مهار سامانه پاداکسنده‌گی یاخته سبب ایجاد تنش اکسایشی شوند (Sergedienęa et al., 1999). بنابراین به‌نظر می‌رسد میزان ۴۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره الکلی رزماری بهترین تأثیر حفاظتی را در روند ذخیره‌سازی اسپرم به‌صورت مایع داشته باشد.

نتایج نشان داد، تأثیر مستقل عصاره الکلی رزماری و زمان ذخیره‌سازی بر زنده‌مانی و سلامت غشا پلاسمایی اسپرم خروس معنی‌دار بود (جدول ۲، $P < 0.05$). اثر متقابل عصاره الکلی رزماری و زمان ذخیره‌سازی بر زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم خروس معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). سلامت غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم در سطح R40 و R50 از سطح R0 و R10 بیشتر بود ($P < 0.05$). بیشترین و کمترین سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی اسپرم به ترتیب زمان T0 و T72 مشاهده شد ($P < 0.05$).

نتایج نشان داد، افزودن عصاره الکلی رزماری به منی خروس طی ذخیره‌سازی منی به‌صورت مایع در سرما سبب بهبود زنده‌مانی و سلامت غشا پلاسمایی اسپرم شد. گزارش شده است، افزودن اسانس رزماری به منی خروس سبب بهبود کیفیت اسپرم در روند انجماد و یخ‌گشایی می‌شود (Shafigh et al., 2016). همچنین، ۴ و ۶ درصد عصاره آبی رزماری و به منی قوچ و استفاده از رقیق‌کننده حاوی لسیتین سویا سبب بهبود سلامتی غشا اسپرم در فرآیند انجماد و یخ‌گشایی می‌شود (Khodaei Motlagh et al., 2014). همچنین، افزودن ۴ درصد عصاره رزماری به منی بز اثرگذاری مثبتی بر سلامت غشای و زنده‌مانی اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی داشته است (Zanganeh et al., 2013). افزون بر این، استفاده از ۱۰ گرم پودر برگ خشک رزماری در ۱۰۰ در میلی‌لیتر رقیق‌کننده انجماد اسپرم خوک با نتایج رضایت‌بخشی همراه بوده است (Malo et al., 2011). استفاده از دیگر پاداکسنده‌های گیاهی مانند پودر خشک تفاله گوجه‌فرنگی و عصاره مریم‌گلی در جیره غذایی، نتایج همسانی در شاخص‌های منی خروس به‌دست آمده

داده است، افزودن پاداکسندهای ساختگی مانند ویتامین E به منی نیز سبب افزایش نرخ تحرک، درصد اسپرم زنده و باروری اسپرم در پی نگهداری برون تنی شده است (Long & Kramer, 2003; Tabatabaei *et al.*, 2011).

مثبت بر تحرک اسپرم دارد (Shafigh *et al.*, 2016). بررسی‌های انجام‌شده با استفاده از افزودن عصاره رزماری به منی دیگر دام‌ها با نتایج همسانی همراه بود (Zanganeh *et al.*, 2013; Khodaei Motlagh *et al.*, 2014). همچنین گزارش‌ها نشان

جدول ۲. تأثیر مستقل عصاره الکلی رزماری و زمان ذخیره‌سازی بر زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی و تحرک اسپرم

Table 2. Main effect of alcoholic extract of rosemary and storage time on sperm viability, membrane integrity and motility

Treatment*	Progressive motility (%)	Viability (%)	Membrane integrity (%)
R0	58.35 ± 0.77 ^e	69.08 ± 0.82 ^d	70.60 ± 0.81 ^d
R10	59.40 ± 0.77 ^{de}	69.72 ± 0.82 ^{cd}	71.56 ± 0.81 ^{cd}
R20	61.20 ± 0.77 ^{cd}	70.82 ± 0.82 ^{bcd}	73.12 ± 0.81 ^{bc}
R30	63.30 ± 0.77 ^{bc}	72.07 ± 0.82 ^{ab}	73.88 ± 0.81 ^{ab}
R40	65.75 ± 0.77 ^a	73.56 ± 0.82 ^a	75.72 ± 0.81 ^a
R50	73.69 ± 0.81 ^{ab}	71.95 ± 0.82 ^{abc}	73.69 ± 0.81 ^{abc}
T0	79.07 ± 0.63 ^a	89.29 ± 0.67 ^a	90.18 ± 0.66 ^a
T24	71.20 ± 0.63 ^b	79.46 ± 0.67 ^b	80.43 ± 0.66 ^b
T48	57.97 ± 0.63 ^c	66.25 ± 0.67 ^c	69.44 ± 0.66 ^c
T72	39.97 ± 0.63 ^d	49.81 ± 0.67 ^d	52.33 ± 0.66 ^d
P-value			
Alcoholic extract of rosemary (R)	<0.01	<0.01	<0.01
Storage time (T)	<0.01	<0.01	<0.01
R × T	<0.05	NS [†]	NS

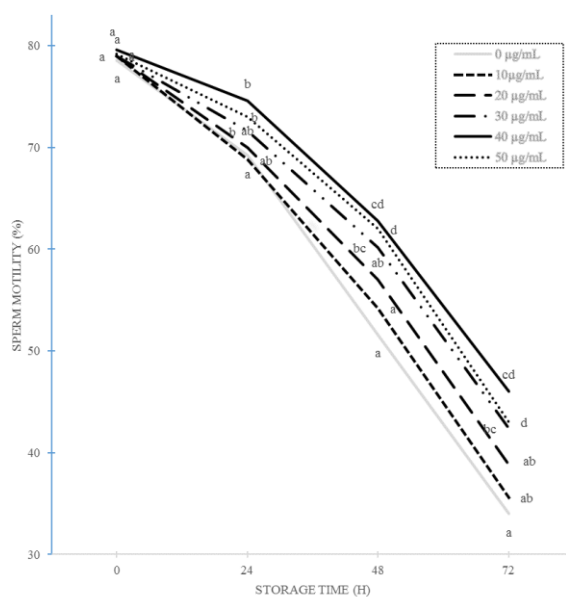
* R0: 0 µg/mL alcoholic rosemary extract; R10: 10 µg/mL alcoholic rosemary extract; R20: 20 µg/mL alcoholic rosemary extract; R30: 30 µg/mL alcoholic rosemary extract; R40: 40 µg/mL alcoholic rosemary extract; R50: 50 µg/mL alcoholic rosemary extract; T0: evaluation after 0 h; T24: evaluation after 24 h; T48: evaluation after 48 h; T72: evaluation after 72 h.
 † ns: not significant
 NS[†]: بدون تفاوت معنی‌دار

a-e: حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار است (P<0.05)

* R0: 0 µg/mL alcoholic rosemary extract; R10: 10 µg/mL alcoholic rosemary extract; R20: 20 µg/mL alcoholic rosemary extract; R30: 30 µg/mL alcoholic rosemary extract; R40: 40 µg/mL alcoholic rosemary extract; R50: 50 µg/mL alcoholic rosemary extract; T0: evaluation after 0 h; T24: evaluation after 24 h; T48: evaluation after 48 h; T72: evaluation after 72 h.

† ns: not significant

a-e) Different superscripts show significant differences.



شکل ۱. اثر متقابل عصاره الکلی رزماری و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک پیش‌رونده خروس طی ذخیره‌سازی در ۴ °C

Figure. 1 Interaction effect of alcoholic extract of rosemary and storage time on sperm motility during incubation at 4°C. a-d) Different superscripts show significant differences (P<0.05).

زین‌بار رادیکال‌های آزاد بر تحرک اسپرم می‌شوند. بنابراین، اجزای پاداکسنده موجود در عصاره الکلی رزماری مانند کارنوسیک اسید و اورسولیک اسید با پشتیبانی از سامانه پاداکسندگی درون‌یاخته‌ای به‌احتمال نقش مهمی در جلوگیری از پراکسیداسیون چربی اسپرم و حفظ سازوکار حرکت اسپرم دارند.

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این تحقیق نشان داد، افزودن پاداکسنده‌های طبیعی مانند عصاره الکلی رزماری (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به منی در هنگام ذخیره‌سازی، از راه کاهش پراکسیداسیون چربی سبب بهبود کیفیت اسپرم خروس می‌شود.

تحرک اسپرم یکی از ویژگی‌های مهم در ارزیابی کیفیت اسپرم در آزمایشگاه به‌شمار می‌آید (Wierzbowski *et al.*, 1993). گزارش‌های پیشین نشان داده‌اند، رابطه‌ای منفی بین تولید MDA و تحرک و زنده‌مانی و عملکرد اسپرم وجود دارد (Guthrie & Welch 2012). به‌نظر می‌رسد، علت اصلی کاهش تحرک اسپرم در زمان تجمع مواد سمی ناشی از پراکسیداسیون چربی ناشی از تخریب ساختار بخش مرکزی آکسونم تاژک و کاهش تولید ATP توسط متیوکندری‌ها باشد (Armstrong *et al.*, 1999; Sanocka & Kurpisz, 2004). سازوکارهای پاداکسندگی درون‌یاخته‌ای مانند گلوتاتیون، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز با حذف گونه‌های آزاد اکسیژن بازدارنده اثرگذاری

REFERENCES

1. Aghaei, S., Nikzad, H., Taghizadeh, M., Tameh, A. A., Taherian, A. & Moravveji, A. (2014). Protective effect of Pumpkin seed extract on sperm characteristics, biochemical parameters and epididymal histology in adult male rats treated with Cyclophosphamide. *Andrologia*, 46, 927-928.
2. Aitken, R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7, 659-668.
3. Aitken, R. J., Ryan, A. L., Baker, M. A. & Mclaughlin, E. A. (2004). Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 994-1010.
4. Al-Daraji, H. J. (2012). Adding olive oil to rooster semen diluents for improving semen quality and storage ability during liquid storage. *Baltic Journal of Comparative and Clinical Systems Biology*, 42, 3-11.
5. Allen, J. C. & Hamilton, R. J. (1989). *Rancidity in Foods*. (2nd ed.). New York.
6. Bansal, A. K. & Bilaspuri, G. S. (2011) Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, 2011, 1-7.
7. Armstrong, J. S., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W. J. & Sikka, S. C. (1999). Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 869-880.
8. Aurich, J. E., Schonherr, U., Hoppe, H. & Aurich, C., (1997). Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, 48, 185-92.
9. Blesbois, E., Grasseau I. & Seigneurin, F. (2005). Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction*, 129, 371-378.
10. Breque, C., Surai, P. & Brillard, J. P. (2003). Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 66, 314-323.
11. Buckland, R. B., Scott, T. A. & Ansah, G. A. (1980) Genetic and environmental variation in semen production and fertility of chickens and turkeys. In: proceeding of the 9th congress on animal reproduction and artificial insemination, 16-20 Jun., Spanish Ministry of Agriculture, International Veterinary Association for Animal Production, Madrid. Spain, pp. 535-545.
12. Buege, J. A. & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology*, 52, 302-310.
13. Burrows, W. H. & Quinn, J. P. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, 16, 19-24.
14. Cao, G. & Cutler, R. G. (1993). High concentrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. *Archives Gerontology Geriatrics*, 17, 189-201.
15. Capucho, C., Sette, R., de Souza Predes, F., De Castro Monteiro, J., Pigoso, A. A., Barbieri, R., Dolder, M. A. & Severi Aguiar, G. D. (2012). Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3956-3962.
16. Cecil, H. C. & Bakst, M. R. (1993). In vitro peroxidation of turkey spermatozoa. *Poultry Science*, 72, 1370-1378.

17. Cerolini, S., Zainiboni, L., Maldjian, A. & Gliozzi, T. (2006). Effect of docosahexaenoic acid and α -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*, 66, 877-886.
18. Christova, Y., James, P. S. & Jones, R. (2004). Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. *Molecular Reproduction and Development*, 68, 365-372.
19. Chung, L. Y., Cheung, T. C., Kong, S. K., Fung, K. P., Choy, Y. M., Chan, Z. H. & Kwok, T. T. (2001). Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life Sciences*, 68, 1207-1214.
20. Del Campo, J., Amiot, M. J. & Nguyen, C. (2000). Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 63, 1359-1368.
21. Donoghue A.M. & Wishart, G.J. (2000). Storage of poultry semen. A review. *Animal Reproduction Science*, 62, 213-232.
22. Erkan, N., Ayranci, G. & Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110, 76-82.
23. González, N., Gil, L., Martínez, F., Malo, C., Cano, R., Mur P. & Espinosa, E. (2010). Effect of natural antioxidant rosemary in canine soya freezing extender. *Reproduction in Domestic Animal*, 87-88.
24. Guthrie, H.D. & Welch, G.R. (2012). Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*, 78, 1700-1708.
25. Huang, S.W., Frankel, K., Schwarz, R., Aeschbach R. & German, J.B. (1996). Anti-oxidant activity of carnosic acid and methyl carnosate in bulk oils and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2951-2956.
26. Khodaei Motlagh, M., Sharafi, M., Zhandi, M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Soleimani M. & Zeinoaldini, S. (2014). Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze–thawing process of ram sperm. *Cryobiology*, 69, 217-222.
27. Kim, S. H., Yu, D. H. & Kim, Y. J. (2010). Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology*, 73, 282-292.
28. Kumaresan, A., Kadirvel, G., Bujarbaruah, K.M., Bardoloi, R.K., Das, A., Kumar, S. & Naskar S. (2008) Preservation of boar semen at 18 °C induces lipidperoxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 110, 162-171
29. Leeuw, A. M., Daas, G. H. J. & Woelders, H. (1991). The fix vital stain method simultaneous determination of viability and acrosomal and status of bovine spermatozoa. *Journal of Andrology*, 12, 112-118.
30. Long, J.A. & Kramer, M. (2003). Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. *Poultry Science*, 82, 1802-1807.
31. Roostaei-Ali Mehr, M. & Adishi, B. (2015) Effect of Watercress extract on rooster semen during storage at 4°C. *Animal Production Research*, 4, 15-24. (in Farsi)
32. Malo, C., Gil, L., Cano, R., Martínez F. & Gale, I. (2011). Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, 75, 1735-1741.
33. Ommati, M.M., Zamiri, M.J., Akhlaghi, A., Atashi, H., Jafarzadeh, M.R., Rezvani, M.R. & Saemi, F. (2013). Seminal characteristics, sperm fatty acids, and blood bio-chemical attributes in breeder roosters orally administered with sage (*Salvia officinalis*) extract. *Animal Production Science*, 53, 548-554.
34. Ozcan, M. (2003). Antioxidant activities of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. *Journal of Medicinal Food*, 6, 267-270.
35. Saemi, F., Zamiri, M. J., Akhlaghi, A., Niakousari, M., Dadpasand, M. & Ommati, M. M. (2012). Dietary inclusion of dried tomato pomace improves the seminal characteristics in Iranian native roosters. *Poultry Science*, 91, 2310-2315.
36. Sanocka, D. & Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2, 1-7.
37. Sarica S., Corduk, M., Suicmez, M., Cedden, F., Yildirim M. & Kilinc, K. (2007). The effects of dietary L-carnitine supplementation on semen traits, reproductive parameters, and testicular histology of Japanese quail breeders. *The Journal of Applied Poultry Research*, 16, 178-186.
38. Sergedieneça, E., Jonssonb, K., Szymusiakc, H. & Tyrakowskac, B. (1999). Description of quantitative structure-activity relationships prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells. *FEBS Letters*, 462, 392-396.
39. Shafigh, H., Shakeri, M., Zeinoaldini, S., Kohram, H., Zhandi, M. & Moghbeli, M. (2016) Improving sperm cryopreservation of rooster by using rosemary alcoholic essential oil. *Journal Animal Production*, 18, 615-624. (in Farsi)

40. Slamenova, D., Horvathova, E., Kovacikova, Z., Kozics, K. & Hunakova, L. (2011). Essential rosemary oil protects testicular cells against DNA-damaging effects of H₂O₂ and DMNQ. *Food Chemistry*, 129, 64-70.
41. Storey, B. T. (2008). Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *International Journal of Developmental Biology*, 52, 427-437.
42. Syrai, P. E., Cerrolini, S., Wishart, G. J., Speake, B. K., Noble, R. C. & Sparks, N. H. C. (1998). Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Poultry Avian Biology*, 9, 11-23.
43. Tabatabaei, S., Batavani, R. & Ayen, E. (2011). Effects of Vitamin E addition to chicken semen on sperm quality during in vitro storage of semen. *Veterinary Research Forum*, 2, 103-111.
44. Wierzbowski, S. & Kareta, W. (1993). An assessment of sperm motility estimation for evaluation in rams. *Theriogenology*, 40, 205-209.
45. Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneh, A., Najafi, A., Mahdi Nabi, M. & Mohammadi-Sangcheshmeh, A. (2013). Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? *Small Ruminant Research*, 114, 120-125.
46. Zaniboni, L. & Cerolini, S. (2009). Liquid storage of turkey semen: Changes in quality parameters, lipid composition and susceptibility to induced in vitro peroxidation in control, n-3 fatty acids and alpha-tocopherol rich spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 112, 51-65.