تولیدات دامی
دوره ۲٤ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱٤۰۱
صفحه‌های ۲٤٦-۲۳۷
DOI: 10.22059/jap.2022.333224.623653

مقاله پژوهشی

تأثیر افزودن پودر برگ رزماری به جیره خروس روی فراسنجه‌های منی و نرخ آسیب DNA تحت شرایط تنش گرمایی

طیبه امیدوار[۱]، سعید محمدزاده[۲*]، مسیب امیری[۳]
۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.
۲. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.
۳. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۸/۰۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۲۱

چکیده

تأثیر پودر برگ رزماری روی فراسنجه‌های منی و نرخ آسیب DNA تحت شرایط تنش گرمایی با استفاده از ٤۰ قطعه خروس بومی در سن ٤۲ هفته و وزن ۲۳۰۰ گرم در قالب آزمایش فاکتوریل ۲×۲ طرح بلوک کامل تصادفی با دو سطح درجه حرارت (طبیعی و تنش گرمایی) و دوسطح پودر رزماری (بدون رزماری و ۷/۵ گرم پودر رزماری در کیلوگرم جیره) به‌مدت هفت هفته بررسی شد. دمای سالن در شرایط طبیعی ۲۲-۱۸ و در تنش گرمایی ۲±۲۸ درجه سلسیوس تنظیم شد. بعد از دو هفته عادت‌پذیری، به‌مدت پنج هفته، هر هفته دوبار از طریق ماساژ شکمی- پشتی، از پرندگان نمونه منی گرفته شد. نمونه‌های منی، از نظر فراسنجه‌های تحرک، زنده‌مانی و نرخ قطعه‌قطعه‌شدن DNA اسپرم ارزیابی شدند. نتایج نشان داد درجه حرارت تنش‌زا کاهش معنی‌داری روی حرکت پیش‌رونده (نوع A) ایجاد کرد و با افزودن پودر رزماری، زنده‌مانی اسپرم افزایش یافت (P<۰/۰۵). افزودن پودر رزماری در دمای طبیعی نرخ قطعه‌قطعه‌شدن DNA را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. در خروس‌های تحت تنش گرمایی، نرخ قطعه-قطعه‌شدن DNA اسپرم به‌طور بسیار معنی‌داری افزایش یافت و با مصرف پودر رزماری نرخ آسیب کاهش یافت (P<۰/۰۱). براساس نتایج حاصل از این پژوهش، افزودن پودر گیاه رزماری به جیره خروس‌های مسن بومی در شرایط تنش حرارتی، می‌تواند برخی صفات تولید مثلی را بهبود بخشد.

کلیدواژه‌ها: تنش گرمایی، خروس، رزماری، زنده‌مانی، قطعه‌قطعه‌شدن DNA اسپرم.

The effect of addition of Rosemary leaf powder in rooster diet on semen parameters and DNA damage under heat stress

Tayebe Omidvar[1], Saeid Mohammadzadeh[2*], Mosayeb Amiri [3]
1. Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Collage of Agriculture, Lorestan University, Khorram Abad, Iran.
2. Associate Professor , Department of Animal Science, Collage of Agriculture, Lorestan University, Khorram Abad, Iran.
3. Assistant Professor , Department of Basic Sciences, Veterinary Medicine College, Shiraz University, Shiraz, Iran.
Received: October 30, 2021 Accepted: March 12, 2022

Abstract

To investigate the effect of rosemary powder on semen parameters and DNA fragmentation under heat stress, 40 native rooster aged 42 weeks and weighted of 2300 grams were used in a factorial experiment in randomized complete block design with two levels of temperature (normal and heat stress) and rosemary powder (0 and 7.5 gr/kg of diet) during 7 weeks. Heat stress and normal temperature was set 28±2^{oC} and 18-22° C, respectively. After two weeks adaptation, the semen samples were collected twice in a week from roosters during 5 weeks using dorso-abdominal massage method. The semen parameters including motility, viability ratio and DNA fragmentation were evaluated. The results showed that heat stress significantly reduced the progressive motility of sperm (type A) and with the addition of rosemary powder, sperm viability increased (P<0.05). Addition of rosemary leaf powder at normal temperature decreased the DNA fragmentation ratio (P<0.05). In roosters under heat stress, the DNA fragmentation rate of sperm increased and the damage rate decreased significantly with the feeding of rosemary powder (P<0.01). According to the results of this study, adding rosemary powder to the diet of native old roosters under heat stress conditions can improve some reproductive traits

Keywords: DNA fragmentation of sperm, Heat stress, Rooster, Rosemary, Viability.

* نویسنده مسئول
Email: Mohammadzadeh.s@lu.ac.ir

مقدمه

در تغییرات فیزیولوژیکی تنش گرمایی، رادیکال‌های آزاد افزایش و غلظت آنتی‌اکسیدان‌هایی از قبیل ویتامین A، C و E همراه با عناصری مانند روی و منیزیم کاهش می‌یابد [۱۱]. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که قرارگرفتن حیوان در معرض گرمای بالا، ویژگی‌های سوخت‌وساز بدن را تحت تأثیر قرار داده و باعث آسیب اکسیداتیو در پرندگان می‌شود [٤]. تنش اکسیداتیو به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم باعث آسیب به DNAی اسپرم می‌شود و ارزیابی قطعه‌قطعه‌شدن DNAی اسپرم (DNA Fragmentation) شاخصی برای نشان‌دادن آسیب به هسته اسپرم است که به‌نوبه خود، سبب کاهش قدرت باروری اسپرمو کیفیت جنین‌های حاصل، کاهش رشد جنین و افزایش سقط جنین می‌شود [۲۱]. عدم تعادل بین تولید گونه‌های اکسیژن فعال و آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن منجر به آسیب DNA و قطعه‌قطعه‌شدن DNAی اسپرم می‌شود. تنش گرمایی و به‌دنبال آن تنش اکسیداتیو می‌تواند زمینه را برای قطعه‌قطعه‌شدن DNA اسپرم مهیا نموده، از فشرده‌شدن کروماتین جلوگیری و به‌دنبال آن مرگ برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) را در سلول‌های جنسی القا نماید [۹]. اسپرم‌هایی که حساسیت بالاتری نسبت به قطعه‌قطعه‌شدن DNA دارند، در شرایط تنش اکسیداتیو به‌سرعت متحمل آسیب کروماتینی می‌شوند [۱۸] بنابراین تنش گرمایی می‌تواند یکی از علل کاهش باروری خروس‌ها باشد.

از راه‌کارهای پیشنهادی در کاهش تنش گرما که به‌تازگی توجه پژوهش‌گران در سراسر دنیا به خود جلب نموده، استفاده از گیاهان دارویی است. مطالعات زیادی در مورد بررسی خواص گیاهان دارویی و توجه به اثرات درمانی آن‌ها انجام‌شده است و در همه این مطالعات پژوهش‌گران سعی کرده‌اند که از طریق بهره‌گیری از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این گیاهان، اثرات مضر تنش گرمایی را در باروری طیور و سایر دام‌های مزرعه کاهش دهند. گیاه رزماری یا اکلیل‌کوهی با نام علمی *Rosemarinus officinalis*، از خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*)، به‌عنوان گیاه دارویی و معطر و به‌دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی در صنایع غذایی و داروسازی استفاده می‌شود [٢٤]. مطالعه پژوهش‌گران نشان داد که استفاده از عصاره رزماری در موش قادر است سطح کلسترول پلاسما و قند خون را در حالت ناشتا کاهش دهد. هم‌چنین عصاره رزماری غنی از اسید کارنوسیک، می‌تواند با کاهش کلسترول در پیشگیری اختلالات متابولیک مورداستفاده قرار گیرد. مطالعات نشان داد که ترکیبات فنولیک رزماری باعث کاهش تنش اکسیداتیو در موش با سطح بالای کلسترول خون (هیپرکلسترولمی) می‌شود [۱]. هم‌چنین در آزمایشی، مصرف رزماری، زنده‌مانی، تحرک و کیفیت اسپرم خوک را بهبود بخشید [۱۰]. افزودن اسانس رزماری در جیره بلدرچین‌های ژاپنی در شرایط تنش گرمایی، موجب کاهش پراکسیداسون لیپیدی اسپرم و افزایش فعالیت اسپرماتوژنز در بیضه شد [۲۰]. افزودن اسانس رزماری به منی خروس سبب بهبود کیفیت اسپرم در روند انجماد و یخ‌گشایی شد [۱۷]. به‌علاوه تغذیه خروس‌های مادر گوشتی مسن با پودر برگ رزماری به‌طور معنی‌داری تحرک و باروری اسپرم را بهبود داد [۲۲]. با وجود تأثیر عصاره رزماری در فراسنجه‌های منی در انسان و گونه‌های مختلف حیوانی، پژوهشی درخصوص تأثیر تغذیه پودر برگ رزماری روی فراسنجه‌های منی در شرایط تنش گرمایی در خروس، صورت نگرفته است. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات پودر برگ رزماری روی فراسنجه‌های منی و کیفیت DNA اسپرم در شرایط تنش گرمایی در خروس‌های بومی بود.

مواد و روش‌ها

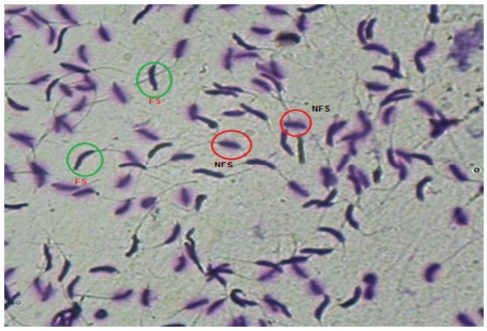
جهت انجام پژوهش، ٤٠ قطعه خروس نژاد بومی اصفهان در سن ٤٢ هفتگی با میانگین وزن ۰/۱± ۲/۳ کیلوگرم پس از تأیید سلامت بالینی و باروری انتخاب شد. خروس‌ها در قالب آزمایش فاکتوریل طرح بلوک کاملاً تصادفی با دو عامل درجه حرارت در دو سطح ۲۲–۱۸ درجه سلسیوس و تنش گرمایی ۳۰–۲۸ درجه سلسیوس و پودر رزماری در دو سطح بدون رزماری و مقدار ۷/۵ گرم پودر رزماری در کیلوگرم جیره خوراکی در ۱۰ بلوک آزمایشی تقسیم‌بندی شدند. خروس‌ها به‌مدت هفت هفته (یک هفته دوره عادت‌پذیری) در دو نوبت صبح و عصر تغذیه شدند. برنامه نوری ١٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی با ترموستات اتوماتیک اعمال شد. به‌منظور عادت‌پذیری خروس‌ها جهت اسپرم دهی، هر هفته دو نوبت ماساژ پشتی–شکمی اعمال شد. پس از عادت‌پذیری، نمونه‌های منی در میکروتیوپ جمع‌آوری و سپس به انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس انتقال داده شد. ابتدا ارزیابی اولیه از نظر غلظت و تحرک، انجام و سپس برای حذف اثرات انفرادی هر تیمار، نمونه‌های منی با هم مخلوط و نمونه آزمایشگاهی تهیه شد.

فراسنجه‌های مربوط به تحرک منی خروس‌ها توسط میکروسکوپ نوری مجهز به سیستم نرم‌افزاری کاسا (مدل Pro.Way، چین) بررسی شد. به‌طور خلاصه سیستم کاسا با برنامه تشخیص اسپرم خروس ۳۰ فریم با حداقل کنتراست ۵۰، حداقل میانگین سرعت پنج میکرومتر در ثانیه، حداقل سرعت خطی شش میکرومتر در ثانیه و سر غیرمتحرک هفت پیکسل با شدت ۹۵ کالیبره شد. پس از افزودن نمونه منی در زیر میکروسکوپ، حداقل پنج میدان دید انتخاب و فراسنجه‌های مختلف حرکتی با استفاده از میکروسکوپ مجهز به دوربین اندازه‌گیری شد.

نرخ زنده‌مانی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین–نیگروزین ارزیابی شد [۱۱]. ابتدا یک حجم از نمونه منی و دو حجم از محلول ائوزین–نیگروزین در میکروتیوپ مخلوط و پس از ۳۰ ثانیه در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد، سپس از نمونه گسترش (اسمیر) تهیه شد. پس از خشک‌شدن، با استفاده از میکروسکوپ نوری اولمپوس (مدل CX21FS1، ژاپن) تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش و نسبت درصد اسپرم در گروه‌های مختلف محاسبه شد. با توجه به دستورالعمل، ورود رنگ ائوزین–نیگروزین به داخل سلول از طریق غشای سلول امکان‌پذیر نیست، بنابراین اسپرم‌های رنگ‌نشده به‌عنوان زنده، درحالی‌که اسپرم‌های رنگ‌شده، مرده به‌شمار می‌آیند (شکل ۱).

شکل ۱. تعیین نرخ زنده‌مانی نمونه منی خروس‌های بومی؛ V رنگ‌نشده (اسپرم‌های زنده) و M رنگ‌شده (اسپرم‌های مرده)

برای ارزیابی آسیب DNA اسپرم از کیت تجاری (شرکت ایده‌ورزان فردا، ایران–تهران) استفاده شد. براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت، ابتدا میکروتیوب‌های حاوی آگارز به‌مدت پنج دقیقه در آب با دمای ۱۰۰–۹۵ درجه سلسیوس حرارت داده شد. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر نمونه منی به میکروتیوب حاوی آگارز اضافه و به‌آرامی مخلوط و مقدار ۳۰ میکرولیتر از مخلوط آگارز + منی، روی لام مخصوص کیت (SDF: Sperm DNA Fragmentation) در مرکز حفره ریخته شد سپس سطح آن با یک لامل پوشیده و به‌مدت پنج دقیقه داخل یخچال در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد. ابتدا لامل برداشته و محلول دناتوره‌کننده A روی حفره لام ریخته شد. بعد از هفت دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و شرایط تاریکی، با کج‌کردن لام، اضافه محلول تخلیه شد. در مرحله بعد محلول دناتوره‌کننده B روی حفره ریخته شد. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و شرایط تاریکی، به‌طور کامل اضافه محلول از روی حفره تخلیه شد. جهت فرایند آبگیری، لام‌های حاوی نمونه منی تیمارشده در محلول‌ها با درصدهای افزاینده اتانول (۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) قرار داده شدند. محلول‌های رنگ‌آمیزی C، D و E روی حفره‌ها ریخته و به‌ترتیب به‌مدت دو، سه و دو دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. در هر مرحله با کج‌کردن لام، محلول اضافی به‌طور کامل از روی حفره‌ها تخلیه شد. در مرحله آخر لام‌ها با جریان غیرمستقیم آب شست‌وشو و در درجه حرارت اتاق خشک و سپس لامل‌گذاری شدند. به‌کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰، نرخ آسیب اندازه‌گیری شد. در این مرحله حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر ناحیه شمارش و نرخ آسیب از طریق تعداد اسپرم‌های دارای هاله (سالم) و اسپرم‌های فاقد هاله (آسیب‌دیده) محاسبه شد (شکل ۲).



شکل ۲. آزمون قطعه قطعه‌شدن DNA در تیمارهای آزمایشی. FS: اسپرم قطعه‌قطعه‌شده و NFS: اسپرم سالم.

داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) رویه GLM طبق رابطه (۱) تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن با سطح احتمال معنی‌داری ۰/۰۵ مقایسه شدند.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + R_k + AB_{ij} + e_{ijk} \quad \text{(رابطه ۱)}$$

که Y_{ijk}، اثر مشاهده (داده آزمایش)؛ μ، میانگین جامعه؛ A_i، اثر درجه حرارت؛ B_j، اثر رزماری؛ R_k، اثر بلوک؛ AB_{ij}، اثرمتقابل رزماری و درجه حرارت و e_{ijk}، اثر خطای آزمایش است.

نتایج و بحث

نتایج مربوط تأثیر گیاه رزماری و درجه حرارت روی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم در جدول‌های (۱) و (۲) است. اثر درجه حرارت تنها بر درصد اسپرم با حرکت مستقیم و پیش‌رونده معنی‌دار بود، به‌نحوی‌که این نوع حرکت در نمونه منی خروس‌های تحت تنش گرمایی کم‌تر بود ($P<0/05$). تغذیه با پودر رزماری موجب کاهش درصد حرکت درجا (نوع C) و بدون حرکت (نوع D) شد ($P<0/05$). از طرف دیگر استفاده از رزماری موجب افزایش درصد جنبایی شد ($P<0/05$). درجه حرارت و رزماری روی درصد حرکت موجی (نوع B) و فرکانس حرکات جانبی اسپرم خروس (BCF) تأثیری نداشت.

جدول ۱. اثرات درجه حرارت و افزودن پودر رزماری و اثر متقابل روی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم در خروس‌های بومی

اثر/ فراسنجه		حرکت پیش‌رونده (درصد)	حرکت موجی (درصد)	حرکت درجا (درصد)	بدون حرکت (درصد)	جنبایی (درصد)
درجه حرارت (سلسیوس)						
۱۸–۲۲		a۱۵/٤۹	۲۲/۰۵	٦/۰۰	۵۸/٤۵	۱۷/۳۱
۲۸–۳۰		b۷/۰۲	۲۰/۰۰	۱٤/۱۲	۵۹/۵٤	۳۹/۹۵
SEM		2/65	۳/۹٤	۳/۱٦	۸/۷۹	٦/۳۲
رزماری (گرم/کیلوگرم)						
صفر		۸/۵۸	۱۸/۷٤	a۱٤/۷۲	a٦۸/۸۷	۳۰/٦۲
۷/۵		۱۳/۹۳	۲۳/۳۰	b۵/۳۹	b٤۹/۱۲	۵۰/۸۷
SEM		2/25	۳/۵٤	۳/۲٦	۸/۱۹	٦/٦۲
رزماری × درجه حرارت						
صفر	۱۸–۲۲	۵/۳۳	۱٤/۵۵	۱۰/۷۹	۷۰/۵۱	۲۸/٤۹b
صفر	۲۸–۳۰	۷/۸۰	۲۲/٤۵	۱۷/٤۵	٤۸/۵۸	۵۱/٤۱a
۷/۵	۱۸–۲۲	۱۱/۸۲	۲۲/۹۳	۹/۱۱	٦۲/۲٤	۳۲/۷۵b
۷/۵	۲۸–۳۰	۱۹/۱٦	۲۱/۱٦	۱۲	٤۹/٦٦	۵۰/۳۳a
SEM		۳/۷٤	۸/٤۹	۲/٤۷	۵/۵۷	۳/۷٤

a-e: میانگین در هر ستون با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

جدول ۲. اثرات درجه حرارت و افزودن پودر رزماری و اثر متقابل روی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم در خروس‌های بومی

اثر/ فراسنجه		سرعت در خط مستقیم (میکرومتر بر ثانیه)	میانگین سرعت در خط مستقیم (میکرومتر بر ثانیه)	سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر بر ثانیه)	حرکت نوسانی (درصد)	خطی بودن (درصد)
درجه حرارت (سلسیوس)						
۱۸–۲۲		۸/۱۵	۱۱/٤۷	۲۰/۷۸	۲٤/۷۲	۱۷/۳۱
۲۸–۳۰		۵/٤۷	۹/۲۲	۱۸/۸۷	۲۱/٦۷	۱۳/۸۸
SEM		۱/۰۱	۱/۲۵	۳/۱٦	۳/۰۸	۱/۷۹
رزماری (گرم/کیلوگرم)						
صفر		b٤/٦٤	b۷/۲۰	b۱۳/٤۸	b۱۸/۳۲	b۱۲/٤۰
۷/۵		a۸/۸۹	a۱۳/٤۹	a۲٦/۱۸	a۲۸/۰۷	a۱۸/۸۰
SEM		۱/۸۰	۱/۹۵	۲/۱٦	۳/۳۸	۱/۸۱
رزماری × درجه حرارت						
صفر	۱۸–۲۲	٤/۲۷	۷/۰۷	۱٤/٦٤	۱۵/٦۷	۹/٤۲
صفر	۲۸–۳۰	٦/٦٦	۱۱/۳۸	۲۳/۱۱	۲۷/٦٦	۱۸/۳۵
۷/۵	۱۸–۲۲	۵/۰۰	۷/۳٤	۱۲/۳۲	۲۰/۹۷	۱۵/۳۸
۷/۵	۲۸–۳۰	۱۱/۳	۱۵/٦	۲۹/۲٤	۲۸/٤۸	۱۹/۲۵
SEM		۱/٤۹	۱/۷۷	٤/٤۸	٤/۳٦	۲/۷۹

a-e: میانگین در هر ستون با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

اثر درجه حرارت و تغذیه پودر رزماری روی نرخ زنده‌مانی اسپرم و قطعه قطعه‌شدن DNA اسپرم در خروس‌های بومی در جدول (۳) ارائه شده است. زنده‌مانی اسپرم در خروس‌ها با افزودن پودر رزماری بیش‌تر از جیره معمولی بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین نرخ قطعه‌قطعه‌شدن DNA اسپرم با القای تنش گرمایی افزایش معنی‌داری داشت و تغذیه با پودر گیاه رزماری نرخ قطعه-قطعه‌شدن DNA اسپرم را به‌طور بسیار معنی‌داری کاهش داد (P<۰/۰۵).

بحث

بخش عمده‌ای از غشای پلاسمایی اسپرم، حاوی اسیدهای چرب بلند زنجیر و غیراشباع است که اسپرم را نسبت به پراکسیداسیون مستعد می‌نماید. اسیدهای چرب بلند زنجیر و غیراشباع نقش مهمی در تحرک اسپرم ایفا می‌کنند. تنش اکسیداتیو، رادیکال‌های آزاد اکسیژن را افزایش داده و این فرایند موجب می‌شود تا استحکام و عملکرد غشای مختل و به‌دنبال آن زنده‌مانی و باروری اسپرم کاهش یابد [۷]. اسپرم به‌دلیل داشتن مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع در ساختار غشای پلاسمایی و میزان فوق‌العاده ناچیز آنتی‌اکسیدان‌های سیتوپلاسمی، به تنش اکسیداتیو بسیار حساس است [۱۳]. در این پژوهش تنش گرمایی میزان تحرک پیش‌رونده اسپرم را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. استفاده از پودر رزماری در جیره خوراکی خروس‌های بومی، درصد اسپرم با حرکت درجا و بی‌تحرک به‌ترتیب حرکت درجا و بدون‌حرکت را کاهش و درصد اسپرم‌های پیش‌رونده را در خروس‌های بومی افزایش داد.

جدول ۳. اثرات درجه حرارت و افزودن پودر رزماری و اثر متقابل روی فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی و نرخ قطعه‌قطعه‌شدن اسپرم در خروس‌های بومی

اثر/ فراسنجه	قطعه قطعه‌شدن دنا (درصد)	زنده‌مانی (درصد)	متوسط جابجایی زاویه‌ای (درجه)	فرکانس حرکات جانبی هرتز (تعداد در ثانیه)	تحرک عرضی سر اسپرم (میکرومتر)
درجه حرارت (سلسیوس)					
۱۸–۲۲	۳٤/۳۰[b]	۷۷/۵۰	۲٦/۳۸	۱/۲۰	۱/۱۳
۲۸–۳۰	٦۲/۷۰[a]	۷۷/۹۰	۱۹/۹۱	۱/٤۲	۱/۰۸
SEM	۲/۳۸	۱/٤۸	۵/۲۷	۰/۳٤	۰/۲
رزماری (گرم/کیلوگرم)					
صفر	۸۵/۲[a]	۷٤/۸۰[b]	۱۲/٤۵[b]	۱/۰۳	۰/۷۹[b]
۷/۵	۳۸/۸[b]	۸۰/٦۰[a]	۳۳/۸٤[a]	۱/۵۹	۱/٤۱[a]
SEM	۳/۳۸	۲/٤۸	۵/۳۰	۰/۳۲	۰/۲
رزماری ×درجه حرارت					
صفر ۱۸–۲۲	٦۰/۸[ab]	۷٦/٦۰	۱٦/۰۱	۰/۹۹	۰/۷۹
صفر ۲۸–۳۰	٦٤/٦۰[a]	۷۳/۰۰	۲۳/۸۲	۱/۸۵	۱/۳۷
۷/۵ ۱۸–۲۲	۱٦/۸۰[c]	۸۲/۸۰	۸/۹۰	۱/۰۷	۰/۷۹
۷/۵ ۲۸–۳۰	۵۱/۸۰[b]	۷۸/٤۰	٤۳/۸٦	۱/۳۳	۱/٤٦
SEM	۳/۳٦	۲/۱۰	۷/٤۵	۰/٤۹	۰/۲۸

a-e: میانگین در هر ستون با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

در این پژوهش افزودن پودر رزماری در جیره خوراکی طیور موجب بهبود تحرک کل اسپرم شد، بالاترین درصد زنده‌مانی اسپرم مربوط به خروس‌های تغذیه‌شده با پودر گیاه رزماری بود. تنش حرارتی منبع عمده‌ای از تنش اکسیداتیو است و با آسیب به غشای سلولی اسپرم، موجب کاهش حرکت اسپرم، نقصان نرخ زنده‌مانی شده و درنهایت باروری را کاهش می‌دهد [۵]. تنش گرمایی در خروس از طریق افزایش رادیکال‌های آزاد و تغییر در سوخت‌وساز بدن منجر به آسیب اکسیداتیو در میتوکندری اسپرم خروس شده و موجب کاهش سطح ATP و به‌دنبال آن کاهش تحرک پیش‌رونده می‌شود [٤] در شرایط طبیعی رادیکال‌ها جهت برخی فعالیت‌ها و فرایندهای فیزیولوژیکی اسپرم ضروری است، اما تولید بیش‌ازحد آن‌ها در اسپرم موجب کاهش سیالیت غشا، شکست DNA، آسیب پروتئین‌ها و درنهایت کاهش تحرک و باروری اسپرم‌ها می‌شود [١٦]. کاهش تحرک اسپرم در زمان تجمع مواد سمی ناشی از پراکسیداسیون اسیدهای چرب، بخش مرکزی آکسونم تاژک را تخریب و تولید ATP از متیوکندری را کاهش داد [١٦]. در این آزمایش کاهش تحرک اسپرم در تیمار تنش حرارتی، می‌تواند به‌دلیل کاهش ATP، کاهش سیالیت غشا و احتمالاً صدمه به آکسونم اسپرم (بخشی از ساختار حرکتی اسپرم) باشد. این اثرات منفی با القای تنش حرارتی را می‌توان با افزایش رادیکال‌های آزاد، به‌هم‌خوردن توازن بین سیستم آنتی‌اکسیدانی و رادیکال‌های آزاد نسبت داد.

گیاه رزماری به‌دلیل وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند به‌عنوان عامل مهم در تقویت و تحریک سیستم تولیدمثلی خروس عمل کند و اغلب در صنعت استفاده از این گیاه، اولین انتخاب است [١٥]. در برخی پژوهش‌ها، گیاه رزماری منجر به بهبود و افزایش فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی و فعالیت غشا در خروس‌های مسن شد. نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از پودر گیاه رزماری در جیره، اثرات سوء تنش گرمایی را کاهش و این تأثیر موجب شد تا به نحوی از طریق ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تولید انرژی در اسپرم، تقویت و حرکت اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل بهبود یابد. در هم‌خوانی با پژوهش حاضر، استفاده از پودر برگ رزماری موجب افزایش تحرک اسپرم‌ها و افزایش کیفیت منی خروس‌های سویه راس شده است [٢٢]. هم‌چنین عصاره رزماری نرخ زنده‌مانی و تحرک پیش‌رونده اسپرم خروس را در زمان ذخیره‌سازی افزایش داد [١٢]. استفاده از اسانس رزماری سبب بهبود حرکت پیش‌رونده، جنبایی کل، زنده‌مانی اسپرم و کاهش درصد اسپرم‌های مرده خروس شد [١٧]. به‌علاوه، استفاده از عصاره رزماری در رقیق‌کننده اسپرم، کیفیت اسپرم‌ها را پس از ذوب بهبود و فراسنجه‌های حرکتی اسپرم را در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش داد [٢٣]. در موش‌های آزمایشگاهی، عصاره رزماری منجر به افزایش تحرک اسپرم شد [١٩]. این اثرات مثبت به‌دلیل وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاه رزماری مانند دی‌ترپن‌های فنلی، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک، کارنوسیک اسید)، کافئیک، رزمارینیک اسید [٣ و ٦] است که می‌توانند نقش حفاظتی را ایفا کنند. در این آزمایش به‌نظر می‌رسد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاه رزماری از طریق کاهش مقادیر رادیکال‌های آزاد، از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی ممانعت و با حفظ سلامت غشای پلاسمایی اسپرم و فعالیت میتوکندری، جنبایی را افزایش و درصد قطعه قطعه‌شدن DNA اسپرم را در حد بسیار معنی‌داری کاهش داد.

بافت بیضه از نظر تقسیم و تکثیر سلولی در فرایند اسپرماتوژنز، از فعالیت بالایی برخوردار است، این بافت تحت تأثیر گرما و متعاقب آن تنش اکسیداتیو بسیار حساس است. تنش اکسیداتیو موجب آسیب به سلول‌های سرتولی و اسپرماتید شده و در فرایند اسپرماتوژنز اختلال ایجاد نمود [٨]. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تنش حرارتی نرخ

قطعه قطعه‌شدن DNA اسپرم را حدوداً به دو برابر افزایش داد (۶۲/۷ در مقابل ۳۴/۳ درصد). به‌نظر می‌رسد افزایش نرخ آسیب DNA ناشی از تولید بیش‌ازحد رادیکال‌های آزاد در تنش حرارتی باشد و با پژوهش‌های پیشین [۱۳] هم‌خوانی دارد. مکانیسم عمل به‌گونه‌ای است که تنش اکسیداتیو از طریق شکاف در DNA به آن آسیب رسانده و با ادامه، آن را قطعه‌قطعه می‌کند [۲]. فرایند تا مرحله‌ای پیش رفته که در سنجش بررسی آسیب DNA، رنگ در اسپرم آسیب‌دیده وارد و هسته را رنگ‌پذیر می‌نماید. در این پژوهش، با کاهش تنش حرارتی و افزودن پودر رزماری به جیره خروس‌ها، از غشاء پلاسماپی اسپرم محافظت و از ورود رنگ به ناحیه سر اسپرم ممانعت گردید که در نتیجه آن هاله‌ای در اطراف اسپرم‌های سالم ایجاد شد. نکته قابل ذکر این‌که با افزایش سلامتی بخش سر اسپرم، این هاله قطورتر شد که این تغییرات با آزمایش سایر پژوهش‌گران [۲۵] هم‌خوانی داشت. در موش تنش گرمایی به‌دلیل بروز تنش اکسیداتیو منجر به نقصان در فشرده‌شدن کروماتین و مرگ برنامه‌ریزی سلولی (آپوپتوز) شد و به‌دنبال آن آسیب به DNA اسپرم افزایش یافت [۹]. در برخی مطالعات تنش اکسیداتیو از طریق نقصان در پروتامین، اصلی‌ترین عامل قطعه‌قطعه‌شدن DNA اسپرم گزارش و درنهایت موجب القای مرگ برنامه‌ریزی سلولی شد. تنش گرمایی با ایجاد اختلال در بیان ژن‌ها در فرایند پروتئین‌سازی نیز اختلال ایجاد نمود [۱۴]. آسیب به هسته اسپرم خروس در سنین مختلف در تابستان افزایش و مشخص شد که سطوح بالای گونه‌های فعال اکسیژن با افزایش آسیب DNA اسپرم ارتباط دارد [۲]. ازآنجایی‌که متراکم‌شدن کروماتین، DNA اسپرم را در برابر آسیب‌های شیمیایی محافظت می‌کند، بنابراین کمبود پروتامین قادر است اسپرم را در برابر رادیکال‌های آزاد آسیب‌پذیرتر کند. هم‌چنین با افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشای پلاسماپی، تحرک اسپرم کاهش می‌یابد. در نتیجه پراکسیداسیون، فعالیت‌های آنزیمی مهار و شکستگی در DNA اسپرم ایجاد می‌شود که درنهایت، توان باروری اسپرم کاهش می‌یابد [۲۵]. نتایج پژوهش حاضر نشان داد با افزودن پودر برگ رزماری در جیره خوراکی، نه تنها همانند نتایج پژوهش برقعی و همکاران [۶] تحرک و باروری اسپرم را در خروس به‌طور معنی‌داری بهبود داد، بلکه استفاده از این گیاه در جیره قادر بود اسپرم را در شرائط تنش حرارتی محافظت و درصد آسیب به هسته را در حد معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش دهد (۸۵/۲۰ در مقابل ۳۸/۸۰ درصد). نتایج اثر متقابل درجه حرارت و رزماری، نیز تأیید دیگری در استفاده از پودر این گیاه در تنش حرارتی است. تنش اکسیداتیو به‌وجودآمده از تنش گرمایی در بافت بیضه، احتمالاً توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاه رزماری موجب بهبود فراسنجه‌های حرکتی اسپرم شد.

افزودن پودر گیاه رزماری به جیره خروس‌های بومی به مقدار ۷/۵ گرم در کیلوگرم، تحت تأثیر تنش گرمایی احتمالاً می‌تواند تأثیر مثبتی روی فراسنجه‌های زنده‌مانی، تحرک و سلامت DNA اسپرم داشته باشد. ازآنجایی‌که مهم‌ترین شاخص باروری اسپرم تحرک و سلامت DNA است، بیش‌ترین محافظت DNA اسپرم، با تغذیه پودر رزماری ایجاد می‌شود و تنش گرمایی بیش‌ترین صدمه را در بخش سر اسپرم ایجاد می‌نماید. بنابراین استفاده از این گیاه در تنش حرارتی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از پرسنل خدوم دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان به جهت فراهم‌کردن امکانات این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع مورداستفاده

1. Afonso Mde O SAM CEB RDP BSB R, et al. RP and Mancini-Filho J (2013) Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. Nutrition & metabolism, 10(1): 1-9.
2. Agarwal A and Said TMJHru (2003) Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Human Reproduction Update, 9(4): 331-345.
3. Al-Sereiti MAbu-Amer K and Sena P (1999) Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Indian Journal of Experimental of Biology, 37(2): 124-30.
4. Azad MAK, Kikusato M, Maekawa T, Shirakawa H and Toyomizu M (2010). Metabolic characteristics and oxidative damage to skeletal muscle in broiler chickens exposed to chronic heat stress. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 155(3): 401-406.
5. Boonsorn T, Kongbuntad W, Narkkong NA and Aengwanich W (2010). Effects of catechin addition to extender on sperm quality and lipid peroxidation in boar semen. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 7(3): 283-288.
6. Borghei-Rad SMZeinoaldini SZhandi MMoravej H and Ansari MJT (2017) Feeding rosemary leaves powder ameliorates rooster age-related subfertility. Theriogenology, 101: 35-43.
7. Cerolini SZaniboni LMaldjian A and Gliozzi TJT (2006) Effect of docosahexaenoic acid and α-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. Theriogenology, 66(4): 877-886.
8. Kanter MAktas CErboga MJT and health i (2013) Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study. Toxicology and industrial health, 29(2): 99-113.
9. Li YCao YWang F and Li CJAh (2014) Scrotal heat induced the Nrf2-driven antioxidant response during oxidative stress and apoptosis in the mouse testis. Acta histochemica, 116(5): 883-890.
10. Malo CGil LGonzalez NMartínez FCano RDe Blas I, et al. (2010) Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Cryobiology, 61(1): 142-147.
11. Organization WH. World health statistics 2010. World Health Organization; 2010.
12. Ramezaninejad H and Roostaei Ali Mehr MJIJoAS (2017) Storage of rooster semen in liquid form using alcoholic extract of rosemary. Iranian Journal of Animal Science, 48(1): 51-59.
13. Sakkas D and Tomlinson M (2000). Assessment of sperm competence. In: Seminars in reproductive medicine; 2000: Copyright© 2000 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New …; p. 133-140.
14. Salces-Ortiz J, Ramón M, González C, Perez-Guzman MD, Garde JJ, Garcia-Alvarez O, ... and Serrano MM (2015). Differences in the ovine HSP90AA1 gene expression rates caused by two linked polymorphisms at its promoter affect rams sperm DNA fragmentation under environmental heat stress conditions. PLoSOne, 10(2), e0116360.
15. Sanches-Silva ACosta DAlbuquerque TGBuonocore GGRamos FCastilho MC, et al. (2014) Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: A review, 31(3): 374-395.
16. Sanocka D and Kurpisz M (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. Reproductive biology and endocrinology, 2(1): 1-7.
17. Shafigh H, Shakeri M, Zeinoaldini S, Kohram H, Zhandi M and Moghbeli M (2016). Improving sperm cryopreservation of rooster by using rosemary alcoholic essential oil. Animal Production, 18(3): 615-624.
18. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Ríos R, Morales I and Castro A (2006). Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. Human Reproduction, 21(4): 986-993.
19. Tousson E, Bayomy MF and Ahmed AA (2018). Rosemary extract modulates fertility potential, DNA fragmentation, injury, KI67 and P53 alterations induced by etoposide in rat testes. Biomedicine & Pharmacotherapy, 98: 769-774.
20. Türk G, Çeribaşı AO, Şimşek ÜG, Çeribaşı S, Güvenç M, Kaya ŞÖ ... and Tonbak F (2016). Dietary rosemary oil alleviates heat stress-induced structural and functional damage through lipid peroxidation in the testes of growing Japanese quail. Animal reproduction science, 164: 133-143.

21. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW and Oh KS (1998). Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. Human reproduction (Oxford, England), 13(4): 998-1002.
22. Zadeh ZT, Shariatmadari F, Sharafi M and Torshizi MAK (2020). Amelioration effects of n-3, n-6 sources of fatty acids and rosemary leaves powder on the semen parameters, reproductive hormones, and fatty acid analysis of sperm in aged Ross broiler breeder roosters. Poultry science, 99(2): 708-718.
23. Zanganeh Z, Zhandi M, Zare-Shahneh A, Najafi A, Nabi MM and Mohammadi-Sangcheshmeh A (2013). Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation?. Small Ruminant Research, 114(1): 120-125.
24. Zarghi H, Golian A and Kermanshahi H (2015). The effect of rosemary hydro-alcoholic (*Rosmarinus officinalis* L.) extract on performance and egg quality in laying hens. Iranian Journal of animal Science, 46(1): 1-8.
25. Zhai W, Neuman SL, Latour MA and Hester P Y. (2007). The effect of dietary L-carnitine on semen traits of white leghorns. Poultry Science, *86*(10): 2228-2235.