Archive of SID

بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ با افزودن عصاره نعناع فلفلی در رقیق‌کننده

- **وحید واحدی***: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
- **نعمت هدایت‌ایوریق**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

هدف این پژوهش بررسی تأثیر عصاره گیاه نعناع فلفلی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ بود. برای این منظور از چهار رأس قوچ مغانی هفته‌ای دو بار اسپرم‌گیری شد و انزال‌ها به‌طور یکسان باهم مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها با رقیق‌کننده حاوی سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی (۰، ۲، ٤، ۸، ۱۲ و ۱٦ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر محلول رقیق‌کننده) رقیق شدند. نمونه‌ها پس از طی مراحل سردسازی و انجماد تا زمان ارزیابی در داخل ازت مایع نگه‌داری شدند. بعد از یخ‌گشایی، پارامترهای تحرک به‌وسیله سیستم کاسا، زنده‌مانی به‌روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین و تست یکپارچگی غشایی با محلول هیپواسموتیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزودن عصاره در سطوح ٤ و ۸ میلی‌لیتر، درصد تحرک کلی اسپرم‌ها را افزایش داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین غلظت ٤ میلی‌لیتر عصاره به‌طور معنی‌داری تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها را نسبت به گروه شاهد و گروه‌های تیماری حاوی سطوح بالاتر بهبود داد (P<۰/۰۵). در رقیق‌کننده حاوی ۸ میلی‌لیتر عصاره، درصد صفات LIN، STR و VSL بالاتر بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین افزودن سطوح ٤ و ۸ میلی‌لیتر عصاره، پارامترهای VCL و VAP را بهبود داد (P<۰/۰۵). سطوح ٤ و ۸ میلی‌لیتر عصاره، درصد زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها را نسبت به گروه شاهد بهبود داد (P<۰/۰۵)، اما ریخت‌شناسی اسپرم‌ها تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت. در نتیجه استفاده از عصاره نعناع فلفلی در رقیق‌کننده منی منجر به بهبود کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ شد که این اثر وابسته به دوز بود.

کلمات کلیدی: اثرات آنتی‌اکسیدانی، عصاره نعناع فلفلی، اسپرم قوچ، منجمد- یخ گشایی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: vahediv@uma.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

از مهم‌ترین روش‌های بهبود مدیریت تولیدمثلی دام، استفاده از تکنیک تلقیح مصنوعی می‌باشد، به‌طوری‌که استفاده از این تکنیک نه تنها سبب بهبود ژنتیکی گله می‌شود، بلکه در بسیاری از موارد بازده تولیدمثلی را نیز افزایش می‌دهد. به‌منظور تحقق بخشیدن به بسیاری از مزایای بالقوه تلقیح مصنوعی، ذخیره‌سازی منی برای بلندمدت یک امر ضروری محسوب می‌شود. این امر به‌وسیله فرآیند انجماد محقق می‌شود، فرآیندی که با توقف فعالیت‌های متابولیکی اسپرم‌ها امکان ذخیره‌سازی به‌طور نامحدود اسپرم‌های بارور را فراهم می‌آورد (Bailey و همکاران، ۲۰۰۰). انجماد منی یک اثر منفی بر کنش‌های اسپرم و توان باروری آن‌ها می‌گذارد، به‌طوری‌که امروزه حتی با به‌کارگیری تکنیک‌های روز، درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها بعد از یخ‌گشایی به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (Lessard و همکاران، ۲۰۰۰). در طول فرآیند انجماد-یخ‌گشایی منی، تنش‌های فیزیکی و شیمیایی به‌وجود آمده در غشای اسپرم باعث می‌شود که زنده‌مانی، تحرک و توان باروری اسپرم‌ها کاهش یابد. این آسیب‌ها با تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون فسفولیپیدها در غشای سلول اسپرم همراه است (Chatterjee و همکاران، ۲۰۰۱). سلول‌های اسپرم حاوی غلظت‌های بالای اسیدهای چرب غیراشباع هستند که مستعد پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشند. پراکسیداسیون لیپیدی با تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد در غشای سلول اسپرم همراه است و در نهایت این ترکیبات منجر به کاهش کیفیت و باروری اسپرم می‌شوند. تنش اکسیداتیو وضعیتی است که در طول فرآیند انجماد به‌وجود آمده و با آسیب‌های سلولی ناشی از اکسیژن و مشتقات اکسیدانی اکسیژن که عموماً رادیکال‌های فعال اکسیژنی (ROS) نامیده می‌شوند، همراه است. تنش اکسیداتیو باعث تخریب دیواره غشا و کل ترکیبات ساختمانی اسپرم می‌شود که علت اصلی چنین تخریبی، عدم تعادل بین تولید ROS و سیستم بیولوژیکی کنترل‌کننده رادیکال‌های آزاد عنوان شده است (Malo و همکاران، ۲۰۱۰). تولید ROS به‌وسیله اسپرم یک فرآیند طبیعی است، اما بالاتر از سطوح فیزیولوژیک باعث آسیب سلولی و ناباروری جنس نر می‌شود. از رادیکال‌های آزاد به‌عنوان نمونه می‌توان به یون هیدروکسیل، سوپر اکسید، هیدروژن پراکسید، رادیکال پراکسیل و یون هیپوکلریت اشاره کرد که شدیداً واکنش‌پذیر بوده و باعث آسیب دیدگی سلول‌های اسپرم می‌شوند (Sikka، ۲۰۰۱). برای مقابله با این مشکل، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در محیط رقیق‌کننده اهمیت زیادی خواهد داشت. سلول اسپرم از سازوکار آنتی‌اکسیدانی اعم از آنزیمی و غیرآنزیمی برخوردار است اما مقدار آن‌ها کافی نیست وبرای فرآوری اسپرم به‌منظور انجماد نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدان‌هایی با منشأ خارجی است (Bansal و Bilaspuri، ۲۰۱۱). بنابراین به‌منظور بهبود انجماد اسپرم و جلوگیری از تنش اکسیداتیو و حذف رادیکال‌های آزاد فعال، از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک در محیط‌های انجمادی اسپرم استفاده شده است (Malo و همکاران، ۲۰۱۰). اما با توجه به‌وجود مشکلاتی در استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک مانند بوتیل هیدروکسی تولوئن در رقیق‌کننده‌ها و اثرات سوء آن‌ها بر سلول‌ها، امروزه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی جایگزین آنتی اکسیدان‌های سنتتیک شده است (Lotfipour و همکاران، ۲۰۰۷). اطلاعات محدودی در مورد اثرات آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی (گیاهی) در فرآوری اسپرم حیوانات اهلی وجود دارد. اخیراً اثبات شد که افزودن عصاره گیاه رزماری به رقیق‌کننده منی گونه‌های مختلف ازجمله گاو (Daghigh Kia و همکاران، ۲۰۱۴)، گوسفند (Khodaei Motlagh و همکاران، ۲۰۱۴) و بز (Malo و همکاران، ۲۰۱۱) موفق بوده است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان به‌طور عمده به ترکیبات فنولیک، فلاوونوئیدها، اسیدهای فنولیک و دی‌ترپن‌های فنولیک مربوط می‌شود. ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدها به‌دلیل خواص اکسید و احیاکنندگی، دهنده گروه هیدروکسیل و داشتن خصوصیت کلاته‌کنندگی یون‌های فلزی، نقش مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد به‌خصوص ROS و تجزیه پراکسیدها دارند (Arora و همکاران، ۱۹۹۸). خانواده نعناعیان (Lamiaceae) یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهی است که دارای پراکنش جهانی می‌باشند که گیاه نعناع فلفلی جزء این خانواده می‌باشد. نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* L. گیاهی علفی، پایا و چند ساله از تیره نعناعیان می‌باشد. این گیاه بومی مناطق مدیترانه بوده ولی به‌صورت تجاری در مناطق متعددی از جهان و در اکثر نقاط ایران کشت داده می‌شود (Hadian و همکاران، ۲۰۰۸). ازجمله خواص این گیاه می‌توان به اثرات ضداسپاسمی، ضدالتهابی، ضدسرطان، اشتها آوری، ضدباکتریایی و ضدقارچی آن اشاره داشت (Talpur، ۲۰۱۴). از مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده این گیاه می‌توان به منتول (Menthol)، منتون (Mentone) و متیل استات (Methyl acetate) اشاره داشت. بسیاری از گیاهان به‌خصوص اعضای خانواده نعناعیان حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از قبیل پلی‌فنول‌ها، ویتامین‌های E، C و کاروتنوئیدها هستند که این ترکیبات نقش بسیار مهمی در تجزیه پراکسیدها و جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های فعال اکسیژنی، اکسیژن منفرد و اکسیژن سه‌گانه ایفا می‌کنند (Kurşat و همکاران، ۲۰۱۱). مشخص شده است که این ترکیبات (به‌خصوص فلاونوئیدها) قادرند با پوشش دادن لیپیدها، روند پراکسیداسیون لیپیدی را تغییر داده و متوقف کنند، هم‌چنین می‌توانند با کاهش سیالیت غشاهای سلولی و جلوگیری از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و محدود کردن پراکسیداسیون فسفولیپیدها و اسیدهای چرب غیراشباع، از

www.SID.ir

Archive of SID

غشاهای سلولی محافظت کنند (Blokhina و همکاران، ۲۰۰۳). مطالعات فراوان در شرایط آزمایشگاهی نشان داده است که ترکیبات فنولیک می‌توانند به‌طور مستقیم رادیکال‌های آزاد مانند یون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و پراکسیل را پاک‌سازی و جاروب کنند، به‌طوری‌که حتی گفته شده است که اثر آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات بیش‌تر از ویتامین C و E است (Rice-Evans و همکاران، ۱۹۹۷). تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از عصاره گیاه نعناع فلفلی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در محیط رقیق‌کننده اسپرم و تاثیر آن بر فراسنجه‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی اسپرم گزارش نشده است. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه نعناع فلفلی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی بر شاخص‌های حرکتی اسپرم، نرخ زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و مورفولوژی اسپرم منجمد- یخ‌گشایی قوچ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌مدت ۱۴ هفته در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند مغانی، واقع در شهرستان جعفرآباد مغان اجرا شد.

تهیه عصاره: جهت تهیه عصاره گیاه نعناع فلفلی، این گیاه بعد از جمع‌آوری در سایه خشک گردیده و سپس پودر شد. به‌مقدار ۵۰ گرم از این گیاه وزن شده و با ۳۵۰ میلی‌لیتر الکل اتانول (۷۰٪) داخل بشر یک لیتری خیسانده شد. برای نفوذ بهتر الکل به گیاه، هر نیم ساعت یک‌بار بشر هم‌زده شد. بعد از فیلتر کردن با کاغذ صافی نمره یک، الکل محلول حاصل به‌وسیله دستگاه تقطیر در خلاء در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد و عصاره گیاه در ته بشر ته‌نشین شد. در زمان آزمایش، از عصاره گیاه به‌دست آمده مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم به‌وسیله ترازوی دقیق وزن شده و در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شد. جهت حلالیت بهتر عصاره و امولسیفه کردن محلول از محلول توئین ۸۰ (مرک آلمان) به‌مقدار ۵۰ میکرولیتر استفاده شد (Daghigh Kia و همکاران، ۲۰۱۶).

جمع‌آوری منی: در این آزمایش از ۴ رأس قوچ نژاد مغانی بالغ با سن ۴-۳ سال و میانگین وزنی ۷۰ کیلوگرم به تعداد دو بار در هفته و به‌مدت ۴ هفته به‌وسیله مهبل مصنوعی اسپرم‌گیری شد. نمونه‌های منی سریعاً در فلاسک حاوی آب ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل شدند و در آزمایشگاه در داخل حمام بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. در آزمایشگاه نمونه نمونه‌های منی از نظر حجم، رنگ، عدم آلودگی به ادرار و خون و تحرک پیش‌رونده بررسی و نمونه‌های منی گرفته شده که دارای رنگ کرمی و تحرک بیش‌تر از ۷۰ درصد بودند به‌عنوان منی نرمال در نظر گرفته شدند و در غیر این‌صورت منی‌های جمع‌آوری شده حذف شدند. به‌منظور حذف اثرات فردی دام، نمونه‌های منی هر دام در مقدار مساوی با هم مخلوط شدند.

تهیه رقیق‌کننده، مرحله سردسازی و انجماد: در این آزمایش از رقیق‌کننده بر پایه تریس استفاده شد که اجزا و مقادیر رقیق‌کننده در جدول ۱ ارائه شده است (Vahedi و همکاران، ۲۰۱۸). تمامی مواد شیمیایی استفاده شده در این آزمایش از شرکت سیگما خریداری شد. ابتدا مواد تریس، سیترات و فروکتوز با نسبت ذکر شده در جدول، در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شد. سپس برای تهیه زرده تخم‌مرغ، بعد از جداسازی اولیه سفیده، زرده به‌وسیله کاغذ صافی استریل حرکت داده شد تا سفیده و شالاژ کاملاً از زرده جدا شوند. زرده تخم‌مرغ با محلول فوق مخلوط شد و محلول نهایی روی صفحه گرم به‌مدت ۱۵ دقیقه همگن‌سازی شد. سپس به رقیق‌کننده ۵٪ گلیسرول افزوده شد. در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رقیق‌کننده به مقدار مشخص به فالکون‌ها اضافه شده و سپس عصاره گیاه نعناع فلفلی در سطوح مختلف (۰، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر محلول رقیق‌کننده) به رقیق‌کننده افزوده شد. رقیق‌سازی منی به نسبت ۱ حجم منی و ۱۲ حجم رقیق‌کننده در دمای اتاق انجام شد، طوری‌که غلظت نهایی اسپرم تقریباً ۳۰۰ میلیون در هر میلی‌لیتر بود. سپس فالکون‌ها به‌آرامی تکان داده شدند تا اسپرم‌ها در داخل رقیق کننده به‌طور یکنواخت پخش شوند و به‌دنبال آن فالکون‌ها در بشر حاوی آب هم‌دما گذاشته شد و جهت فرآیند سردسازی به یخچال انتقال یافتند. منی رقیق‌شده به‌مدت ۳ ساعت تا دمای ۴ درجه سلسیوس سرد شد. سپس همه تیمارها در داخل پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری (IMV, France) پر شدند. بعد از مرحله سردسازی جهت انجماد اسپرم‌ها، نمونه‌ها به‌مدت ۸ دقیقه روی بخار ازت قرار داده شدند (۴ سانتی‌متر بالای سطح نیتروژن مایع) و بعد از آن به‌داخل تانک ازت (دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) انتقال یافته و تا زمان یخ‌گشایی در این دما نگه‌داری شدند. در این پژوهش ۴ تکرار برای هر تیمار درنظر گرفته شد و در هر تکرار برای هر تیمار ۸ پایوت منجمد شد و جمعاً برای هر تیمار ۳۲ پایوت و برای کل آزمایش ۱۹۲ پایوت منجمد شد. برای یخ‌گشایی منی، پس از خارج‌کردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، به‌مدت ۳۰ ثانیه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند و سپس نمونه اسپرم یخ‌گشایی شده به‌داخل میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری تخلیه شده و برای ارزیابی‌های مختلف کیفیت اسپرم مورد استفاده قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: اجزای مواد و مقادیر تشکیل‌دهنده محیط انجماد بر پایه تریس

مواد	مقدار
تریس	۳۰/۷ (گرم در لیتر)
سیتریک اسید	۱۶/۴ (گرم در لیتر)
فروکتوز	۱۲/۶ (گرم در لیتر)
زرده تخم‌مرغ	٪۱۵
گلیسرول	٪۵

ارزیابی تحرک اسپرم: بعداز یخ‌گشایی، پارامترهای تحرک کلی (Total Motility=TM)، تحرک پیش‌رونده (Progressive Motility= PM)، سرعت در مسیر میانگین (Curvilinear velocity=VCL)(میکرومتر بر ثانیه)، سرعت در مسیر منحنی (Average path velocity=VAP) (میکرومتر بر ثانیه)، سرعت در مسیر مستقیم (Straight–line velocity= VSL)(میکرومتر بر ثانیه)، جنبایی عرضی سر (Lateral head displacement =ALH)، خطی بودن جنبایی (Linearity, LIN=VSL/VCL×۱۰۰) (درصد) توسط سیستم آنالیزگر کامپیوتری اسپرم (CASA) ساخت شرکت هوشمند فن‌آور تهران (مدل HFTCASA) ارزیابی شدند. جهت ارزیابی پارامترهای تحرک، ابتدا نمونه‌ها یخ‌گشایی شده و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد حمام آب گرم انکوبه شدند. سپس ۵ میکرولیتر از نمونه روی لام از قبل گرم شده (در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار داده و بعد از پوشاندن با لامل، روی میکروسکوپ قرار داده شد. از هر نمونه حداقل ۱۰ ناحیه به‌طور کاملاً تصادفی انتخاب و تعداد ۲۰۰ اسپرم به‌وسیله سیستم CASA (شرکت هوشمند فن‌آور تهران، ایران) آنالیز شد. آنالیز همه پارامترهای تحرک به‌وسیله عکس‌برداری با بزرگ‌نمایی ×۱۰۰ انجام شد.

ارزیابی زنده‌مانی اسپرم: برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. این روش بر این اساس می‌باشد که اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را به‌خود جذب می‌کنند ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی، ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم برداشته و روی لام قرار داده شد و سپس از رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین (۱۶/۷ گرم رنگ ائوزین، ۱۰۰ گرم رنگ نیگروزین و ۲۹ گرم سیترات سدیم در یک لیتر آب مقطر) برداشته و روی نمونه ریخته و با سرسمپلر به‌آرامی نمونه را هم‌زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. سپس با یک لام دیگر به‌آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن لام را زیر میکروسکوپ قرار داده و از هر اسلاید ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. اسپرم‌هایی که به‌طورکلی یا جزیی رنگ قرمز مایل به بنفش به خود گرفته بودند، مرده و اسپرم‌هایی که رنگ به‌خود نگرفته بودند زنده محسوب شدند.

تست یکپارچگی غشای پلاسمایی (تست HOS): این تست براساس اسمولاریته محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. اسپرم‌ها با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریته پایین به‌سرعت واکنش می‌دهند و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. تنها اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم قادر هستند به این نوع تغییر واکنش دهند و اسپرم‌های مرده که در این محیط قرار می‌گیرند هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند. ترکیبات محلول این تست شامل فروکتوز (۹ گرم در لیتر) و سیترات سدیم(۴/۹ گرم در لیتر) می‌باشد که اسمولاریته این محلول ۱۰۰ میلی‌اسمول است. برای انجام این تست ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک مخلوط شده و به‌مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شد. سپس مقدار ۵ میکرولیتر از این نمونه روی لام قرار داده شد و با لامل پوشانده شد و به‌وسیله میکروسکوپ فاز کنتراست تعداد ۲۰۰ اسپرم با بزرگ‌نمایی×۴۰۰ شمارش شد و اسپرم‌های با دم متورم و تاب خورده به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم درنظر گرفته شدند.

ارزیابی مورفولوژی اسپرم: برای ارزیابی اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی از محلول هانکوک استفاده شد که شامل فرمالین ٪۳۷ (۶۲/۵ میلی‌لیتر)، محلول سالین (۱۵۰میلی‌لیتر)، محلول بافر (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دو بار تقطیر (۵۰۰ میلی‌لیتر) می‌باشد. چند قطره از هر نمونه منی به میکروتیوب‌های حاوی یک‌میلی‌لیتر از محلول هانکوک اضافه شد. یک قطره از این محلول روی لام قرار داده شد و لامل به‌آرامی روی آن قرار گرفت. با شمارش حداقل ۲۰۰اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگ‌نمایی×۴۰۰، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی (غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) محاسبه شد.

آنالیز آماری: این مطالعه با ۶ تیمار در ۴ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌های حاصل از پارامترهای حرکتی اسپرم، زنده‌مانی، ریخت‌شناسی اسپرم و تست HOS ابتدا با Arcsin به عدد واحد تبدیل شده و سپس تجزیه واریانس تمامی پارامترهای مورد ارزیابی توسط نرم‌افزار SAS ۹,۲ و با استفاده از رویه GLM مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون دانکن در سطح احتمال α=۰/۰۵ استفاده شد. مدل آماری به‌کار رفته در این آزمایش عبارت است از $Y_{ij}=\mu+Ti+e_{ij}$ که در آن Y_{ij} مشاهدات، μ میانگین مشاهدات، Ti اثر تیمارها و e_{ij} اثر اشتباه آزمایشی بود.

نتایج

ارزیابی فراسنجه‌های تحرکی اسپرم‌ها: اثرات سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی روی فراسنجه‌های تحرکی اسپرم‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که افزودن سطوح ۴ و ۸ میلی لیتر در دسی لیتر عصاره نعناع فلفلی به رقیق‌کننده توانست به‌طور

www.SID.ir

Archive of SID

معنی‌داری تحرک کلی اسپرم‌ها را نسبت به گروه شاهد و گروه‌های تیماری حاوی سطوح بالاتر عصاره بهبود دهد (P<۰/۰۵). هم‌چنین غلظت ۴ میلی‌لیتر عصاره، به‌طور معنی‌داری تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها را نسبت به گروه شاهد و گروه‌های تیماری حاوی سطوح بالاتر بهبود داد (P<۰/۰۵). افزودن سطوح ۸ میلی‌لیتر عصاره نعناع فلفلی به رقیق کننده، صفت سرعت در مسیر مستقیم را نسبت به گروه شاهد و گروه‌های تیماری حاوی سطوح بالاتر بهبود داد (P<۰/۰۵). برای صفت سرعت در مسیر منحنی، رقیق‌کننده حاوی ۴ میلی‌لیتر عصاره، نسبت به گروه‌های شاهد، ۲، ۱۲ و ۱۶ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر به‌طور معنی‌داری عملکرد بهتری نشان داد (P<۰/۰۵). از طرفی سرعت در مسیر منحنی اسپرم‌ها در تیمار ۸ میلی‌لیتر نیز نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود (۱۱۹/۸±۱۴/۵۸) در مقابل (۹۷/۲۴±۷/۸۶). صفت سرعت در مسیر میانگین در گروه‌های تیماری حاوی ۴ و ۸ میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد و گروه ۱۶ میلی‌لیتر افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) داشت. هم‌چنین صفت تحرک عرضی سر در تیمار ۸ میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد از لحاظ آماری بالاتر بود (۴/۴۵±۰/۳۵) در مقابل (۳/۱۱±۰/۴۱). رقیق‌کننده حاوی سطح ۸ میلی‌لیتر عصاره نسبت به رقیق‌کننده حاوی ۱۶ میلی‌لیتر عصاره نعناع، عملکرد بهتری در صفات درصد خطی بودن تحرک (۵۴/۴±۴۳/۴۲) درمقابل (۴۳/۸۷±۳/۷۳) و راستی مسیر طی شده (۹۴/۷±۲۰/۹۳) در مقابل (۷۶/۸۲±۷/۰۴) نشان داد (P<۰/۰۵)، ولی در این صفات گروه‌های تیماری در مقایسه با شاهد تفاوت معنی داری نشان ندادند (P>۰/۰۵).

زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و مورفولوژی اسپرم‌ها: نتایج حاصل از آنالیز اثرات سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی بر صفت زنده‌مانی اسپرم‌ها در جدول ۳ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که افزودن سطوح ۴ و ۸ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره به رقیق‌کننده اسپرم قوچ (به‌ترتیب ۵۲/۱۳±۴/۰۵ و ۵۳/۳۲±۳/۸۴)، به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) باعث افزایش زنده‌مانی اسپرم‌ها بعد از یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد و سطح ۱۶ میلی‌لیتر (به‌ترتیب ۴۲/۰۸±۳/۴۷ و ۴۰/۳۱±۳/۶۳) شد. بالاترین درصد زنده‌مانی مربوط به تیمار ۸ میلی‌لیتر (۵۳/۳۲٪) و پایین‌ترین درصد مربوط به تیمار ۱۶ میلی‌لیتر (۴۰/۴۱٪) بود. افزودن سطوح ۴ و ۸ میلی‌لیتر عصاره به رقیق‌کننده، به‌طور معنی‌داری صفت یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها را نسبت به گروه شاهد و سطح ۱۶ میلی‌لیتر بهبود داد (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که بالاترین درصد یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها مربوط به تیمار ۴ و ۸ میلی‌لیتر (به‌ترتیب ۴۹/۰۹ و ۵۱/۸۳ درصد) و پایین‌ترین درصد آن مربوط به گروه شاهد و سطح ۱۶ میلی‌لیتر (به‌ترتیب ۳۷/۶۸ و ۳۸/۲۷ درصد) بود (جدول ۳). ریخت‌شناسی اسپرم‌ها تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره قرار نگرفت (P>۰/۰۵).

جدول ۲: مقایسه ویژگی‌های حرکتی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ مغانی در بین سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی (میلی‌لیتر در دسی‌لیتر محلول رقیق‌کننده)، (میانگین± خطای استاندارد)

صفات	گروه شاهد	۲	۴	۸	۱۲	۱۶
تحرک کل (٪)	۳۹/۲۸^{cd}±۲/۹۲	۴۳/۸۲^{bc}±۳/۲۴	۵۳/۳۱^{ab}±۳/۵۴	۵۶/۱۵^{a}±۳/۳۲	۴۴/۱۲^{bc}±۳/۷۵	۴۰/۵۱^{cd}±۳/۴۱
تحرک پیش‌رونده (٪)	۳۰/۴۴^{bc}±۲/۵۳	۳۶/۲۵^{ab}±۳/۰۳	۴۱/۲۸^{a}±۲/۹۴	۳۸/۹۲^{ab}±۳/۵۱	۳۳/۱۹^{bc}±۲/۲۱	۲۴/۸۶^{cd}±۲/۳۷
سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر بر ثانیه)	۴۹/۸۳^{b}±۳/۴۲	۵۴/۰۸^{ab}±۳/۹۳	۵۹/۶۴^{ab}±۴/۰۵	۶۳/۴۱^{a}±۴/۳۲	۵۳/۶۲^{bc}±۴/۱۲	۳۸/۹۵^{d}±۳/۱۴
سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر بر ثانیه)	۹۷/۲۴^{c}±۷/۸۶	۱۰۴/۳۱^{bc}±۸/۳۵	۱۲۵/۴۳^{a}±۸/۰۹	۱۱۹/۱۴^{ab}±۸/۵۸	۱۰۹/۳۰^{bc}±۷/۷۱	۱۰۲/۲۱^{bc}±۸/۶۲
سرعت در مسیر میانگین (میکرومتر بر ثانیه)	۵۴/۳۸^{b}±۳/۶۳	۶۱/۲۰^{ab}±۳/۵۱	۶۵/۱۶^{a}±۴/۰۷	۶۷/۲۴^{a}±۴/۳۵	۵۹/۸۵^{ab}±۴/۰۴	۵۱/۳۲^{b}±۴/۲۳
تحرک عرضی سر (میکرومتر)	۳/۱۱^{b}±۰/۴۱	۳/۳۸^{ab}±۰/۳۹	۴/۲۴^{ab}±۰/۳۷	۴/۴۵^{a}±۰/۳۵	۳/۶۱^{ab}±۰/۳۳	۳/۳۵^{ab}±۰/۳۸
خطی بودن تحرک (٪)	۴۸/۰۵^{ab}±۴/۲۴	۵۱/۳۲^{ab}±۴/۱۵	۴۹/۰۲^{ab}±۳/۸۵	۵۴/۴۳^{a}±۴/۴۲	۴۹/۱۱^{ab}±۴/۷۱	۴۳/۸۷^{b}±۳/۷۳
راستی مسیر طی شده (٪)	۹۰/۲۱^{ab}±۷/۰۶	۸۶/۸۱^{ab}±۷/۶۳	۹۱/۴۲^{ab}±۷/۵۶	۹۴/۲۰^{a}±۷/۹۳	۹۰/۳۱^{ab}±۶/۹۸	۷۶/۸۲^{b}±۷/۰۴

*حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح است (P<۰/۰۵)

جدول ۳: مقایسه صفات زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده در بین سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی (میلی‌لیتر در دسی‌لیتر محلول رقیق‌کننده)، (میانگین± خطای استاندارد)

صفات	گروه شاهد	۲	۴	۸	۱۲	۱۶
زنده‌مانی (٪)	۴۲/۰۸^{b}±۳/۴۷	۴۹/۴۵^{ab}±۴/۶۲	۵۲/۱۳^{a}±۴/۰۵	۵۳/۳۲^{a}±۳/۸۴	۴۴/۲۱^{ab}±۳/۳۱	۴۰/۴۱^{b}±۳/۶۳
یکپارچگی غشای پلاسمایی (٪)	۳۷/۶۸^{b}±۳/۰۴	۴۴/۶۴^{ab}±۳/۷۵	۴۹/۰۹^{a}±۳/۴۲	۵۱/۸۳^{a}±۴/۱۱	۴۳/۷۳^{ab}±۳/۷۴	۳۸/۲۷^{b}±۲/۶۸
اسپرم‌های ناهنجار (٪)	۲۲/۲±۶۲/۲۱	۲۱/۱±۰۷/۸۵	۲۰/۱±۲۳/۹۱	۱۹/۱±۴۲/۶۱	۱۹/۱±۳۵/۵۸	۲۱/۲±۷۱/۰۴

*حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح است (P<۰/۰۵)

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

امروزه می‌توان اسپرم اکثر گونه‌های حیوانی را با حفظ نرخ باروری قابل قبول بعد از یخ‌گشایی، می‌تواند به‌طور نامحدود در دمای ۱۹۶- درجه‌سانتی‌گراد نیتروژن مایع ذخیره نمود (Hammerstedt و همکاران، ۱۹۹۰). اما در طی انجماد تعداد زیادی از اسپرم‌ها به‌دلیل تنش‌های سرمایی، فیزیولوژیکی و شیمیایی توانایی بارور کردن تخمک را از دست می‌دهند (Chatterjee و همکاران، ۲۰۰۱). بنابراین حفظ کیفیت و باروری اسپرم‌ها در این تکنیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و موفقیت انجماد بستگی به عواملی مانند روش انجماد، نوع رقیق‌کننده، سرعت سردسازی، سرعت انجماد و سرعت یخ‌گشایی دارد (Clulowوهمکاران، ۲۰۰۸؛ Andrabi وهمکاران، ۲۰۰۷).رادیکال‌های آزاد به‌ویژه ROS ترکیبات تنش‌زایی هستند که پراکسیداسیون چربی، آسیب‌های DNA و آسیب‌های پروتئین‌های اسپرم را باعث شده و در نهایت منجر به مرگ سلول اسپرم می‌شوند (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۴). به‌دلیل تنش‌های وارد شده به اسپرم (مانند شوک سرمایی) در مراحل مختلف نگه‌داری و انجماد اسپرم، سطح رادیکال‌های آزاد سلول اسپرم افزایش یافته که در نهایت با ایفای تغییرات مخرب فیزیولوژیکی و شیمیایی در سطح غشای اسپرم، بر تحرک و کنش اسپرم تأثیر منفی خواهند داشت (Chatterjee و همکاران، ۲۰۰۱). در پلاسمای منی یک‌منبع مهم آنتی‌اکسیدانی وجود دارد که اسپرم‌ها را درطی فرآیند انجماد، در مقابل تنش‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند. این آنتی‌اکسیدان‌ها شامل آنتی‌اکسیدان آنزیمی مانند آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز/گلوتاتیون ردوکتاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مثل آسکوربات، ویتامین E، پیروات، گلوتاتیون، آلبومین، ویتامین A می‌باشند. در زمان انجماد، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی به‌دلیل رقیق‌سازی، کاهش یافته و به همین دلیل از آنتی‌اکسیدان‌های خارجی علاوه بر آنتی‌اکسیدان‌های موجود در پلاسمای منی در رقیق‌کننده‌ها استفاده می‌شود (Bilodeau وهمکاران، ۲۰۰۰). مطالعات نشان می‌دهند که افزودن آلفا توکوفرول، آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربیک اسید به‌دلیل داشتن‌خاصیت‌آنتی‌اکسیدانی، اسپرم‌ها را در برابر تنش‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند (Malo و همکاران، ۲۰۱۱). هم‌چنین نشان داده شده است که ویتامین E و ویتامین C در رقیق‌کننده به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نقش موثری در کاهش رادیکال‌های آزاد دارند، اما به‌دلیل ترکیبات سمی موجود در برخی آنتی‌آکسیدان‌های سنتتیک‌و صرفه اقتصادی، امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است (Yanishlieva و همکاران، ۱۹۹۶). ترکیبات فنولیک مانند فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و دی‌ترپن‌های فنولیک در گیاهان خواص آنتی‌اکسیدانی دارند که باعث کاهش رادیکال‌های آزاد از سلول و تجزیه عوامل پراکسید می‌شوند (Malo و همکاران، ۲۰۱۰). بسیاری از گونه‌های گیاهی به‌خصوص گونه‌هایی هم‌چون نعناع فلفلی، مرزنگوش، مرزه، مریم گلی، آویشن و رزماری که به خانواده نعناعیان تعلق دارند، علاوه بر دارا بودن مقادیر زیادی از ترکیبات فنولیک، حاوی سطوح بالایی از ویتامین‌های C، E و کاروتنوئیدها هستند که این ترکیبات نقش بسیار مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد به‌ویژه ROS دارند (Javanmardi و همکاران، ۲۰۰۳).

در این مطالعه افزودن عصاره نعناع فلفلی به رقیق‌کننده منی قوچ، موجب بهبود پارامترهای تحرک کل، تحرک پیش‌رونده و دیگر پارامترهای حرکتی اسپرم نسبت به گروه شاهد شد. می‌توان گفت عصاره این گیاه با مهار تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد به‌خصوص گونه‌های‌مختلف اکسیژن واکنشی(ROS)موجب بهبودتحرک‌اسپرم‌ها شده است. یک ارتباط قوی بین تولید ROS و کاهش تحرک اسپرم وجود دارد، به‌طوری‌که مشخص شده است رادیکال پراکسید هیدروژن می‌تواند‌در‌سراسر غشای اسپرم پخش‌شده‌و فعالیت برخی از آنزیم‌های حیاتی مانند آنزیم گلوگز-۶ فسفات دهیدروژناز را مهار کند. این آنزیم، غلظت گلوگز را از طریق منحرف کردن مسیر هگزوز مونو فسفات و فعالیت NADPH کنترل می‌کند که این‌ها نقش اساسی در تولید ATP و تحرک اسپرم دارند (Aitken و همکاران، ۲۰۰۳). عملکرد مثبت عصاره این گیاه محدود به بهبود معنی‌دار پارامترهای تحرک نبود و در کنار آن، در سطوح ۴ و ۸ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر موجب بهبود درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی در مقایسه با گروه شاهد شد. هم‌چنین افزودن ۴ و ۸ میلی‌لیتر عصاره موجب بهبود یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها نیز شد و غشای پلاسمایی اسپرم‌ها را از آسیب‌های ناشی از فرآیند انجماد حفظ نمود. هم‌چنین در این آزمایش استفاده مقادیر بیش‌تر از ۱۶ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر ازعصاره نعناع فلفلی در رقیق‌کننده اثرات منفی روی بیش‌تر پارامترهای مورد بررسی داشت که احتمالاً به‌دلیل تغییرات اسمزی، pH و به‌هم خوردن تعادل ترکیبات رقیق‌کننده باشد، زیرا به‌هم خوردن میزان گلیسرول و زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده، که به‌عنوان محافظت‌کننده و نگه‌دارنده اسپرم‌ها از شوک سرمایی در طی فرآیند انجماد محسوب می‌شوند، باعث کاهش عملکرد و زنده‌مانی اسپرم‌ها خواهد شد. هم‌چنین افزودن سطوح بالای عصاره، با مهار بیش از حد فعالیت آنزیم‌های دخیل در اکسیداسیون و احیا و به‌هم زدن تعادل بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تولید رادیکال‌های آزاد باعث کاهش عملکردهای اسپرم می‌شوند (Roca و همکاران، ۲۰۰۴). مشخص شده است که ترکیبات فنولیک (به‌ویژه فلاونوئیدها) قادرند با

www.SID.ir

Archive of SID

پوشش دادن لیپیدها روند پراکسیداسیون لیپیدی را تغییر داده و متوقف کنند و هم‌چنین، با کاهش سیالیت غشاهای سلولی و جلوگیری از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و محدود کردن پراکسیداسیون فسفولیپیدها و اسیدهای چرب غیراشباع، از غشاهای سلولی محافظت کنند (Blokhina و همکاران، ۲۰۰۳). اطلاعات محدودی در مورد اثرات آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی (گیاهی) در فرآوری اسپرم حیوانات اهلی وجود دارد. مشخص شده که افزودن عصاره آبی گیاه رزماری به محیط رقیق‌کننده منی تأثیر بالقوه‌ای روی پارامترهای تحرک و درصد زنده‌مانی اسپرم خوک داشته و غلظت مالون‌دی‌آلدهید را، که از عوامل اکسیداسیونی مخرب به‌شمار می‌رود، به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد و از اسپرم‌ها در برابر تنش اکسیداتیو محافظت کند(Malo و همکاران، ۲۰۱۱). در مطالعه مشابهی، افزودن عصاره آبی گیاه رزماری به رقیق‌کننده حاوی منی بز، موجب بهبود پارامترهای تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و کاهش میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم‌ها شده و می‌تواند اسپرم‌های بز را در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد حفظ کند (Zanganeh و همکاران، ۲۰۱۳). هم‌چنین در پژوهش Khodaei و همکاران (۲۰۱۴) عصاره آبی گیاه رزماری توانست پارامترهای تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم قوچ را بهبود دهد. در مطالعه دیگر، افزودن ۲ و ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره الکلی گیاه مرزنگوش به رقیق‌کننده منی گاو، پارامترهای حرکتی اسپرم، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی را بهبود داد (Daghigh Kia و همکاران، ۲۰۱۶). نتایج افزودن عصاره گیاه نعناع فلفلی به رقیق‌کننده و اثر آن بر پارامترهای تحرک، زنده‌مانی و تست HOS در این مطالعه با نتایج مطالعه Malo و همکاران (۲۰۱۱)، Zanganeh و همکاران (۲۰۱۳)، Khodaei و همکاران(۲۰۱۴) و Daghigh Kia و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشت.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن سطوح ۴ و ۸ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره، اثر مثبتی بر بسیاری از پارامترهای حرکتی اسپرم‌ها، درصد زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها داشت. این تأثیرات مثبت را می‌توان به‌وجود ترکیبات متعدد پلی‌فنولیک نسبت داد که اثر آنتی‌اکسیدانی آن‌ها توسط اکثر مطالعات اثبات شده است. افزودن عصاره نعناع فلفلی در غلظت بالاتر از ۱۶ میلی‌لیتر به رقیق‌کننده، اثرات منفی برجا گذاشت. با توجه به فراوانی گیاهان با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در بیش‌تر مناطق جهان استفاده از این گیاهان بسیار مقرون به‌صرفه است. از طرفی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک در فرایند انجماد اسپرم هزینه‌های زیاد و گاهاً اثرات مضری روی اسپرم‌ها و توان باروری آن‌ها دارند. بنابراین عصاره گیاه نعناع فلفلی می‌تواند جایگزین برخی آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک در فرایند رقیق‌سازی و انجماد اسپرم شود. با توجه به نتایج به‌دست آمده استفاده از سطح ۸ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر از عصاره گیاه نعناع فلفلی در رقیق‌کننده اسپرم قوچ قابل پیشنهاد است.

منابع

۱. **Agarwal, A.; Nallella, K.P.; Allamaneni, S.S. and Said, T.M., 2004.** Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reproductive BioMedicine Online. Vol. 8, pp: 616-627.

۲. **Aitken, R.J. and Sawyer, D., 2003.** The human spermatozoon not waving but drowning. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 518, pp: 85-9۸.

۳. **Andrabi, S.M.H., 2007.** Fundamental principles of cryopreservation of Bos taurus and Bos indicus bull spermatozoa. Mini review. Int. International Journal of Agriculture and Biology. Vol. 9, pp: 367-3٦٩.

۴. **Arora, A.; Nair, G.M. and Strasburg, M.G., 1998.** Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. Free Radical Biology & Medicine. Vol. 24, pp: 1355-1363.

۵. **Bailey, J.L.; Bilodeau, J.F. and Cormier, N., 2000.** Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. Journal of Andrology. Vol. 21, pp: 1-7.

۶. **Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S., 2011.** Impacts of oxidative stress and Antioxidants one semen functions. Veterinary medicine international. Article ID. 686137, pp: 1-7.

۷. **Bilodeau, J.F.; Chatterjee, S.; Sirard, M.A. and Gagnon, C., 2000.** Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Molecular Reproduction and Development. Vol. 55, pp: 282-288.

۸. **Blokhina, O.; Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V., 2003.** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany. Vol. 91, 179 p.

۹. **Chatterjee, S.; Lamirande, E. and Gagnon, C., 2001.** Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. Molecular Reproduction and Development. Vol. 60, pp: 498-506.

۱۰. **Clulow, J.R.; Mansfield, L.J.; Morris, L.H.A.; Evans, G. and Maxwell, W.M.C., 2008.** A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa, Animal Reproduction Science. Vol. 108, pp: 298-308.

۱۱. **Daghigh Kia, H.; Farhadi, R.; Ashrafi, I. and Mehdipour, M., 2016.** Anti-oxidative effects of ethanol extract of *origanum vulgare* on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved Holstein bull spermatozoa. Iranian Journal of Applied Animal Science. Vol. 6, No. 4, pp:783-789.

۱۲. **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. Vol. 17, No. 12, pp: 98-105.

۱۳. **Hadian, J.; Ghasemnezhad, M. and Ranjbar, H., 2008.** Antifungal potency of some essential oils in control of postharvest decay of strawberry caused by Botrytis cinerea, Rhizopus stolonifer and Aspergillus niger. Journal of Essential Oil Research. Vol. 11, pp: 553-5٦٢.

۱۴. **Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K. and Nolan, J.P., 1990.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we

www.SID.ir

Archive of SID

ask them to survive. Journal of Andrology. Vol. 11, pp: 73-88.

۱۵. **Javanmardi, J.; Stushnoffb, C.; Lockeb, E. and Vivancob, J.M., 2003.** Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. Food Chemistry. Vol. 83, pp: 547-555.

۱۶. **Khodaei Motlagh, M.; Sharafi, M.; Zhandi, M.; Mohammadi-Sangcheshmeh, A.; Shakeri, M.; Soleimani, M. and 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. Vol. 69, pp: 217–222

۱۷. **Kurşat, M.; Emre, I.; Yilmaz, Ö. and Erecevit, P., 2011.** Antioxidant and antimicrobial activity in the seeds of *Origanum vulgare* L. subsp. gracile (C. Koch) Ietswaart and *Origanum acutidens* (Hand. -Mazz.) Ietswaart from Turkey. Grasas y Aceites. Vol. 62, No, 4, pp: 410-4۱۷.

۱۸. **Lessard, C.; Parent, S.; Leclerc, P.; Bailey, J.L. and Sullivan, R., 2000.** Cryopreservation Alters the Levels of the Bull Sperm Surface Protein P25b. Journal of Andrology. Vol. 21, pp: 700-707.

۱۹. **Lotfipour, F.; Samiee, M. and Nazemiyeh, H., 2007.** Evaluation of the antibacterial activity of Salvia sahendica and Phlomis caucasica. Pharmaceutical sciences, Journal of Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences. Vol. 1, pp: 29-34.

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

۲۱. **Malo, C.; Gil, L.; Cano, R.; Martínez, F. and Galé, I., 2011.** Antioxidanteffect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology. Vol. 75, pp: 1735-1741.

۲۲. **Rice-Evans, C.; Miller, N.J. and Paganga, G., 1997.** Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Sciences. Vol. 2, pp: 152-1۵۹.

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

۲۴. **Sikka, S.C., 2001.** Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Current Medicinal Chemistry. Vol. 8, pp: 851-862.

۲۵. **Talpur, A.D., 2014.** Mentha piperita (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, Lates calcarifer (Bloch) against Vibrio harveyi infection. Aquaculture. Vol. 420, pp: 71-7۸.

۲۶. **Vahedi, V.; Hedayat Evrigh, N.; Behroozlak, M. and Dirandeh E., 2018.** Antioxidant effects of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extract on ram sperm quality during cryopreservation. Vol. 8, No. 2, pp: 263-2۶۹

۲۷. **Yanishlieva, N.V. and Marinova, E.M., 1996.** Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung. Vol. 203, No. 3, pp: 220-223.

۲۸. **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. Vol. 114, No. 1, 120 p.

www.SID.ir