نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۰؛ ۱۵(۲): ۶۹-۷۶.

# کاهش اثرات استرس حاد بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی‌شده خروس با افزودن عصاره‌های هیدروالکی رزماری و رازیانه در رقیق‌کننده انجمادی

مهدی ابراهیمی[۱]، امیرکریمی[۲*]، ذبیح اله نعمتی[۲]، محمدرضا شیخلو[۲]، نامدار کامرانی[۱]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، فیزیولوژی دام، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز- ایران.
۲. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز- ایران.

**دریافت:** ۲۲ شهریورماه ۱۳۹۹ **پذیرش:** ۲۰ اسفندماه ۱۳۹۹

**چکیده**

هدف این آزمایش بررسی افزودن عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان رزماری و رازیانه در رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های تحت تنش حاد اکسیداتیو بود. ۲۴ قطعه خروس سویه راس ۳۰۸ به طور تصادفی در دو دسته بدون تنش (کنترل) و تحت تأثیر تنش اکسیداتیو با تزریق دگزامتازون به صورت زیرجلدی در سه نوبت بصورت یک روز در میان و به مقدار ۴ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در یک هفته (دگزا) تقسیم شدند. منی گرفته شده پرندگان هر گروه مخلوط و برای اعمال برنامه انجمادی، به عنوان گروه‌های آزمایشی به این شرح استفاده شد: ۱) گروه کنترل (بدون استرس و مکمل‌سازی رقیق‌کننده با عصاره)، ۲) گروه دریافت‌کننده دگزامتازون (دگزا)، ۳) گروه عصاره هیدروالکلی رزماری به مقدار ۱۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر رقیق‌کننده گروه کنترل (کنترل+رزماری)، ۴) گروه عصاره هیدروالکلی رزماری به مقدار ۱۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر رقیق‌کننده گروه دگزامتازون (دگزا+رزماری)، ۵) گروه عصاره هیدروالکلی رازیانه به مقدار ۶ میلی‌گرم در دسی‌لیتر رقیق‌کننده گروه کنترل (کنترل+رازیانه) و ۶) گروه عصاره هیدروالکلی رازیانه به مقدار ۶ میلی‌گرم در دسی‌لیتر رقیق‌کننده گروه دگزامتازون (دگزا+رازیانه). نتایج نشان داد تنش ایجادشده موجب کاهش فرآسنجه‌های حرکتی و بیوشیمیایی اسپرم شد ($P<0/05$). زنده‌مانی و یک‌پارچگی غشای اسپرم در گروه‌های کنترل+رزماری و کنترل+رازیانه نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی بالاتر بود ($P<0/05$)، همچنین افزودن عصاره‌های رزماری و رازیانه در گروه‌های دریافت‌کننده دگزا، موجب بهبود فرآسنجه‌های مذکور و نیز تحرک کل و پیش‌رونده در اسپرم پرندگان مذکور گردید ($P<0/05$). به طور کلی نتایج نشان داد مکمل‌سازی رقیق‌کننده اسپرم با عصاره‌های رزماری و رازیانه می‌تواند موجب بهبود کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی خروس‌های پرورش یافته تحت تنش حاد گردد.

**واژه‌های کلیدی:** خروس، دگزامتازون، عصاره رازیانه، عصاره رزماری، کیفیت اسپرم.

## مقدمه

هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی از کورتکس غده فوق کلیوی آزاد می‌شوند و برای کنترل هموستازی کل بدن ضروری هستند و نقش مهمی در پاسخ به استرس‌ها دارند (۷). مطالعه قبلی نشان داده است که استفاد از گلوکوکورتیکوئیدهای سنتتیک در رژیم غذایی سبب استرس اکسیداتیو در جوجه‌ها و تغییر بیان ژن در سلول-های ایمنی بدن می‌شود (۲۷). در این خصوص، دگزامتازون یک گلوکوکورتیکوئید مصنوعی است که اثرات کورتیزول را تقلید می‌کند و به طور گسترده‌ای برای ایجاد مدل استرس استفاده شده است (۱۶). استفاده از دگزامتازون موجب تولید مقادیر زیادی از ROS (گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن) می‌شود که موجب تنش اکسیداتیو در حیوانات می‌گردد (۱۳). طی مطالعه‌ای در خروس‌هایی که دگزامتازون دریافت کرده بودند، آسیب‌های اکسیداتیو به بیومولکول‌های حیاتی وارد آمد و موجب مرگ سلولی - گردید (۲۰)، همچنین تنش‌های اکسیداتیو، اصلی‌ترین عامل طی فرآیند انجماد-ذوب در فرآیند تلقیح مصنوعی



* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: pekarimi@tabrizu.ac.ir

است که موجب ایجاد تغییرات بیوفیزیکی در سلول اسپرم شده و در نتیجه آن، غشای پلاسمایی اسپرم آسیب خواهد دید (۵). مطالعه نشان می‌دهد که در طول فرآیند انجماد-یخ‌گشایی با افزایش سطح گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن، اسیدهای چرب غیراشباع غشای پلاسمایی اسپرم مستعد پراکسیداسیون شده و ترکیبات حاصله می‌تواند در ساختار و عمل‌کرد اندامک‌های مهمی مانند غشای پلاسمایی، میتوکندی و DNA اختلال ایجاد کند (۳)؛ بنابراین در این شرایط استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم موثر باشد.

امروزه استفاده از گیاهان دارویی به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است. به دلیل تاثیرات مفید و نیز صرفه اقتصادی، استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی، مورد توجه قرار گرفته است (۱۸). رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis*، یک گیاه دارویی چوبی، معطر و همیشه سبز با برگ‌هایی سوزنی شکل و گل‌های سفید، صورتی، بنفش یا آبی است و وجود ترکیبات اسید کارنوسیک ( Carnosic Acids) و اسید رزمانیک (Rosmanic Acids) باعث خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای این گیاه شده است، لذا از این گیاه به منظور افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی و جلوگیری از فرآیند اکسیداسیون ترکیبات غذایی استفاده می‌گردد (۱۹). گیاه رازیانه نیز با نام علمی *Foeniculum vulgare*، از خانواده چتریان است. در اسانس رازیانه بیش از سی نوع ترکیبات ترپنی یا ترپنوئیدی وجود دارد که مهم‌ترین آن‌ها آنتول (Anethol)، فنچون(Fenchone)، لیمونن (Limonene) و متیل کاویکول ( Methyl Kavykvl) است. (۶)؛ هر دو گیاه یاد شده در مطالعات قبلی برای انجماد اسپرم حیوانات مختلف استفاده شده‌اند، ولی مطالعه‌ای مبنی بر این‌که آیا گیاهان مذکور بر کیفیت انجماد اسپرم حیواناتی که با استرس درگیر بوده‌اند- می-تواند تأثیری داشته باشد یا خیر- وجود ندارد. آزمایش حاضر با هدف بررسی تأثیرگذاری عصاره‌های گیاه رزماری و رازیانه در رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم‌های منجمد-یخ-گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی که تحت استرس اکسیداتیو حاد با تزریق دگزامتازون قرار گرفته بودند، انجام شد.

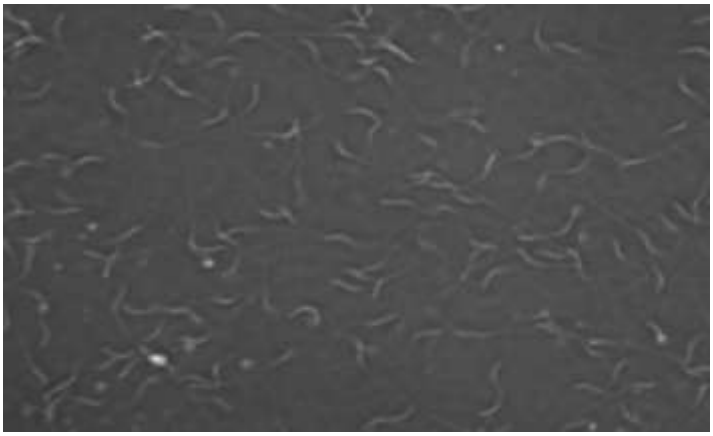
## مواد و روش کار

این پژوهش بر روی ۲۴ پرنده در قالب دو گروه آزمایشی تحت تأثیر تنش اکسیداتیو با تزریق دگزامتازون (دگزا) و بدون تنش اکسیداتیو (کنترل) که به طور تصادفی، تقسیم و در واحد مرغداری دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز نگه‌داری شدند، انجام پذیرفت. در پرندگان گروه دگزا، به منظور اعمال تنش اکسیداتیو به پرندگان، از سه نوبت تزریق زیرجلدی دگزامتازون به مقدار ۴ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در طی یک هفته استفاده گردید (۲۰). در گروه کنترل، جهت از بین اثر استرس ناشی از تزریق، آب مقطر به مقدار ۴ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بصورت یک روز در میان و در ۳ نوبت در طی یک هفته استفاده گردید. خروس‌ها روزانه در دو نوبت صبح و عصر به صورت دستی تغذیه شدند و به صورت اختیاری آب مصرف کردند. نگه‌داری آن‌ها در قفس‌های انفرادی و تحت شرایط، ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی انجام گرفت و با جیره پایه یکسان، تغذیه شدند. پس از اسپرم‌گیری و ارزیابی‌های اولیه، اسپرم‌های با تحرک ۷۰ درصد و غلظت مناسب به عنوان اسپرم‌های طبیعی در نظر گرفته شده و به منظور اعمال برنامه انجمادی، منی پرندگان در هر گروه، باهم مخلوط و در قالب گروه‌های آزمایشی زیر در رقیق‌کننده بلتسویل بهبودیافته مورد استفاده قرار گرفتند (۲۲). تیمارهای آزمایشی اعمال شده طی برنامه انجماد عبارت بودند از: ۱) گروه کنترل، ۲) گروه دریافت‌کننده دگزامتازون (دگزا)، ۳) گروه آزمایشی عصاره هیدروالکلی رزماری در رقیق‌کننده گروه کنترل (کنترل+رزماری)، ۴) گروه آزمایشی عصاره هیدروالکلی رزماری در رقیق‌کننده گروه دگزامتازون (دگزا+رزماری)، ۵) گروه آزمایشی عصاره هیدروالکلی رازیانه در رقیق‌کننده گروه کنترل (کنترل+رازیانه) و ۶) گروه آزمایشی عصاره هیدروالکلی رازیانه در رقیق‌کننده گروه دگزامتازون (دگزا+رازیانه). پس از آماده کردن و رقیق‌سازی نمونه‌ها، جهت سردسازی و انجماد-یخ‌گشایی از روش انجماد Amini و همکاران در سال ۲۰۱۵ استفاده گردید (۱). بدین ترتیب که، نمونه-های منی که به منظور حذف اثرات فردی مخلوط شده بودند، به‌نسبت ۱به۲۰ به‌محیط رقیق‌کننده افزوده و درون

یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، انتقال داده شدند. پس از ۲ ساعت و رسیدن دمای نمونه‌ها به ۴ درجه سانتی‌گراد، اسپرم‌ها بصورت دستی داخل پایوت‌ها کشیده و با خمیر هماتوکریت مهر و موم شدند. پایوت‌های دارای اسپرم، در ارتفاع ۴ سانتی‌متر بالای بخار ازت به مدت ۷ دقیقه قرار داده شدند و سپس برای ذخیره‌سازی به داخل تانک ازت (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) انتقال داده شدند تا پروسه انجماد اسپرم‌ها تکمیل گردد.

گیاهان رزماری و رازیانه مورد نیاز با نظر استادان گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر و دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه گردید و تحت شرایط استاندارد در سایه خشک و با آسیاب برقی (MF10, IKA, Germany) پودر شد. ۵۰۰ گرم از پودر گیاه با ۱ لیتر الکل ۷۰ درصد (Merck, Germany) مخلوط گردید و پس از ۴۸ ساعت محلول صاف شده با کاغذ صافی واتمن، به بالن دستگاه روتاری منتقل گردید. در ادامه حلال (الکل) با روتاری ( Rotavapor® R-100, UK) در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و دور متوسط خارج گردید و مخلوط به دست آمده را برای جدا سازی حلال به دستگاه تقطیر در خلأ منتقل و محتویات هر ارلن جداگانه تقطیر گردید؛ این تقطیر تا زمان اتمام حلال موجود در مخلوط ادامه پیدا کرد(۲). عصاره هیدروالکلی به دست آمده توزین شد و مقدار آن در ۱۰۰ گرم گیاه استفاده شده برای رازیانه معادل ۵/۳ گرم و برای رزماری ۱۱/۴ گرم بود.

پس از یخ‌گشایی، فرآسنجه‌های حرکتی اسپرم از قبیل تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، با سیستم آنالیز رایانه‌ای مجهز به میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ ارزیابی شدند. سه پایوت از هر تکرار، یخ‌گشایی و به داخل میکروتیوب‌ها انتقال داده شد، ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی را با سمپلر برداشته و آن را روی چمبر ریخته و یک لامل تمیز روی آن قرار داده شد و فرآسنجه‌های جنبایی اسپرم با سیستم کامپیوتری CASA ارزیابی شد(شکل۱). به منظور ارزیابی زنده‌مانی اسپرم‌ها از رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین استفاده شد (۱۲). ارزیابی یک‌پارچگی غشای پلاسمایی با کمک تست هایپواسموتیک (HOST) بررسی شد (شکل۲)، (۲۵).



**شکل ۱**- فرآسنجه‌های حرکتی اسپرم با سیستم آنالیز رایانه‌ای مجهز به میکروسکوپ فاز کنتراست ارزیابی شدند.

**شکل ۲**- ارزیابی یک‌پارچگی غشای پلاسمایی با کمک تست هایپواسموتیک (A) و بررسی زنده‌مانی اسپرم‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین(B)

گلوتاتیون پراکسیداز با کیت تجاری زل‌بیو ( Zellbio GmbH, Germany) انجام شد و مقادیر ضرایب تغییرات سنجش داخل و بین اندازه‌گیری‌ها به ترتیب ۳/۵ و ۴/۷ بود. کلیه خوانش‌ها با دستگاه اتوآنالایزر (آلسیون ۳۰۰) و در آزمایشگاه مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های جمع‌آوری شده از گروه‌های آزمایشی، با نرم افزار SAS 9/1، در قالب طرح کاملا تصادفی تحت رویه GLM و براساس مدل آماری زیر در سطح معنی‌داری ۵ درصد با آزمون دانکن، تجزیه و تحلیل شدند.

$$Y_{ij}=\mu+T_i+e_{ij}$$

در این مدل، $Y_{ij}$= مقدار عمل‌کرد صفت وابسته‌ی نمونه‌ی j ام در تیمار i ام، μ= میانگین کل گروه، $T_i$= اثر گروه آزمایشی و $e_{ij}$= اثرات باقی‌مانده، هستند. مقایسه دو گروه آزمایشی کنترل و دریافت‌کننده دگزامتازون قبل از انجماد، با کمک آزمون t-Test و در سطح معنی‌دار پنج درصد انجام شد.

## نتایج

بررسی قبل از انجماد اسپرم پرندگان در دو گروه کنترل و کنترل همراه با دگزامتازون در جدول ۱ نمایش داده شده است. نشان داد که مقدار تحرک کل و تحرک پیشرونده در گروه کنترل نسبت به گروه دریافت کننده دگزامتازون به طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۵).

برای اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید، مقدار یک میلی‌لیتر از منی رقیق شده با یک میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۹ درصد مخلوط شد و سپس نمونه‌ها با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و به تعداد سه بار با بافر سیترات شست و شو و مجدداً سانتریفیوژ شدند. در نهایت محلول رویی دور ریخته شده و رسوب باقی‌مانده اسپرم‌ها در یک میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد و تا زمان انجام تست، نمونه‌ها در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. برای اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدئید مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه را برداشته و با یک میلی‌لیتر محلول اسید تری‌کلریدریک ۲۰ درصد و تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد مخلوط شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد، سپس نمونه‌ها بعد از سرد شدن در داخل یخ، به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در پایان عدد جذب مالون دی‌آلدئید محلول بالایی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۸۶ نانومتر خوانده و غلظت مالون دی آلدئید ثبت شد (۲۴). به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و اندازه‌گیری ظرفیت کل آنتی اکسیدانی، از کیت‌های تجاری شرکت طب پژوهان (ایران-تهران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. بدین ترتیب که، ضرایب تغییرات سنجش داخل و بین اندازه‌گیری‌ها به ترتیب ۵/۷ و ۳/۷ درصد برای ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و ۸/۰ و ۷/۱ درصد برای سنجش سوپراکسیددیسموتاز بود. سنجش فعالیت

**جدول ۱**- تأثیر تزریق دگزامتازون روی کیفیت اسپرم خروس‌های گله مادر گوشتی.

| پارامترها | شاهد | دگزامتازون |
|---|---|---|
| جنبایی کل(درصد) | ۸۹/۴[a] | ۶۲/۲[b] |
| جنبایی پیش‌رونده(درصد) | ۴۲/۵۳[a] | ۲۷/۰۳[b] |

*وجود حروف ناهم‌نام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد طی آزمون t-Test، در فرآسنجه مورد نظر است.

نتایج تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین‌های مربوط به فرآسنجه‌های حرکتی بین گروه‌های مختلف آزمایشی بعد از انجماد، در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو ایجاد شده به طور مستقیم روی اسپرم تأثیر گذاشته است و موجب کاهش چشم‌گیر تحرک کل در گروه دریافت‌کننده دگزامتازون نسبت به گروه کنترل گردید و مکمل‌سازی رقیق‌کننده گروه کنترل با رزماری و رازیانه اختلاف معنی-

داری در تحرک کل و پیش‌رونده ایجاد نکرد. مکمل‌سازی رقیق‌کننده با رزماری و رازیانه در گروه دگزامتازون توانست بخشی از اثرات مخرب ایجاد شده توسط دگزامتازون- که موجب کاهش در تحرک شده است- را جبران کند، ولی در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی-داری داشته و عمل‌کرد ضعیف‌تری نشان داد (P<۰/۰۵). بیشترین تحرک پیش‌رونده در گروه رقیق‌کننده مکمل-سازی شده با رزماری، مشاهده گردید که با سایر گروه‌های آزمایشی بجز گروه کنترل مکمل‌سازی شده با رازیانه تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). با توجه به جدول ۲ مشاهده شد که دگزامتازون تزریق شده، تحرک پیش‌رونده را تحت تأثیر قرار داده و موجب کاهش شدید فرآسنجه مذکور در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی شد. تحرک پیش‌رونده اسپرم در بین دو گروه دریافت‌کننده دگزامتازون که با رزماری و رازیانه مکمل‌سازی شده بودند با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان ندادند، ولی نسبت به گروه دریافت‌کننده دگزامتازون (دگزا)، عمل‌کرد بهتری داشتند که بیانگر تأثیر مثبت این دو عصاره بر این فرآسنجه است. بررسی داده‌های مربوط به بررسی یک‌پارچگی غشای پلاسمایی (جدول ۲)، نشان داد که این شاخص به شدت تحت تأثیر تزریق دگزامتازون قرار گرفت که اختلاف معنی‌داری هم با سایر گروه‌های آزمایشی نشان می‌دهد. بیشترین درصد یک‌پارچگی غشا در گروه کنترل+رزماری مشاهده شد، ولی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های عصاره رازیانه در رقیق‌کننده گروه کنترل (کنترل+رازیانه)، عصاره رزماری در رقیق‌کننده گروه دگزامتازون مشاهده نشد (P>۰/۰۵). بیشترین درصد زنده‌مانی در گروه‌های مکمل‌سازی رزماری و رازیانه در رقیق‌کننده گروه کنترل (P<۰/۰۵) بود، در حالی‌که گروه دریافت‌کننده دگزامتازون کمترین مقدار شاخص مذکور را داشت (P<۰/۰۵). مکمل‌سازی رزماری و رازیانه در رقیق‌کننده گروه دریافت‌کننده دگزامتازون اختلافی با یکدیگر در زنده‌مانی اسپرم نداشتند (P>۰/۰۵)، ولی در مقایسه با گروه دریافت‌کننده دگزامتازون -که هیچ‌گونه مکمل‌سازی نداشت- موجب بهبود زنده‌مانی اسپرم شده بودند (P<۰/۰۵).

**جدول ۲**- اثر مکمل‌سازی عصاره‌های گیاهی رزماری و رازیانه در رقیق‌کننده بلتسویل بهبودیافته، بر فرآسنجه‌های حرکتی، یک‌پارچگی غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی تحت استرس اکسیداتیو.

| فرآسنجه | تیمارها[1] (درصد) | | | | | | خطای استاندارد |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | کنترل | کنترل+دگزا | کنترل+رزماری | دگزا+رزماری | کنترل+رازیانه | دگزا+رازیانه | |
| تحرک کل | ۶۸/۸۶$^{ab}$ | ۴۹/۱۶$^{d}$ | ۷۳/۲۶$^{a}$ | ۵۶/۵۳$^{c}$ | ۶۵/۷۰$^{b}$ | ۵۴/۱۶$^{c}$ | ۰/۹۰ |
| تحرک یشرونده | ۲۶/۳۳$^{b}$ | ۱۲/۴۶$^{d}$ | ۳۱/۹۰$^{a}$ | ۱۷/۶۶$^{c}$ | ۲۹/۹۶$^{ab}$ | ۱۷/۰۳$^{c}$ | ۰/۸۶ |
| یکپارچگی غشای پلاسمایی | ۵۸/۵$^{bc}$ | ۵۰/۲۶$^{d}$ | ۶۴/۶۰$^{a}$ | ۵۸/۰۳$^{bc}$ | ۶۱/۱۰$^{b}$ | ۵۷/۳۰$^{c}$ | ۰/۷۷ |
| زنده‌مانی | ۶۳/۶۸$^{b}$ | ۵۰/۸۴$^{d}$ | ۶۹/۱۶$^{a}$ | ۵۵/۵۶$^{c}$ | ۶۸/۶۶$^{a}$ | ۵۵/۰۰$^{c}$ | ۰/۸۶ |

[a,b,c,d] حروف متفاوت در هر ستون بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۰۰۱).

تولید مالون دی‌آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در جدول ۳ نشان داده شده است. اسپرم خروس‌های دریافت‌کننده دگزامتازون، دارای بیشترین مقدار تولید مالون دی‌آلدهید بود (P<۰/۰۵). گروه کنترل که هیچ‌گونه افزودنی در رقیق‌کننده نداشت نیز دارای مالون دی آلدهید بالایی بود. مکمل‌سازی رقیق-کننده‌ی گروه کنترل با رزماری و رازیانه کمترین مقدار مالون دی‌آلدهید را داشتند (P<۰/۰۵)؛ لازم به یادآوری است که گروه‌های دگزا+رزماری و دگزا+رازیانه نسبت به گروه کنترل، مالون دی‌آلدهید پایین‌تری داشتند (P<۰/۰۵). ظرفیت کل آنتی اکسیدانی در گروه دریافت-کننده دگزامتازون شدیدا کاهش یافت و کمترین مقدار را در بین گروه‌ها داشتند (P<۰/۰۵). بیشترین مقدار ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های کنترل که رقیق‌کننده آن-ها با رزماری و رازیانه مکمل‌سازی شده بود، مشاهده گردید (P<۰/۰۵). سوپراکسید دیسموتاز نیز به عنوان بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانی طبیعی اسپرم در گروه-های کنترل مکمل‌سازی شده با رزماری و رازیانه دارای بیشترین مقدار است و اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). در مورد این شاخص نیز

کمترین مقدار تولید شده مربوط به گروهی است که خروس‌های آن تحت تأثیر تنش حاد اکسیداتیو از طریق تزریق دگزامتازون قرار گرفته بودند که نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی به طور معنی‌داری پایین‌تر است (P<۰/۰۵). بین گروه‌های رزماری و رازیانه که به رقیق‌کننده خروس‌های دریافت‌کننده دگزامتازون افزوده شده‌اند نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

**جدول ۳**- اثر مکمل‌سازی عصاره‌های گیاهی رزماری و رازیانه در رقیق‌کننده بلتسویل بهبودیافته، بر شاخص‌های بیوشیمیایی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس‌های مادر گوشتی تحت استرس اکسیداتیو.

| فرآسنجه | تیمارها | | | | | | خطای |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | کنترل | کنترل+دگزا | کنترل+رزماری | دگزا+رزماری | کنترل+رازیانه | دگزا+رازیانه | استاندارد |
| مالون دی آلدهید (nmol/ ml) | ۶/۹۴$^{b}$ | ۹/۱۱$^{a}$ | ۳/۶۴$^{d}$ | ۴/۸۵$^{c}$ | ۳/۷۶$^{d}$ | ۴/۸۵$^{c}$ | ۰/۴۲ |
| ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی (U/ml) | ۱/۱۶$^{d}$ | ۱/۰۱$^{e}$ | ۱/۷۴$^{a}$ | ۱/۵۶$^{bc}$ | ۱/۶۶$^{ab}$ | ۱/۴۴$^{c}$ | ۰/۱۵ |
| گلوتاتیون پراکسیداز (U/ml) | ۵۵/۶۹$^{ab}$ | ۴۶/۱۶$^{b}$ | ۶۰/۱۹$^{a}$ | ۵۴/۳۷$^{ab}$ | ۵۷/۴۳$^{a}$ | ۵۲/۳۷$^{ab}$ | ۱/۳۱ |
| سوپراکسید دیسموتاز (U/ml) | ۱۱۱/۷۲$^{c}$ | ۱۰۳/۴۵$^{d}$ | ۱۴۹/۸۳$^{a}$ | ۱۲۴/۱۵$^{b}$ | ۱۴۲/۹۹$^{a}$ | ۱۲۰/۳۷$^{b}$ | ۱/۱۸ |

$^{a,b,c,d}$ حروف متفاوت در هر ستون بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۰۰۱).

**بحث**

در حین جمع‌آوری مایع منی و روند انجماد-یخ‌گشایی، مایع منی در معرض شوک سرما و اکسیژن جوی قرار دارد که به نوبه خود موجب افزایش حساسیت به پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. غلظت متوسط گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن باعث بی‌تحرکی اسپرم از طریق کاهش ATP داخل سلولی و متعاقباً کاهش در فسفوریلاسیون آکسونمی می‌شود، اما گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن بیش از حد موجب پراکسیداسیون لیپیدها شده و منجر به مرگ سلول‌های اسپرم می‌شود(۲۱). به دلیل محتوای کم سیتوپلاسم در اسپرماتوزوآ، که در مراحل پایانی اسپرماتوژنز از بین می‌رود (۴)، پلاسمای منی مهم‌ترین دفاع را در برابر گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن توسط آنزیم‌های حذف‌کننده گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن از جمله سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز فراهم می‌کند(۲۸). نتایج آزمایش حاضر با نتایج یک پژوهش دیگر موافق است که نشان دادند، استرس اکسیداتیو ایجاد شده با تزریق دگزامتازون، سبب کاهش تحرک اسپرم، افزایش سلول‌های مرده و کاهش یک‌پارچگی غشای پلاسمایی شده و از طرفی نشان دادند که استرس ممکن است پراکسیداسیون لیپیدها را در پلاسمای منی و همچنین در غشای اسپرماتوزوای بالغ، افزایش دهد و شاهد بر این روند در مطالعه حاضر، افزایش سطح مالون دی‌آلدهید و کاهش سطح آنتی‌اکسیدانی کل در گروه یاد شده است که به طور معنی‌داری از گروه کنترل بالاتر بود (۱۱). گیاهان و عصاره‌های گیاهی دارای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها هستند که به دلیل خواص اکسید و احیاکنندگی، دهنده گروه هیدروکسیل و داشتن خصوصیات کیلات‌کنندگی یون‌های فلزی، نقش مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد به خصوص گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و تجزیه پراکسیدها دارند(۲۶). در پژوهش حاضر نیز با مکمل‌سازی عصاره‌های رزماری و رازیانه در گروه‌های کنترل و دریافت‌کننده دگزامتازون، مشخص بود که سطح آنتی‌اکسیدانی و نیز آنزیم‌های دخیل در این امر (گلوتاتیون پراکسید و سوپراکسید دیسموتاز) به طور نسبی افزایش یافته و موجب افزایش تحرک کل و پیش‌رونده در گروه‌های مذکور گردید. در این زمینه، در مطالعه‌ای نشان داده شده است اثرات آنتی‌اکسیدانی رزماری به واسطه ترکیبات فنولی، موجب افزایش مقاومت سلول‌های کبدی موش در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود(۱۵). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی توجه زیادی را به خود جلب کرده و گزارش شده که در مقایسه با ویتامین E و C آنتی‌اکسیدان‌هایی بسیار قوی هستند(۱۴). میتوکندری اسپرم در ناحیه میانی که روی قسمت اصلی فلاژلوم قرار دارد، انرژی مورد نیاز اسپرم را تأمین می‌کند(۱۰). در آزمایشی که روی اسپرم خوک انجام شد، مشاهده گردید که رزماری استفاده شده در رقیق‌کننده، همانند مطالعه حاضر سبب بهبود زنده-

مانی، تحرک کل و پیش‌رونده گردید، ولی تأثیر چندانی روی یک‌پارچگی غشای پلاسمایی نداشت(۱۹) در حالی که در پژوهش حاضر علاوه بر تحرک، عصاره‌های رزماری و رازیانه سبب بهبود یک‌پارچگی غشای پلاسمایی شده بودند که با مطالعه یاد شده متفاوت بود؛ دلیل این قضیه احیاناً می‌تواند به توانایی بیشتر خوک در تولید آنتی-اکسدان بیشتر موجود در منی باشد و این در حالی است که در پرندگان حجم منی کمتر و در نتیجه مقدار آنتی‌اکسیدان آن کمتر می‌تواند باشد که در این شرایط همراه سازی با یک آنتی‌اکسیدان خارجی می‌تواند تاثیر مثبت در بر داشته باشد (۱۸). در مطالعه دیگری، عصاره رزماری به رقیق کننده انجمادی منی گاو نر اضافه شد و افزایش زنده‌مانی، تحرک و سرعت متوسط مسیر و همچنین کاهش پراکسیداسیون لیپیدها پس از ذوب را در پی داشت(۸). مطالعات قبلی تأثیر عصاره در بهبود آسیب اکسیداتیو را بررسی و بیان کردند که رازیانه این ظرفیت را دارد که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را به میزان قابل توجهی افزایش دهد(۶). آنتول به عنوان جزء قوی آنتی اکسیدانی رازیانه جدا شده است(۹). توانایی احتمالی رازیانه در بهبود انجمادپذیری اسپرم، به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی آن مربوط دانسته اند که مربوط به فلاونوئیدهای موجود در آن است (۲۳). افزایش در زنده-مانی و تحرک اسپرم و کاهش در تولید مالون دی‌آلدهید در اسپرم خوک که رقیق‌کننده آن با عصاره رازیانه مکمل-سازی شده بود، نشان داده شده است (۱۷). مطالعه حاضر نخستین پژوهش در باره استفاده از عصاره گیاهان رازیانه و رزماری در رقیق‌کننده انجمادی اسپرم جمع آوری شده از خروس‌های تحت تنش اکسیداتیو است که طی آن نشان داده شد اضافه‌سازی عصاره‌های گیاهان مذکور در محیط رقیق‌کننده انجمادی توانایی جبران اثرات منفی تنش وارده در اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده را دارد. به طور کلی فرآیند انجمادسازی اسپرم و نیز یخ‌گشایی مجدد آن، یک روند تنش‌زا برای اسپرم همه گونه‌های حیوانی است و در این خصوص تنش‌های اکسیداتیو ایجاد شده در این فرآیند، موجب ایجاد تغییرات بیوفیزیکی به سلول اسپرم شده که در نتیجه آن آسیب غشا پلاسمایی اسپرم را سبب خواهد شد و مرگ سلولی و کاهش قدرت تحرک را در پی خواهد داشت (۵).

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که استفاده از عصاره‌های رزماری و رازیانه در رقیق‌کننده انجمادی بلتسویل بهبودیافته موجب بهبود کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده خروس مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو با تزریق دگزامتازون می‌گردد.

## منابع

1-Amini, M.R; Kohram, H; Zare-Shahaneh, A; Zhandi, M; Sharideh, H; Nabi, M.M; The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. Cryobiology. 2015; 70(3): 226-32.

2-Arabshahi-Delouee, S; Urooj, A; Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves. Food Chem; 2007; 102(4): 1233-40.

3-Bansal, A.K; Bilaspuri, G; Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet. Med. Inter; 2011; 2011: 686137.

4-Ben Abdallah, F; Dammak, I; Attia, H; Hentati, B; Ammar-Keskes, L; Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in infertile men: correlation with semen parameter. Jour. Clin. Lab. Anal; 2009; 23(2): 99-104.

5-Chatterjee, S; de Lamirande, E; Gagnon, C; Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. Mol. Rep. Dev; Incorporating Gam. Res; 2001; 60(4): 498-506.

6-Choi, E.M; Hwang, J.K; Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of Foeniculum vulgare. Fitoterapia. 2004; 75(6): 557-65.

7-Chung, S; Son, G.H; Kim, K; Adrenal peripheral oscillator in generating the circadian glucocorticoid rhythm. Ann. NewYork Aca. Sci; 2011; 1220(1): 71-81.

8-Daghigh-Kia, H; Olfati-Karaji, R; Hoseinkhani, A; Ashrafi, I; Effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) extracts and glutathione antioxidants on bull semen quality after cryopreservation. Spa. Jour. Agri. Res; 2014; 12(1): 98-105.

9-De Martino, L; De Feo, V; Fratianni F, Nazzaro F. Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. Nat. prod. Com; 2009; 4(12): 1741-50.

10-Eddy, E; O'Brien, D; The physiology of reproduction. New York: Raven Press; 1994.

11- Eid, Y; Ebeid, T; Younis, H; Vitamin E supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in chicken semen. Bri. poul. sci; 2006; 47(3): 350-356.

12- Evans, G; Maxwell, W.C; Salamons' artificial insemination of sheep and goats: Butterworths; 1987.

13- Gao, J; Lin, H; Wang, X; Song, Z; Jiao, H; Vitamin E supplementation alleviates the oxidative stress induced by dexamethasone treatment and improves meat quality in broiler chickens. Poul. Sci; 2010; 89(2): 318-27.

14- Ghotbabadi, F.S; Alizadeh, A; Zadehbagheri, M; Kamelmanesh, M.M; Shaabani, M; Phytochemical composition of the essential oil, total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity in Iranian Satureja sahendica Bornm. at different ontogenesis conditions. Jour. Med. Plant. Res; 2012; 6(19): 3525-34.

15- Horváthová, E; Slameňová, D; Navarová, J; Administration of rosemary essential oil enhances resistance of rat hepatocytes against DNA-damaging oxidative agents. Food Chem. 2010; 123(1): 151-156.

16- LaLone, C.A; Villeneuve, D.L; Olmstead, A.W; Medlock E.K; Kahl, M.D; Jensen, K.M; Effects of a glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone, on fathead minnow reproduction ,growth, and development. Env. Toxicol. Chem; 2012; 31(3): 611-22.

17- Malo, C; Gil, L; Cano, R; González, N; Luño, V; Fennel (Foeniculum vulgare) provides antioxidant protection for boar semen cryopreservation. Andrology; 2012; 44: 710-5.

18- Malo, C; Gil, L; Gonzalez, N; Martínez, F; Cano, R; De Blas, I; Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (Rosmarinus officinalis). Cryobiology. 2010; 61(1): 142-7.

19- Malo, C; Gil, L; Cano, R; Martínez, F; Galé, I; Antioxidant effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology. 2011; 75(9): 1735-41.

20- Min, Y; Niu, Z; Sun, T; Wang, Z; Jiao, P; Zi, B; Vitamin E and vitamin C supplementation improves antioxidant status and immune function in oxidative-stressed breeder roosters by up-regulating expression of GSH-Px gene. Poul. Sci; 2018; 97(4): 1238-44.

21- Misro, M; Choudhury, L; Upreti, K; Gautam, D; Chaki, S; Mahajan, A; Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative stress in subjects presenting a normal semen profile. Int. Jour. And; 2004; 27(2): 82-7.

22- Nabi, M.M; Kohram, H; Zhandi, M; Mehrabani-Yeganeh, H; Sharideh, H; Zare-Shahaneh, A; Comparative evaluation of Nabi and Beltsville extenders for cryopreservation of rooster semen. Cryobiology. 2016; 72(1): 47-52.

23- Nickavar, B; Abolhasani, F.A.S; Screening of antioxidant properties of seven Umbelliferae fruits from Iran. Pak. Jou. Pharm. Sci; 2009; 22(1): 30-35.

24- Peris, S.I; Bilodeau, J.F; Dufour, M; Bailey, J.L; Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. Mol. Rep. Dev; 2007; 74(7): 878-92.

25- Revell, S; Mrode, R; An osmotic resistance test for bovine semen. Ani. Rep. Sci; 1994; 36(1-2): 77-86.

26- Sefidkon, F; Jamzad, Z; Chemical composition of the essential oil of three Iranian Satureja species (S. mutica, S. macrantha and S. intermedia). Food Chem; 2005; 91(1): 1-4.

27- Shini, S; Shini, A; Kaiser, P; Cytokine and chemokine gene expression profiles in heterophils from chickens treated with corticosterone. Stress. 2010; 13(3): 185-94.

28- Weir, C.P; Robaire, B; Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat. Jour. And; 2007; 28(2): 229-40.

Vol.15/No.2
Fall-Winter 2021/2022

*Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2022; 15(2): 69-76*

# Reducing the effects of acute stress on frozen-thawed rooster's semen quality with supplementation of rosemary and fennel hydro-alcoholic extract in cryopreservation extender

**Mehdi Ebrahimi[1]; Amir Karimi[*2]; Zabihollah Nemati[2]; Mohammad Reza Sheikhlou[2]; Namdar Kamrani[1]**

1. MSc student, Department of Animal Science, faculty of Ahar Agriculture & Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz- Iran.
2. Department of Animal Science, Faculty of Ahar Agriculture & Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran

***Received:*** 13 September 2020 ***Accepted:*** 11 March 2021

**Summary**

The aim of this study was evaluation of cryo-viability of rooster semen supplemented with Rosemary and Fennel extracts in extender on quality of cryopreserved sperm under acute stress. A total of 24 roosters randomly divided into two groups: without stress (CON) or under oxidative stress, with administration of dexamethasone, 4 mg/Kg body weight, three times, every other day for 1 week, (DEX). Collected semen samples of birds were pooled in each groups and used in one of following treatments: 1) CON: with no extract supplementation or dexamethasone administration, 2) DEX: Dexamethasone group, 3) CON+Ros: semen of control group supplemented with 10 ml rosemary extract per deciliter of extender, 4) DEX+Ros; semen of DEX group supplemented with 10 ml rosemary extract per deciliter of extender, 5) CON+Fen: semen of control group supplemented with 6 ml fennel extract per deciliter of extender and 6) CON+Fen: semen of DEX group supplemented with 6 ml fennel extract per deciliter of extender. Results showed induced stress decreased sperm motility and biochemical parameters ($P<0.05$). Viability and membrane integrity of sperm were higher in CON+Ros and CON+Fen than other experimental groups ($P<0.05$). Similarly, supplementation of extender with rosemary and fennel extract in groups DEX+Fen and DEX+Ros improved mentioned parameters in rooster's semen under physiologic stress. Totally, results showed supplementation of rosemary and fennel extract in cryopreservation extender can improve the quality of frozen-thawed semen in roosters reared under physiologic stress.

**Keywords**: Broiler breeder rooster, Dexamethasone, Fennel extract, Rosemary extract, Sperm quality.

***Corresponding Author:** pekarimi@tabrizu.ac.ir