نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۶ شماره ۴/ سال۱۳۹۵

اثر عصاره مرزنجوش به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ گشایی شده قوچ

حسین دقیق‌کیا[1*]،فاطمه صادقی‌صادق‌آباد[2]، حمید محمدزاده[1]، حسین واثقی‌دودران[3] و ایرج اشرفی[3]

تاریخ دریافت: ۹۵/٦/٢٤ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۳

[1] به ترتیب استاد و استادیارگروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

[2] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

[3] دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبه: Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: در فرآیند انجماد-یخ‌گشایی اسپرم استرس اکسیداتیو موجب کاهش تحرک، زنده‌مانی، عملکردهای غشایی و در نهایت باروری سلول‌های اسپرم می‌شود. **هدف**: هدف این مطالعه بررسی تأثیر عصاره گیاه مرزنجوش به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی بر کیفیت اسپرم قوچ پس از یخ گشایی بود. **روش کار**: در این تحقیق از پنج رأس قوچ قزل دو بار در هفته توسط واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شد. به منظور از بین بردن اثرات فردی دام‌ها انزال‌ها آنها به نسبت مساوی با هم مخلوط شدند. سطوح مختلف عصاره گیاه مرزنجوش (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰ میکرولیتردر میلی لیتر) به رقیق کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ- تریس افزوده شد. نمونه‌ها بعد از طی مراحل سردسازی و پر شدن در پایوت‌ها، در بخار ازت منجمد شده و تا زمان ارزیابی در ازت مایع نگهداری شدند. **نتایج**: افزودن ۱۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر عصاره مرزنجوش باعث بهبود (P<۰/۰۵) صفت تحرک پیش‌رونده نسبت به گروه شاهد شد ولی در سایر صفات حرکتی، زنده-مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی بهبود معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد به همراه نداشته است. به کارگیری سطح ۲۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر عصاره این گیاه موجب کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) صفات زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی نسبت به گروه شاهد شد. استفاده از سطح ۱۵۰ عصاره مرزنجوش غلظت تولید مالون دی آلدهید را نسبت به گروه شاهد و سطح ۲۵۰ کاهش داد (P<۰/۰۵). **نتیجه‌گیری**: داده‌های حاصل از آنالیز آماری نشان داد که افزودن عصاره مرزنجوش به رقیق کننده منی باعث بهبود اکثر پارامترهای تحرکی اسپرم قوچ قزل، بعد از یخ گشایی شد.

واژگان کلیدی: استرس اکسیداتیو، اسپرم، مرزنجوش، آنتی اکسیدان طبیعی، انجماد-یخ‌گشایی

مقدمه

ذخیره‌سازی طولانی مدت منی دام برای دستیابی به مزایای تلقیح مصنوعی یک امر ضروری محسوب می-شود. این امر به وسیله فرآیند انجماد اسپرم محقق می-شود که موجب توقف فعالیت‌های متابولیکی اسپرم‌ها شده و در نتیجه امکان ذخیره‌سازی نامحدود و بدون کاهش معنی‌دار باروری را در پی دارد (بایلی و همکاران ۲۰۰۰). در مراحل مختلف عمل‌آوری، نگهداری

و انجماد اسپرم، به دلیل تولید گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS)[۱] که موجب ایجاد تنش‌های فیزیولوژیک و شیمیایی در سطح غشای اسپرم می‌شوند، کیفیت، زنده‌مانی و قدرت باروری اسپرم منجمد شده کاهش می‌یابد. گونه‌های فعال اکسیژنی ترکیب‌های واکنش پذیری هستند که به علت داشتن یک یا چند الکترون جفت نشده، می‌توانند با انواعی از ماکرومولکول‌های زیستی به ویژه لیپیدها، قندها و DNA واکنش داده و با اکسید نمودن آنها موجب تنش اکسیداتیو در سلول و در نهایت مرگ سلول شوند. ایجاد تعادل بین تولید گونه-های فعال اکسیژنی و پاک‌سازی آنها توسط آنتی اکسیدان‌ها، یک عامل مهم در بقای سلول اسپرم و عملکرد طبیعی آن پیش و پس از فرآیند انجماد-یخ گشایی می‌باشد. آسیب‌های ناشی از انجماد بر ساختار و عملکرد سلول‌های اسپرم می‌تواند به دو بخش مستقیم و غیرمستقیم تقسیم شود. آسیب مستقیم بیشتر با شوک سرمایی مرتبط بوده که مدت کوتاهی پس از کاهش دما اتفاق می‌افتد ولی آسیب غیرمستقیم به سرعت سردسازی وابسته نبوده و تعیین مقدار آن دشوار است (بیلودو و همکاران ۲۰۰۰). یون هیدروکسیل، سوپر اکسید، هیدروژن پراکسید، رادیکال پراکسیل و یون هیپوکلریت نمونه‌هایی از گونه‌های فعال اکسیژنی می‌باشند که به شدت واکنش‌پذیر بوده و موجب آسیب دیدگی سلول‌های اسپرم می‌شوند (سیکا ۲۰۰۱). سلول اسپرم دارای غلظت‌های زیاد اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد که مستعد پراکسیداسیون لیپیدی (LPO)[۲]و در نتیجه کاهش تحرک، یکپارچگی غشایی، باروری و تغییرات متابولیکی اسپرم است. برای مقابله با این مشکل، استفاده از آنتی اکسیدان‌ها اهمیت زیادی پیدا می‌کند (لنزی و همکاران ۱۹۹٤). اسپرم از مکانیسم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی برخوردار بوده اما مقدار آن کافی نبوده و برای فرآوری اسپرم نیاز به افزودن آنتی اکسیدان‌هایی با منشأ خارجی می‌باشد (بانسال و بیلاسپوری ۲۰۱۰). امروزه استفاده از گیاهان با خاصیت آنتی‌اکسیدانی ، اهمیت زیادی پیدا کرده است. در سال‌های اخیر در رابطه با خواص آنتی‌اکسیدانی برخی گیاهان پژوهش های بسیاری انجام شده است و انواع مختلفی از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان یافت شده است که می‌توانند برای کنترل رادیکال‌های آزاد و LPO مفید واقع شوند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برخی از گیاهان هم پایه و برخی حتی بیشتر از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک است. خانواده نعناعیان از جمله گیاهانی هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی تعداد زیادی از آنها شناخته شده است. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بیشتر شامل فنول‌های گیاهی هستند که چندکاره بوده و می‌توانند به عنوان عوامل احیا کننده عمل کنند. عصاره بسیاری از گیاهان دارای ترکیب‌های زیست‌فعال از جمله اسیدهای فنولیک و فلاونوییدها هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی زیادی داشته و از آسیب رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کنند (مالو و همکاران ۲۰۱۱). ترکیبات فنلی و فلاونوییدها به‌دلیل خواص اکسید و احیا کنندگی و دهنده گروه هیدروکسیل بودن دارای نقش مهمی در جذب و خنثی کردن ROS ها به ویژه رادیکال‌های آزاد و تجزیه پراکسیدها هستند (اوساوا ۱۹۹٤). گیاه مرزنجوش (O.V)[۳] از خانواده نعناعیان بوده که پراکنش جهانی دارد. دو گونه مرزنجوش اروپایی و مدیترانه‌ای، خواص درمانی داشته و در مناطق شمال و شمال غرب ایران پراکندگی بیشتری دارند. ارتفاع این گیاه معطر ۳۰ تا ۹۰ سانتیمتر است و به حالت خودرو در نواحی خشک، سواحل دریاها، دامنه کوهستان‌ها و جنگل‌ها می‌روید. مرزنجوش از قرن‌ها پیش در طب سنتی و در درمان بیماری‌های گوارشی، سرماخوردگی، آلرژی‌های تنفسی، دیابت، التیام زخم‌ها و نیز به عنوان

[۱]- Reactive Oxygen Species

[2] - Lipid peroxidation

[۳]- Origanum Vulgare

آرام‌بخش کاربرد داشته است. مرزنجوش با تحریک بیان یک آنزیم محافظت کننده از DNA در مقابل عوامل آلکیله‌کننده، از آن در مقابل تنش اکسیداتیو ناشی از عوامل مختلف محافظت می‌کند (ممبینی و همکاران ۱۳۸۷). از گیاه مرزنجوش برای معالجه بیماری‌های تنفسی، بیماری‌های هیپوکلاسمیک و لوکمیا استفاده می‌شود. براساس نتایج حاصل از آنالیزهای شیمیایی عصاره و اسانس این گیاه، ترکیبات فنلی عصاره مرزنجوش فلاونوییدهایی چون نارینجین، آپیگنین، لوتئولین و دیبوسمتین را شامل می‌شود. مخصوصاً اسیدهای فنلیک و فلاونوئیدها به عنوان عوامل مؤثر احتمالی مطرح شده و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن توسط اکثر پژوهشگران به اثبات رسیده است. مطالعات متعدد مشخص کرده است که خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه بیشتر به ترکیب‌هایی مانند اسید رزمارینیک، کوئرستین، کامفرول، اویگانول A وB، کافئیک اسید، نارنجین، لوتئولین، آپیگنین، آستراگالین، اسید هایپروزید مربوط می‌شود. اسید رزمارینک، کوئرستین، کامفرول، اویگانول A وB ترکیب‌های غالب عصاره مرزنجوش هستند که از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بسیار قوی به شمار می‌روند (میرزائی و همکاران ۱۳۹۰ و ممبینی و همکاران ۱۳۸۷). در این مطالعه تاثیر افزودن سطوح مختلف عصاره گیاه مرزنجوش به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی بر کیفیت منی منجمد شده قوچ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش

پس از جمع‌آوری گیاه بابونه و تعیین گونه، قسمت‌های هوایی آن در سایه خشک و پودر شدند. ۵۰ گرم از گیاه با ۳۵۰ میلی‌لیتر الکل اتانول مطلق به مدت ۲٤ ساعت خیس خورده و پس از صاف کردن به کمک دستگاه تقطیر عصاره آن حاصل شد که تا زمان اجرای آزمایش در یخچال نگهداری شد. برای نفوذ بهتر الکل به گیاه پودری، هر نیم ساعت یکبار بشر هم زده می‌شد. بعد از گذشت ٦ ساعت مخلوط گیاه و الکل بوسیله برگه صافی نمره یک صاف شده و محلول صاف شده در یک بشر دیگر جمع شد و سپس تفاله باقیمانده دوباره با ۳۵۰ میلی لیتر الکل اتانول خیسانده و به روش قبلی عمل شد. بعد از سه مرتبه تکرار، محلولی که در بشر دیگری جمع‌آوری شده بود، به وسیله دستگاه تقطیر در خلاء[1]با دمای ۷۵°C حرارت دیده و الکل تحت تأثیر این دما به مرور تبخیر شد. بعد از جداسازی کامل الکل، عصاره غلیظ که حالت قیری داشت در ته بشر باقی ماند. در نهایت عصاره تا زمان استفاده در دمای ٤°C نگهداری شد. در زمان شروع طرح از عصاره گیاه مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم بوسیله ترازوی دقیق وزن شده و در ۲۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شد. برای کمک به بهتر شدن حلالیت عصاره و امولسیفه کردن محلول، مقدار ۱۵ میکرولیتر محلول توئین ۸۰ به آن افزوده شد. سپس به کمک دستگاه اولتراسوند و با کمک نیروی مغناطیسی به مدت ۵ دقیقه محلول هم زده شد. در نهایت عصاره محلول تهیه شد. عصاره به دست آمده را با آب دو بار تقطیر و با نسبت ۳۰:۷۰ مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه روی دستگاه شیکر بهم زده و محلول رقیق شده عصاره در سطوح مشخص و در تکرارهای آزمایشی، در همان روز استفاده شد (زاواتی و همکاران ۲۰۱۱).

در این تحقیق از پنج قوچ نژاد قزل (۲-۳ سال) ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز برای تهیه منی استفاده شد. جمع‌آوری منی هفته‌ای دو بار و با استفاده از واژن مصنوعی و در فصل تولیدمثلی از قوچ هایی صورت گرفت که برای تحریک آنها از میش استفاده شده بود. برای از بین بردن اثرات فردی دام‌های نر، مقادیر مساوی از نمونه‌های منی از هر پنج رأس قوچ، در هر تکرار آزمایشی با هم مخلوط شده و سپس مورد استفاده قرار گرفتند. منی با غلظت بیش از ۳×۱۰^{۹} اسپرم در میلی‌لیتر، جنبایی بیش از ۷۰ درصد و اسپرم-

[1]- Soxhlet system

های با مورفولوژی غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد در هر انزال به عنوان منی طبیعی در نظر گرفته شدند.

برای ساخت رقیق‌کننده‌ها از یک محیط بر پایه بافر تریس استفاده شد (تریس ۲۷/۱ گرم در لیتر، اسیدسیتریک ١٤ گرم در لیتر ، گلوکز ۱۰ گرم در لیتر). از گلیسرول و زرده تخم‌مرغ به عنوان عوامل محافظ انجمادی استفاده شد. اسمولاریته محیط پایه در ۳۲۵ میلی اسمول/کیلوگرم و اسیدیته آن در ۷/۲ تنظیم شد. قبل از شروع کار محیط‌های انجمادی در بن ماری$37^{\circ}C$ قرار داده شد سپس زرده تخم مرغ به نسبت ۲۰ درصد و گلیسرول به نسبت ۷ درصد به محیط پایه تریس اضافه شد. در مرحله بعد سه سطح مختلف عصاره گیاه مرزنجوش (۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰ میکرولیتر در میلی لیتر) به محیط‌های انجمادی آماده اضافه شده و یک تیمار به عنوان شاهد (فاقد عصاره مرزنجوش) درنظر گرفته شد. رقیق سازی منی با محلول دارای غلظت های مختلف عصاره گیاهی در دمای $37^{\circ}C$ انجام شد. سپس لوله منی را در ظرف محتوی ۱۰۰ میلی‌لیترآب $37^{\circ}C$ قرارداده و به مدت ۱۲۰ دقیقه در یخچال در دمای چهار درجه سانتیگراد قرارگرفت. بلافاصله بعد از سردسازی، نمونه‌ها به‌داخل پایوت‌های انجمادی ۰/۵ میلی‌لیترکشیده و بسته‌بندی شده و در فاصله ۵ سانتی‌متری بالای سطح ازت قرارگرفتند. پس از گذشت ۱۲ دقیقه، پایوت‌های منی با سرعت در داخل ازت مایع ($-196^{\circ}C$) غوطه‌ورشدند.

ارزیابی منی

به منظور یخ‌گشایی منی، پس از خارج کردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، آنها به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آبگرم $37^{\circ}C$ قرار داده شدند. اولین فراسنجه ارزیابی در این تحقیق، بررسی جنبایی اسپرم پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی بود. بدین منظور دو پایوت از هرگروه تیماری یخ‌گشایی شده و به داخل لوله‌های میکروتیوب انتقال داده شدند. سپس با برداشتن ۱۰ میکرولیتر از منی و گذاردن آن روی لام، تحرک کلی، تحرک‌پیش‌رونده و ویژگی های کینتیکی اسپرم با استفاده از سیستم کامپیوتری ارزیابی اسپرم (CASA,Video TesT Sperm 3.1 Russia) ارزیابی شدند.

برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از محلول هایپواسموتیک (فروکتوز ۹ گرم در لیتر ، سیترات سدیم ٤/۹ گرم در لیتر و اسمولاریته ۱۰۰ میلی اسمول/کیلوگرم) مطابق روش ریوال و مروده (۱۹۹٤) استفاده شد. بعد از یخ‌گشایی، محتویات پایوت به داخل میکروتیوب دومیلی‌لیتری تخلیه شده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰g سانتریفیوژ شد؛ سپس قسمت بالای میکروتیوب که حاوی رقیق‌کننده بود، جداسازی شد. بعد از آن ۱۰ میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک اضافه شد؛ سپس ۳۰ دقیقه در داخل انکوباتور با دمای $37^{\circ}C$ قرار گرفت. در نهایت وضعیت اسپرم‌ها با تهیه حداقل سه قطره (۱۰ میکرولیتر) از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست بررسی شدند. در هرگروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شده و درصد اسپرم‌ها با دم گره خورده (دارای غشای یکپارچه) نسبت به گره نخورده (دارای غشای آسیب دیده) و غیریکپارچه محاسبه شدند (ریوال و مروده ۱۹۹٤).

برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل سه قطره از هرنمونه به میکروتیوب‌های دارای یک میلی‌لیتر محلول هانکوک افزوده شد، سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شد. با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست اسپرم‌های غیرطبیعی محاسبه شدند (شفر و هولتزمن ۲۰۰۰).

برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده از رنگ آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. با توجه به سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها، درصد سلول‌های زنده و مرده در میدان دید میکروسکوپی با بزرگنمایی ٤۰X شمارش شدند. برای رنگ آمیزی؛ ۲۰ میکرولیتر از اسپرم رقیق شده با ۱۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین-

نیگروزین سریعا روی لام مخلوط گردید و گسترشی از آن تهیه شد. سپس در مجاورت هوا خشک شدند. در این تکنیک رنگ ائوزین در اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند درحالیکه اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. سلول‌هایی که رنگ بنفش گرفته‌اند به عنوان مرده و اسپرم‌هایی که به رنگ صورتی کم‌رنگ یا سفید دیده شوند به عنوان زنده در نظرگرفته شدند (ایوانس و مکسول ۱۹۸۷).

غلظت مالون‌دی‌آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید در نمونه‌های منی است که با استفاده از واکنش تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری می‌شود. یک میلی‌لیتر از هر نمونه منی با یک میلی‌لیتر اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک اسید، یک میلی‌لیتر بوتیلیدهیدروکسی تولئن و دو میلی‌لیتر تری کلرو-استیک اسید با هم مخلوط شده و به داخل لوله‌های مخروطی ریخته شدند. لوله‌های مخروطی در ۱۲۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، یک میلی‌لیتر از محلول بالای لوله مخروطی با یک میلی‌لیتر TBA در میکروتیوب مخلوط شد. لوله مخروطی به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۹۵°C قرار گرفت. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شده و سپس جذب نوری آنها در طول موج ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. جذب نوری نمونه‌های مختلف یادداشت شده و در پایان غلظت MDA (نانو مول در میلی‌لیتر منی) محاسبه شد (پلسر و همکاران ۱۹٦٦).

آنالیز آماری

این مطالعه با چهار تیمار و چهار تکرار انجام شد. داده-های حاصل از این آزمایش با استفاده از رویه UNIVARIATE و تست Shapiroe-Wilk از نظر نرمال بودن مورد آزمایش قرار گرفتند و داده های تحرک کل، سرعت در مسیر مستقیم و تحرک عرضی سر که نرمال نبودند با استفاده از $\sqrt{x}$ Arcsin نرمال شدند. داده‌های حاصل از این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی به کمک رویه GLM نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد. سطح معنی داری ۵ درصد در نظر گرفته شد. مدل آماری این طرح عبارت بود از:

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

که در این مدل، Y_{ij} برابر است با داده مشاهده شده برای فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده، μ= میانگین جامعه، T_i=اثر تیمار iام برابر است با اثر تیمار، و e_{ij}= اثر باقیمانده یا خطا بود.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها برای پارامترهای تحرک در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان داد که افزودن ۱۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر عصاره مرزنجوش باعث بهبود صفت تحرک پیش‌رونده نسبت به گروه شاهد شده ($P<۰/۰۵$) ولی در سایر صفات حرکتی تفاوت معنی-داری را نسبت به گروه شاهد به همراه نداشت. استفاده از سطح ۱۰۰ گیاه مرزنجوش بهبود معنی‌داری را در هیچ یک از صفات تحرکی نسبت به گروه شاهد موجب نشد. هیچ کدام از سطوح عصاره گیاه مرزنجوش موجب تفاوت معنی داری در صفات تحرک کل و تحرک عرضی سر اسپرم‌ها نشد. به کارگیری سطح ۲۵۰ عصاره این گیاه موجب کاهش معنی‌دار صفت تحرک پیش‌رونده نسبت به گروه های تیماری ۱۰۰ و ۱۵۰ مرزنجوش شد. این کاهش معنی‌دار با استفاده از سطح ۲۵۰ در صفات سرعت در مسیر میانگین، سرعت در مسیر مستقیم، خطی بودن تحرک و راستی مسیر طی شده نیز نسبت گروه شاهد و سطح ۱۵۰ شد ($P<۰/۰۵$).

جدول۱-مقایسه ویژگی های تحرک اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ در بین سطوح مختلف عصاره مرزنجوش (میکرولیتر در میلی لیتر رقیق‌کننده)(میانگین ± انحراف معیار)

Table 1- Comparison of motility parameters of post thawed ram sperm among different levels of *Origanum Vulgare* extract (µL/mL of Diluent) (Mean ± SD)

Parameters صفات	Control شاهد	Origanum Vulgare 100 مرزنجوش ۱۰۰	Origanum Vulgare 150 مرزنجوش ۱۵۰	Origanum Vulgare 250 مرزنجوش ۲۵۰
Total motility (%) تحرک کل (درصد)	42.25±12.3	38.75±1.2	47.50±8.4	36.25±2.6
Progressive motility (%) تحرک پیش‌رونده (درصد)	22.00^{bc}±2.5	23.75^{b}±2.7	32.50^{a}±7.0	16.75^{c}±2.0
Average path velocity (micron/sec) سرعت در مسیر میانگین (میکرون بر ثانیه)	53.84^{a}±5.6	44.10^{b}±8.9	54.57^{a}±6.5	39.85^{b}±4.7
Curvilinear velocity (micron/sec) سرعت در مسیر منحنی (میکرون بر ثانیه)	62.39^{ab}±5.6	56.01^{ab}±7.1	66.81^{a}±8.1	53.29^{b}±9.4
Straight line velocity (micron/sec) سرعت در مسیر مستقیم (میکرون بر ثانیه)	34.72^{a}±4.0	23.48^{b}±3.1	37.08^{a}±3.9	20.87^{b}±0.8
Lateral head displacement (micron) تحرک عرضی سر (میکرون)	2.65±0.4	2.35±0.2	2.57±0.2	2.20±0.0
Linearity (%) خطی بودن تحرک (درصد)	53.10^{a}±4.2	42.11^{b}±4.5	55.60^{a}±2.2	40.25^{b}±8.2
Straightness (%) راستی مسیر طی شده (درصد)	64.59^{a}±5.7	54.33^{b}±8.5	68.04^{a}±2.1	52.92^{b}±6.3

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

Mean within same row with different superscripts differ (P< 0.05)

جدول۲- مقایسه صفات زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، اسپرم‌های غیرنرمال و تولید مالون‌دی‌آلدئید اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ در بین نمونه‌های با سطوح مختلف عصاره مرزنجوش (میکرولیتر / میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده) (میانگین ± انحراف معیار)

Table 2- Comparison of viability, plasma membrane integrity, abnormal sperm traits and malondialdehyde production in post thawed ram sperm between I samples with different levels of Marjoram extract (µL/mL of diluent) (Mean ± SD)

Parameters صفات	Control شاهد	Origanum Vulgare 100 مرزنجوش ۱۰۰	Origanum Vulgare 150 مرزنجوش ۱۵۰	Origanum Vulgare 250 مرزنجوش ۲۵۰
Viability (%) زنده‌مانی (درصد)	48.78^{ab}±2.3	43.46^{bc}±2.3	52.65^{a}±2.4	38.35^{c}±6.0
Plasma membrane integrity (%) یکپارچگی‌غشای‌پلاسمایی (درصد)	41.19^{ab}±6.2	37.82^{bc}±3.0	45.96^{a}±2.5	33.38^{c}±7.3
Abnormality (%) غیرنرمال بودن (درصد)	23.82±4.6	24.21±3.6	23.02±4.9	25.06±3.7
Malondialdehyde (nmol/dl) غلظت مالون‌دی‌آلدئید**(نانومول بردسی لیتر)**	2.39^{ab}±0.3	2.17^{bc}±0.3	1.75^{c}±0.4	2.77^{a}±0.1

میانگین های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می باشند (P<۰/۰۵).

Mean within same row with different superscripts differ (P< 0.05)

نتایج حاصل از آنالیز اثر سطوح مختلف عصاره مرزنجوش بر صفات زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، درصد اسپرم‌های غیرنرمال و همچنین میزان تولید مالون دی آلدهید در جدول ۲ آورده شده است.

داده‌های جدول نشان می‌دهند که افزودن سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ عصاره مرزنجوش تفاوت معنی‌داری را در زنده-مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی نسبت به گروه شاهد نداشت ولی سطح ۲۵۰ عصاره این گیاه موجب کاهش معنی‌دار زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی نسبت به گروه شاهد و سطح ۱۵۰ شد (P<۰/۰۵). درصد اسپرم‌های غیرنرمال به صورت معنی‌داری تحت تاثیر هیچ کدام از گروه های تیماری قرار نگرفت. استفاده از سطوح ۱۵۰ عصاره مرزنجوش غلظت تولید مالون دی آلدهید را نسبت به گروه شاهد و سطح ۲۵۰ کاهش داد (P<۰/۰۵).

بحث

در شرایط فیزیولوژیک یک تعادل بین تولید ROS و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی منی وجود دارد و تولید بیش از حد ROS موجب اختلال در عملکرد آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی منی و در نهایت عمکلرد اسپرم‌ها می‌شود (بامبر و همکاران ۲۰۰۰). مطالعات نشان داده‌اند که آنتی اکسیدان های سنتتیک مانند سیستئین و گلوتاتیون موجب بهبود معنی‌دار تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشای اسپرم گونه‌های مختلف پستانداران بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی می‌شود (تانسر و همکاران ۲۰۱۰) ولی امروزه به دلیل مزایای آنتی اکسیدان های گیاهی تحقیقات وسیعی در این زمینه صورت می گیرد. عصاره گیاه مرزنجوش با داشتن ترکیب‌های فنولیک فراوان و نام آشنا در اکثر تحقیقات دارویی استفاده شده‌اند و عصاره مرزنجوش بر کیفیت اسپرم گاو نیز بررسی شده که همگی پاسخ مثبت و رضایت بخش داشته است (فرهادی و همکاران ۱۳۹۳). در این مطالعه تاثیر عصاره مرزنجوش بر پارامترهای حرکتی و زنده-مانی اسپرم قوچ بررسی شده است . استفاده از عصاره مرزنجوش در رقیق‌کننده منی قوچ، بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی در مقایسه با گروه شاهد، موجب بهبود صفت تحرک پیش‌رونده اسپرم شد. اثرات مثبت عصاره نه تنها در خصوصیات تحرک اسپرم بلکه در زنده‌مانی و یکپارچگی غشا نیز قابل مشاهده بود که می‌توان دلیل آنرا داشتن ترکیب‌های فنولیک متعدد در گیاه دانست، که اسپرم‌ها را از آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو محفوظ می‌دارند. در این مطالعه افزودن ۱۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر گیاه مرزنجوش موجب بهبود معنی دار یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها نشده است. مقادیر کمتر و بیشتر از ۱۵۰ میکرولیتر در میلی-لیتر سیر نزولی در پارامترهای مورد ارزیابی داشته است. با افزودن مقادیر بیشتر عصاره، با مهار بیش از حد فعالیت آنزیم‌های دخیل در اکسیداسیون و احیاء و به هم زدن تعادل بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تولید رادیکال‌های آزاد در محیط اسپرم ها را به هم زده و موجب کاهش عملکردهای اسپرم می‌شوند (روکا و همکاران ۲۰۰٤). مطالعات محدودی در رابطه با اثر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بر فراوری اسپرم انجام شده است ولی اخیرا با شناخت ترکیب‌های موثر گیاهان، صرفه اقتصادی استفاده از گیاهان و نداشتن سمیت در مقابل آنتی اکسیدان های طبیعی این مطالعات در حال گسترش است. دقیق‌کیا و همکاران (۲۰۱٤) نشان دادند استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند عصاره رزماری (Rosmarinus officinalis) موجب بهبود ویژگی‌هایی چون تحرک کلی، سرعت حرکت اسپرم، قابلیت زیست، تست HOST، لیپید پراکسیداسیون و فعالیت گلوتاتیون بلافاصله بعد از ذوب در اسپرم گاو می‌شود. افزودن عصاره آبی گیاه رزماری به رقیق کننده دارای منی بز، موجب بهبود پارامترهای تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و کاهش مقدار ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم‌ها شده و می‌تواند اسپرم‌های بز را در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال های آزاد حفظ کند (زنگانه و همکاران ۲۰۱۳). ساپانیدو و همکاران (۲۰۱٤) نشان دادند استفاده از مواد طبیعی غنی از پلی‌فنول‌ها (دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی) مانند عصاره انگور موجب مهار لیپید پراکسیداسیون،

حفظ درصد تحرک و یکپارچگی آکروزوم (که با باروری آزمایشگاهی همبستگی بالایی دارد) می‌شود. با افزودن عصاره اتانولی مرزنجوش و مریم گلی سهندی به اسپرم گاو هلشتاین بعد از ذوب تفاوت معنی‌داری در تحرک کلی، سرعت حرکت اسپرم، قابلیت زیست، یکپارچگی غشا پلاسمایی، لیپید پراکسیداسیون تفاوت معنی داری با گروه شاهد مشاهده شده است (فرهادی و همکاران ۱۳۹٤).

منابع مورد استفاده

فرهادی ر، دقیق‌کیا ح، اشرفی ا، ۱۳۹٤. تأثیر عصاره اتانولی مریم‌گلی سهندی به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی بر پارامترهای کیفی اسپرم منجمد-یخ گشایی شده گاو هلشتاین. پژوهش‌های تولیدات دامی. سال ششم، شماره ۱۲، ص ۸٦-۷۹.

فرهادی ر، دقیق‌کیا ح، حسین‌خانی ع، قاسمی‌پناهی ب، دهقان غ، اشرفی ا، ۱۳۹۳. اثرعصاره اتانولی گیاه مرزنجوش بر فراسنجه‌های کیفی و غلظت مالون‌دی‌آلدهید اسپرم منجمد یخ‌گشایی شده گاو هلشتاین. پژوهش‌های علوم دامی. جلد ۲۵، شماره ۱، ص ۱۱-۱.

ممبینی ت، ممبینی م و آقایی م، ۱۳۸۷. بررسی آثار فارماکولوژیک جنس مرزنجوش (Origanum spp.). فصلنامه گیاهان دارویی. دوره ٤، شماره ۲۹، ص ۳۵-۱۸.

میرزایی ع، جابری هفشجانی ه، مدنی ع ح، ۱۳۹۰. بررسی فعالیتهای ضداکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی عصاره هیدروالکلی مرزنجوش، کلپوره و آویشن دنائی. مجله پزشکی هرمزگان. دوره ۱۵، شماره ٤، ص ۲۹٤-۲۸۵.

Bailey JL, Bilodeau JF and Cormier N, 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. Journal of Andrology 21: 1-7.

Bansal AK and Bilaspuri GS, 2010. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Veterinary Medicine International 1-7.

Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V and Davies-Morel MC, 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. Journal of Andrology 21: 895-902.

Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA and Gagnon C, 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Molecular Reproduction and Development 55: 282–288.

Daghigh-Kia H, Olfati-Karaji R, Hoseinkhani A and Ashrafi I, 2014. Effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) extracts and glutathione antioxidants on bull semen quality after cryopreservation. Spanish Journal of Agricultural Research 12: 98-105.

Evans G and Maxwell WMC, 1987. Handling and examination semen. In: Maxwell, W.M.C. (Ed.), Salamon’s Artificial Insemination of Sheep and Goat. Butterworths, Sydney, pp. 93–106.

Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Lombardo F, Terminali O, Passi S and Dondero F, 1994. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. Human Reproduction 9: 2044-2050.

Malo C, Gil L, Cano R, Martinez F and Gale I, 2011. Antioxidant effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology 75: 1735-1741.

Osawa T, 1994. Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. In Postharvest Biochemistry of plant Food-Materials in the Tropics; Uritani, I, Garcia, V, Mendoza V. Japan Scientific Societies Press: Tokyo, Japan, 241−251.

Placer ZA, Cushman LL and Johnson BC, 1966. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. Analytical Biochemistry 16: 359–364.

Revell SG and Mrode RA, 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science 36: 77-86.

Roca J, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JM and Martinez EA, 2004. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. Journal of Andrology 25: 397-405.

Sapanidou VG, Margaritis L, Siahos N, Arsenopoulos K, Dragatidou E, Taitzoglou LA, Zervos LA, Theodoridis A and Tsantarliotou MP, 2014. Antioxidant effect of a polyphenol-rich grape pomace extract on motility, viability and lipid peroxidation of thawed bovine spermatozoa. Journal of Biological Research-Thessaloniki 21: 1-6.

Schafer S and Holzmann A, 2000. The use of transmigration and spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. Animal Reproduction Science 59: 201–211.

Sikka SC, 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Current Medicinal Chemistry 8: 851-862.

Tuncer PB, Bucak MN, Büyükleblebici S, Sarıözkan S, Yeni D, Eken A, Akalın PP, Kinet H, Avdatek F, Fidan AF and Gündoğan M, 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. Cryobiology 61: 303-307.

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: 120-125.

Zavatti M, Zanoli P, Benelli A, Rivasi M, Baraldi C and Baraldi M, 2011. Experimental study on Satureja Montana as a treatment for premature ejaculation. Journal of Ethnopharmacology 133: 629-633.

The effect of *Origanum Vulgare* extract as natural antioxidant on quality cryopreserved ram sperm

H Daghigh Kia[1]*, F Sadeghi Sadegh Abad[2], H Mohamadzadeh[1], H Vaseghi Dodran[3] and I Ashrafi[3]

Received: September 14, 2016 Accepted: December 3, 2016
[1]Professor and Assistant Professor, respectively, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]MSc Graduated, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]PhD student, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
*Corresponding author: daghighkia@tabrizu.ac.ir

Abstract

BACKGROUND: Oxidative stress during freeze-thawing process causes reduction in motility, viability, membrane functions and finally sperm fertility. **OBJECTIVES:** the aim of this study was to determine the effect of *Origanum Vulgare* extract as natural antioxidant on quality cryopreserved ram sperm. **METHODS:** In this study semen was collected from five mature ram twice a week using an artificial vagina and the ejaculates were pooled in order to eliminate the individual effect of rams. Different levels of *Origanum Vulgare* extracts (0, 100,150 and 250 µL/mL diluent solution) were added to diluent based tris-egg yolk. After cooling, filling and sealing of the samples, they were frozen and with nitrogen vapor and immersed in liquid nitrogen and were stored until evaluation time. **RESULTS:** After thawing, results showed that addition of 150 µL/mL of extract increased progressive motility compared to the control groups ($P<0.05$). However, there were no significant improvement on other motility parameters, viability and plasma membrane integrity of sperm by inclusion of 150 µL/mL of extract. Usage of 250 µL/mL of extract caused significant reduction in viability and plasma membrane integrity compared to the control group. However, production of malondealdehyde is significantly lower by inclusion of 150 µL/ mL *Origanum Vulgare* rather than control group and 250 µL/ mL. **CONCLUSIONS:** The obtained data showed that inclusion of *Origanum Vulgare* extract in semen freezing extender improved post thawed motility of ram sperm.

Keywords: Oxidative stress, Sperm, *Origanum Vulgare*, Natural antioxidant, Freeze-thawing