مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۰ شماره ۴/ سال۱۳۹۹/ صفحات ۷۱ تا ۸۲

DOI: 10.22034/as.2021.38678.1560

بررسی اثرات عصاره گیاه شاه اسپرم بر برخی از فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ مغانی پس از انجماد و یخ‌گشایی

وحید واحدی[1*]

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۱٤ تاریخ پذیرش: ۹۹/۳/۲۹

[1] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی

[*]مسئول مکاتبه: Email: vahediv@uma.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: طی مراحل انجماد و یخ‌گشایی اسپرم، استرس اکسیداتیو باعث کاهش تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و در نهایت میزان باروری اسپرم می‌شود. گیاه شاه اسپرم (*Tanacetum balsamita* L.) به دلیل داشتن ترکیبات فنولیک دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. **هدف**: در این مطالعه تأثیر عصاره گیاه شاه اسپرم به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ مغانی مورد بررسی قرار گرفت. **روش کار**: در فصل تولیدمثلی از چهار رأس قوچ مغانی ۴-۳ ساله با میانگین وزنی ۷۰ کیلوگرم، هفته‌ای دو بار اسپرم‌گیری شد. سپس نمونه‌ها با رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ-سیترات حاوی سطوح مختلف عصاره گیاه شاه اسپرم (۰، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر محلول رقیق کننده) رقیق شدند. نمونه‌ها پس از طی مراحل سردسازی تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، روی بخار ازت منجمد شده و تا زمان ارزیابی در داخل ازت مایع نگهداری شدند. پس از یخ‌گشایی، فراسنجه‌های حرکتی اسپرم به وسیله سیستم کاسا، زنده‌مانی به روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین، تست یکپارچگی غشاء با محلول هایپواسموتیک و تعیین اسپرم‌های ناهنجار با محلول هانکوک مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج**: غلظت-های ۸ و ۱۲میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره گیاه شاه اسپرم، به طور معنی‌داری تحرک کلی و تحرک پیش رونده اسپرم را نسبت به گروه شاهد بهبود داد (P<۰/۰۵). درصد فراسنجه‌های VSL، VCL و VAP در تیمارهای ۸ و ۱۲ میلی‌لیتر نسبت به تیمارهای شاهد و ۱۶ میلی‌لیتر بالاتر بود (P<۰/۰۵). بالاترین درصد زنده‌مانی اسپرم مربوط به تیمار ۱۲ میلی-لیتر و بالاترین درصد یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم مربوط به تیمار ۸ و ۱۲ میلی‌لیتر بود (P<۰/۰۵). درصد اسپرم ناهنجار در تیمار ۱۲ میلی‌لیتر نسبت به تیمارهای شاهد و ۲ میلی‌لیتر کمتر بود (P<۰/۰۵). **نتیجه‌گیری نهایی**: به طور کلی استفاده از ۱۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره گیاه شاه اسپرم در رقیق‌کننده منی سبب بهبود کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ شد.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسپرم قوچ، عصاره شاه اسپرم، منجمد-یخ‌گشایی، یکپارچگی غشایی

مقدمه

تلقیح مصنوعی با استفاده از اسپرم منجمد یکی از تکنیک‌های مهم تولیدمثلی است که در حیوانات مزرعه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد که موجب بهبود ژنتیکی گله و افزایش بازده تولیدمثلی می‌شود. این تکنیک بر پایه انجماد اسپرم استوار است که آسیب‌های غیرقابل برگشتی به اسپرم وارد کرده (پوردی ۲۰۰۶)، و باعث کاهش تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء، ظرفیت آنتی-

اکسیدانی و در نهایت باعث کاهش میزان باروری اسپرم می‌شود (باغشاهی و همکاران ۲۰۱۴)، به طوری که امروزه حتی با به کارگیری تکنیک‌های روز، درصد زنده‌مانی اسپرم پس از یخ‌گشایی به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (لسارد و همکاران ۲۰۰۰). سلول‌های اسپرم حاوی غلظت‌های بالای اسیدهای چرب غیر اشباع هستند که مستعد پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشند. آسیب‌های فیزیکی و شیمیایی به وجود آمده در غشای اسپرم در طی فرآیند انجماد-یخ‌گشایی منی، با تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) و پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای سلول اسپرم به وسیله رادیکال‌های آزاد (مانند یون هیدروکسیل، سوپر اکسید، هیدروژن پراکسید، رادیکال پراکسیل و یون هیپوکلریت) همراه است که این ترکیبات منجر به کاهش کیفیت و باروری اسپرم می‌شوند (چاترجی و همکاران ۲۰۰۱).

رادیکال‌های آزاد در طول فرآیند انجماد منجربه تنش اکسیداتیو در سلول‌ها می‌شوند که این تنش باعث تخریب دیواره غشای سلولی و کل ترکیبات ساختمانی اسپرم می‌شود. علت اصلی این آسیب‌های سلولی، عدم تعادل بین تولید ROS و سیستم بیولوژیکی کنترل کننده رادیکال‌های آزاد عنوان شده است (مالو و همکاران ۲۰۱۰). تولید ROS به وسیله اسپرم یک فرآیند طبیعی است، اما اگر تولید آن بالاتر از سطوح فیزیولوژیک باشد باعث آسیب سلولی و ناباروری می-شود. همه سلول‌ها دارای تعدادی سیستم آنتی‌اکسیدانی هستند که رادیکال‌های آزاد تولید شده در سلول را حذف می‌کنند و آسیب سلولی را به حداقل می‌رسانند. حذف ROS به‌وسیله آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی موجود در سلول مانند گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-PX)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز و همچنین توسط آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مثل آسکوربات، ویتامین E، پیروات، گلوتاتیون، آلبومین، ویتامین A تسریع می‌شود (بانسال و بیلاسپوری ۲۰۱۱)، اما مقدار این آنتی‌اکسیدان‌های داخلی در فرایند انجماد اسپرم کاهش یافته و برای حذف رادیکال‌های تولید شده کافی نیست. بنابراین، به منظور بهبود انجماد اسپرم و جلوگیری از تنش اکسیداتیو و حذف رادیکال‌های آزاد فعال، از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک در محیط‌های انجمادی اسپرم استفاده شده است (مالو و همکاران ۲۰۱۰). اما با توجه به وجود مشکلاتی در استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)، بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) و تری بوتیل هیدروکینون (TBHQ) در رقیق کننده‌ها و اثرات سوء آنها بر سلول‌ها، امروزه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک شده است (لطفی پور و همکاران ۲۰۰۷ و دقیق کیا و همکاران ۲۰۱۶).

خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان به طور عمده به ترکیبات فلاوونوئیدها، تانن‌ها، فنولیک‌ها، کومارین‌ها، لیگنین‌ها و دی‌ترپن‌های فنولیک مربوط می‌شود (جئونگ و همکاران ۲۰۰۴). ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدها به دلیل خواص اکسید و احیاکنندگی، دهنده گروه هیدروکسیل و داشتن خصوصیت کلاته‌کنندگی یون‌های فلزی، نقش مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد به خصوص ROS و تجزیه پراکسیدها دارند (آرورا و همکاران ۱۹۹۸). به همین دلیل استفاده از این آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته است. اطلاعات محدودی در مورد اثرات آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی (گیاهی) در فرآوری اسپرم حیوانات اهلی وجود دارد. اخیراً در چندین مطالعه نشان داده شده است که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی در طی فرآوری و انجماد اسپرم اثرات مثبتی بر کیفیت اسپرم داشت (زنگانه و همکاران ۲۰۱۳؛ باغشاهی و همکاران ۲۰۱۴؛ خدائی مطلق و همکاران ۲۰۱۴؛ دقیق کیا و همکاران ۲۰۱۶ و واحدی و همکاران ۲۰۱۸). گیاه شاه‌اسپرم با نام علمی *Tanacetum balsamita* L. گیاهی علفی و پایا از تیره کاسنی (Asteraceae) می‌باشد. این گیاه در اصل منشأ مدیترانه‌ای داشته و در سال‌های اخیر در مناطق مختلف دنیا بومی شده و به صورت تجاری مورد کشت قرار گرفته است (حسن پوراقدم و همکاران ۲۰۰۸). گیاه شاه اسپرم حاوی ترکیبات ثانویه متعددی

می‌باشد که دارای خواص داروئی و بیولوژیکی متنوعی هستند. این ترکیبات شامل اسانس‌ها یا روغن‌های فرار (مونوترپن‌ها و سزکوئی ترپن‌ها)، مشتقات فنیل پروپان، تانن‌ها و الیگوالمنت‌ها می‌باشند. همچنین این گیاه داروئی حاوی ترکیبات فنولیکی مانند فلاونوئیدها (فلاونول، مشتقات آپیژنین، مشتقات لوتئولین)، و اسید فنولیک (کلوروژنیک، اسیدهای دیکافئویوکلینیک و کافئیک) می‌باشد (بندس و همکاران ۲۰۱۶؛ شاه حسینی و همکاران ۲۰۱۹). اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد التهابی، ضد سرطانی و اثر آنتی‌اکسیدانی این گیاه به اثبات رسیده است (باچک و همکاران ۲۰۱۷). مشخص شده است که ترکیبات فنولیکی (به‌خصوص فلاونوئیدها) قادرند پراکسیداسیون لیپیدی را با پوشش دادن آن‌ها متوقف کنند. همچنین این ترکیبات با کاهش سیالیت غشاهای سلولی و جلوگیری از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و محدود کردن پراکسیداسیون فسفولیپیدها و اسیدهای چرب غیر اشباع، می‌توانند از غشاهای سلولی محافظت کنند (بلوخینا و همکاران ۲۰۰۳). مطالعات فراوان در شرایط آزمایشگاهی نشان داده است که ترکیبات فنولیک می‌توانند به طور مستقیم رادیکال‌های آزاد مانند یون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و پراکسیل را پاک‌سازی و جاروب کنند. به طوری که حتی گفته شده است که اثر آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات بیشتر از ویتامین C و E می‌باشد (رایس اوانس و همکاران ۱۹۹۷). تا کنون گزارشی مبنی بر استفاده از عصاره گیاه شاه اسپرم به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در محیط رقیق کننده اسپرم و تاثیر آن بر فراسنجه‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی اسپرم گزارش نشده است. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه شاه اسپرم بر شاخص‌های حرکتی اسپرم، نرخ زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و مورفولوژی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی قوچ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به مدت ۸ هفته در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند مغانی، واقع در شهرستان جعفرآباد مغان در محدوده زمانی شهریور تا آبان ماه ۱۳۹۷ اجرا شد.

تهیه عصاره گیاه

برای تهیه عصاره گیاه شاه اسپرم، این گیاه پس از جمع‌آوری به مدت یک هفته در سایه خشک شده و سپس پودر گردید. در داخل بشر یک لیتری مقدار ۵۰ گرم از گیاه پودر شده با ۳۵۰ میلی لیتر الکل اتانول (۷۰ ٪) خیسانده شد. برای نفوذ بهتر الکل به گیاه، هر نیم ساعت یکبار بشر هم زده شد. بعد از فیلتر کردن با کاغذ صافی نمره یک، الکل محلول حاصل به وسیله دستگاه تقطیر در خلاء در دمای ۷۵C° تبخیر شد و عصاره گیاه در ته بشر ته نشین شد. در زمان آزمایش، از عصاره گیاه به مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم به وسیله ترازوی دقیق وزن شد و در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شد. جهت حلالیت بهتر عصاره و امولسیفه کردن محلول از محلول توئین ۸۰ (مرک آلمان) به مقدار ۵۰ میکرولیتر استفاده شد (دقیق کیا و همکاران ۲۰۱۷).

جمع آوری 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 به مدت ۴ هفته به وسیله مهبل مصنوعی اسپرم‌گیری شد. نمونه‌های منی سریعاً در فلاسک حاوی آب ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل شده و در داخل حمام بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در آزمایشگاه نمونه‌های منی از نظر حجم، رنگ، عدم آلودگی به ادرار و خون، تحرک کل و تحرک پیش‌رونده بررسی و نمونه‌های منی گرفته شده که دارای رنگ کرمی و تحرک بیشتر از ۷۰ درصد بودند به عنوان منی نرمال در نظر گرفته شدند و در غیر این‌صورت منی‌های جمع‌آوری شده حذف شدند. به منظور حذف اثرات فردی دام، نمونه‌های منی هر دام در مقدار مساوی با هم مخلوط شدند.

تهیه رقیق کننده، مرحله سردسازی و انجماد

در این آزمایش از رقیق‌کننده بر پایه تریس استفاده شد. اجزا و مقادیر رقیق‌کننده در جدول ۱ ارائه شده است.

تمامی مواد شیمیایی استفاده شده در این آزمایش از شرکت سیگما خریداری شد. ابتدا تریس، سیترات و فروکتوز با نسبت ذکر شده در جدول، در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شد. سپس زرده تخم مرغ را با محلول فوق مخلوط کرده و محلول نهایی روی صفحه گرم به مدت ۱۵ دقیقه همگن‌سازی شد. سپس به رقیق کننده ۵ درصد گلیسرول افزوده شد. سپس عصاره گیاه شاه اسپرم در سطوح مختلف (۰، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر محلول رقیق کننده) به رقیق‌کننده افزوده شد. رقیق‌سازی منی به نسبت ۱ حجم منی و ۱۲ حجم رقیق کننده در دمای اتاق انجام شد، بطوریکه غلظت نهایی اسپرم تقریباً ۳۰۰ میلیون در هر میلی لیتر بود. سپس فالکون‌ها را در بشر حاوی آب هم‌دما گذاشته و جهت سردسازی به یخچال انتقال یافتند. منی رقیق‌شده به مدت ۳ ساعت تا دمای ۴ درجه سلسیوس سرد شد. سپس همه تیمارها در داخل پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری (IMV, France) پر شدند. پس از مرحله سردسازی جهت انجماد اسپرم، نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه روی بخار ازت قرار داده شدند (۴ سانتی‌متر بالای سطح نیتروژن مایع) و پس از آن به داخل تانک ازت (دمای ۱۹۶C°-) انتقال یافته و تا زمان یخ‌گشایی در این دما نگهداری شدند. در این پژوهش ۴ تکرار برای هر تیمار در نظر 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 استفاده گردید. برای یخ‌گشایی منی، پس از خارج‌کردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، پایوت‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس نمونه اسپرم یخ‌گشایی شده به داخل میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری تخلیه شده و برای ارزیابی‌های مختلف کیفیت اسپرم مورد استفاده قرار گرفت.

Table 1- Composition of the Tris-based extender

Component	Amount
Tris	30.7(g/L)
Citric acid (g/L)	16.4
Fructose (g/L)	12.6
Hen egg yolk (%)	15
Glycerol (%)	5

ارزیابی تحرک اسپرم

جهت ارزیابی فراسنجه‌های تحرک، ابتدا نمونه‌های یخ-گشایی شده به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷C° حمام آب گرم انکوبه شدند. سپس ۵ میکرولیتر از نمونه منی روی لام از قبل گرم شده (در دمای ۳۷C°) ریخته شد و بعد از پوشاندن با لامل، روی میکروسکوپ قرار داده شد و فراسنجه‌های تحرک کل، تحرک پیش رونده، سرعت در مسیر منحنی، سرعت در مسیر میانگین، سرعت در مسیر مستقیم، جنبایی عرضی سر، خطی بودن جنبایی و راستی مسیر طی شده توسط سیستم آنالیزگر کامپیوتری اسپرم (CASA) ساخت شرکت هوشمند فن‌آور تهران (مدل HFTCASA) ارزیابی شدند. از هر نمونه حداقل ۱۰ میدان میکروسکوپی به طور کاملا تصادفی مورد مشاهده و بررسی قرار گرفته و تعداد ۲۰۰ اسپرم به وسیله سیستم CASA آنالیز شدند. آنالیز همه فراسنجه‌های تحرک به وسیله عکس‌برداری با بزرگنمایی ×۱۰۰ انجام شد.

ارزیابی زنده‌مانی اسپرم

جهت تعیین درصد اسپرم‌های زنده و مرده در نمونه منی ذوب شده از رنگ ائوزین- نیگروزین استفاده شد. برای انجام این آزمایش، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ی منی روی لام قرار داده شد و سپس قطره کوچکی از رنگ آماده شده‌ی ائوزین- نیگروزین (۱۶/۷ گرم رنگ ائوزین، ۱۰۰ گرم رنگ نیگروزین و ۲۹ گرم سیترات سدیم در یک لیتر آب مقطر) را برداشته و روی نمونه منی ریخته و با سرسمپلر به آرامی نمونه را هم زده تا اسپرم و رنگ به خوبی مخلوط شوند. سپس به کمک یک لام دیگر گستره بسیار نازکی از نمونه منی تهیه شده و لام به سرعت خشک گردید تا سلول‌های اسپرم زنده در اثر رنگ از بین نرفته و رنگ آمیزی نشوند. برای خشک شدن سریع، لام روی صفحه گرم با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خشک شدن لام، زیر میکروسکوپ تعداد اسپرم زنده و مرده در حداقل ۱۰ میدان از لام و با شمردن حداقل ۲۰۰ اسپرم تعیین شدند. سلول‌های اسپرم که به طور کلی یا جزیی رنگ قرمز مایل به بنفش به خود گرفته بودند، مرده و

سلول‌هایی که رنگ به خود نگرفته بودند زنده محسوب شدند.

تست یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم (HOST)

ترکیبات لازم برای تهیه محلول هایپواسموتیک در این تست شامل فروکتوز به مقدار ۹ گرم در لیتر و سیترات سدیم به مقدار ۴/۹ گرم در یک لیتر آب مقطر می‌باشد که اسمولاریته این محلول ۱۰۰ میلی‌اسمول است. برای انجام این تست ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه منی را با ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک مخلوط کرده سپس به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم (۳۷C°) انکوبه گردید. مقدار ۵ میکرولیتر از این نمونه روی لام قرار داده شد و به وسیله میکروسکوپ فاز کنتراست تعداد ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ×۴۰۰ شمارش شد. سلول‌های اسپرم با دم متورم و تاب خورده به عنوان اسپرم با غشای پلاسمایی سالم درنظر گرفته شدند. اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریته پایین به سرعت واکنش داده و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. تنها اسپرم با غشای پلاسمایی سالم به این نوع تغییر واکنش داده و اسپرم‌های مرده هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند.

ارزیابی مورفولوژی اسپرم

به منظور ارزیابی اسپرم ناهنجار از محلول هانکوک استفاده شد که شامل فرمالین ۳۷٪ (۶۲/۵ میلی‌لیتر)، محلول سالین (۱۵۰میلی‌لیتر)، محلول بافر فسفات (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دو بار تقطیر (۵۰۰ میلی‌لیتر) می‌باشد. چند قطره از هر نمونه منی به میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک اضافه شد و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار داده شد و لامل به آرامی روی آن قرار گرفت. برای تخمین صحیحی از درصد اسپرم ناهنجار ۱۰ میدان میکروسکوپی مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت. با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر لام در زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ×۴۰۰، درصد اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی (غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) تعیین شد.

آنالیز آماری

این مطالعه با ۶ تیمار در ۴ تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. داده‌های به دست آمده ابتدا با Arcsin به عدد واحد تبدیل شده و سپس تجزیه واریانس تمامی فراسنجه‌های مورد ارزیابی توسط نرم‌افزار SAS 9.2 و با استفاده از رویه GLM مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. مدل آماری به کار رفته در این آزمایش عبارت است از $Y_{ij}= \mu+T_i+ e_{ij}$ که در آن Y_{ij} مشاهدات، μ میانگین مشاهدات، T_i اثر تیمارها و e_{ij} اثر اشتباه آزمایشی بود.

نتایج

فراسنجه‌های حرکتی اسپرم

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غلظت‌های ۸ و ۱۲میلی‌لیتر عصاره گیاه شاه اسپرم، به طور معنی‌داری تحرک کل و پیش رونده اسپرم را نسبت به گروه شاهد بهبود داد ($P<۰/۰۵$). همچنین صفات سرعت در مسیر مستقیم و سرعت در مسیر منحنی در گروه‌های تیماری حاوی ۸ و ۱۲ میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد و گروه ۱۶ میلی‌لیتر افزایش معنی‌داری داشتند (جدول ۲، $P<۰/۰۵$). سرعت در مسیر میانگین در رقیق کننده‌های حاوی ۲، ۴، ۸ و ۱۲ میلی‌لیتر عصاره، نسبت به گروه‌های شاهد و ۱۶ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر بطور معنی‌داری عملکرد بهتری نشان دادند ($P<۰/۰۵$). درصد خطی بودن تحرک در تیمار ۸ میلی‌لیتر نسبت به گروه ۱۶ میلی‌لیتر از لحاظ آماری بالاتر ولی نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. فراسنجه راستی مسیر طی شده در تیمارهای ۸ و ۱۲ نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود ($P<۰/۰۵$) و در فراسنجه تحرک عرضی سر بین تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲).

Table 2- Effect of *Tanacetum balsamita* extract (mL/dL) on the motility and velocity parameters of post-thawed ram spermatozoa (Lsmean±SEM)

Parameters	concentration of *Tanacetum balsamita* extract (mL/dL)					
	Control	2	4	8	12	16
TM (%)	28.12±3.16[b]	36.62±3.41[ab]	38.24±3.58[ab]	42.31±3.89[a]	42.56±4.02[a]	38.08±3.24[ab]
PM (%)	23.25±3.52[b]	31.25±3.56[ab]	31.62±3.52[ab]	34.61±4.01[a]	36.46±3.40[a]	30.19±2.84[ab]
VSL (µm/s)	43.42±3.74[b]	46.51±3.63[ab]	49.35±3.47[ab]	57.41±4.08[a]	58.12±4.28[a]	42.63±3.32[b]
VCL (µm/s)	98.28±7.53[b]	102.49±7.29[b]	113.06±8.15[ab]	124.27±8.66[a]	127.62±8.28[a]	105.82±7.71[b]
VAP (µm/s)	57.35±4.28[b]	67.64±4.14[a]	69.91±4.74[a]	70.62±5.83[a]	72.96±6.64[a]	56.35±4.37[b]
ALH (µm)	4.18±0.38	3.83±0.32	4.42±0.38	4.57±0.45	5.02±0.48	4.21±0.36
LIN (%)	43.31±3.28[ab]	45.35±3.74[ab]	43.95±3.19[ab]	46.83±3.82[a]	45.71±3.63[ab]	40.52±3.23[b]
STR (%)	75.04±5.06[b]	68.86±5.27[b]	71.81±6.33[b]	81.09±7.56[a]	80.27±7.18[a]	75.23±5.42[b]

TM: total motility; PM: progressive motility; VSL: straight linear velocity; VCL: curvilinear velocity; VAP: average path velocity; ALH: amplitude of lateral head displacement; LIN: linearity and STR: straightness.
[a, b, c]: Within rows, means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).
SEM: Standard Error Means.

زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و مورفولوژی اسپرم

اثرات سطوح مختلف عصاره گیاه شاه اسپرم بر فراسنجه زنده‌مانی اسپرم در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که افزودن سطوح ۸ و ۱۲ میلی-لیتر در دسی‌لیتر عصاره به رقیق کننده به طور معنی-داری نسبت به گروه شاهد درصد زنده‌مانی اسپرم را افزایش داد. همچنین تیمار ۱۲ میلی‌لیتر نسبت به سایر گروه‌ها نیز اختلاف معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). بالاترین درصد یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم مربوط به تیمار ۸ و ۱۲ میلی‌لیتر و پایین‌ترین درصد آن مربوط به گروه شاهد و سطوح ۲ و ۱۶ میلی‌لیتر بود. افزودن ۱۲ میلی‌لیتر عصاره به رقیق کننده، به طور معنی‌داری درصد اسپرم ناهنجار را نسبت به گروه شاهد و تیمار ۲ میلی‌لیتر کاهش داد (P<۰/۰۵) ولی نسبت به سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۳).

Table 3- Effect of *Tanacetum balsamita* extract (mL/dL) on the viability, membrane integrity and acrosome abnormality of post-thawed ram spermatozoa (Lsmean±SEM).

Parameters	concentration of *Tanacetum balsamita* extract (mL/dL)					
	Control	2	4	8	12	16
Viability (%)	38.16±3.08[c]	40.06±3±57[bc]	43.48±3.42[bc]	46.29±4.26[ab]	49.71±4.15[a]	39.12±3.28[bc]
HOST (%)	41.18±3.31[b]	44.38±3.56[b]	47.34±3.48[ab]	52.63±4.62[a]	54.14±4.86[a]	40.75±3.34[b]
Acrosome abnormality (%)	26.70±3.20[a]	27.23±3.24[a]	23.31±2.16[ab]	24.48±2.72[ab]	21.25±2.63[b]	24.90±3.64[ab]

TM: total motility; PM: progressive motility; VSL: straight linear velocity; VCL: curvilinear velocity; VAP: average path velocity; ALH: amplitude of lateral head displacement; LIN: linearity and STR: straightness.
[a, b, c]: Within rows, means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).
SEM: Standard Error Means.

بحث

در مطالعه حاضر با افزودن عصاره گیاه شاه اسپرم به رقیق‌کننده منی قوچ، فراسنجه‌های تحرک کل، تحرک پیشرونده و دیگر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم نسبت به گروه شاهد بهبود یافت. محققین نشان داده‌اند که بین تولید ROS در سلول و کاهش تحرک اسپرم یک ارتباط قوی وجود دارد، به طوری که مشخص شده است که با افزایش تولید رادیکال پراکسید هیدروژن این ترکیب در سراسر غشای اسپرم پخش شده و فعالیت برخی از آنزیم‌های حیاتی مانند آنزیم گلوکز-۶ فسفات دهیدروژناز را مهار کرده و باعث اخلال در تولید ATP و تحرک اسپرم می‌شود (آیتکین و همکاران ۲۰۰۳). عصاره این گیاه علاوه بر بهبود فراسنجه‌های حرکتی اسپرم، در سطوح ۸ و ۱۲ میلی‌لیتر در دسی لیتر باعث افزایش درصد زنده‌مانی اسپرم و کاهش درصد اسپرم ناهنجار بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی در مقایسه با

گروه شاهد شد. همچنین در سطوح ۸ و ۱۲ میلی‌لیتر، غشای پلاسمایی اسپرم از آسیب‌های ناشی از فرآیند انجماد حفظ شده و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم-ها بهبود یافت. در این آزمایش استفاده از عصاره این گیاه به میزان بیش از ۱۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر در رقیق کننده اثرات منفی بر بیشتر فراسنجه‌های مورد بررسی داشت که این اثرات بیشتر به دلیل تغییرات اسمزی، pH و به هم خوردن تعادل ترکیبات رقیق‌کننده گزارش شده است، زیرا به هم خوردن میزان گلیسرول و زرده تخم مرغ در رقیق‌کننده، که به عنوان محافظت‌کننده و نگهدارنده اسپرم از شوک سرمایی در طی فرآیند انجماد محسوب می‌شوند، باعث کاهش فراسنجه‌های کیفی و زنده‌مانی اسپرم خواهد شد (دقیق کیا و همکاران ۲۰۱۴). افزودن سطوح بالای آنتی‌اکسیدان‌ها، با مهار بیش از حد فعالیت آنزیم‌های دخیل در اکسیداسیون و احیا و به هم زدن تعادل بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تولید رادیکال‌های آزاد باعث کاهش فراسنجه‌های کیفی اسپرم می‌شوند (روکا و همکاران ۲۰۰۴). نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای سلول‌های اسپرم نشخوارکنندگان نسبت به سایر گونه-ها بیشتر است به همین دلیل اسپرم این حیوانات نسبت به پراکسیداسیون لیپیدی به شدت حساس می‌باشد. ترکیبات فنولیک (به ویژه فلاونوئیدها) قادرند با پوشش دادن لیپیدها روند پراکسیداسیون لیپیدی را متوقف کنند و از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرده و با محدود کردن پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع، از غشاهای سلولی محافظت کنند (بلوخینا و همکاران ۲۰۰۳).

نحوه فرآوری اسپرم و انجماد آن و همچنین حفظ کیفیت و باروری اسپرم در تکنیک تلقیح مصنوعی اهمیت ویژه‌ای دارد. عواملی مانند روش انجماد، نوع رقیق کننده، سرعت سردسازی، سرعت انجماد و سرعت یخ‌گشایی در موفقیت انجماد اسپرم نقش اساسی دارند (کلالو و همکاران ۲۰۰۸). در مراحل مختلف فرآوری و انجماد اسپرم، تنش‌های وارد شده به سلول اسپرم مانند شوک سرمایی، نور و عوامل بیماری‌زا و ... میزان تولید رادیکال‌های آزاد در سلول اسپرم را افزایش می‌دهند که این مواد در نهایت با ایجاد تغییرات مخرب فیزیولوژیکی و شیمیایی در غشای اسپرم، بر تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای سلول و در نهایت بر باروری آن تأثیر منفی خواهند داشت (چاترجی و همکاران ۲۰۰۱). رادیکال‌های آزاد در فرآیند تولید انرژی در زنجیره انتقال الکترون سلول‌ها تولید می-شوند که ROS از مهمترین این مواد می‌باشند (بانسال و بیلاسپوری ۲۰۱۱). این ترکیبات منجربه پراکسیداسیون چربی غشای اسپرم شده و به DNA و پروتئین‌های اسپرم آسیب وارد می‌کند و در نهایت منجر به مرگ سلول اسپرم می‌شوند (آگاروال و همکاران ۲۰۰۴).

آنتی‌اکسیدان‌های موجود در پلاسمای منی به عنوان جاروب کننده‌های رادیکال‌های آزاد، شرایط سلولی را به گونه‌ای تغییر می‌دهند که جنبایی اسپرم حفظ شده و مرگ سلولی اتفاق نیفتد (بوکاک و همکاران ۲۰۱۰). آنتی‌کسیدان‌های پلاسمای منی شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز/گلوتاتیون ردوکتاز) و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (پیروات، گلوتاتیون، آلبومین، ویتامین‌های A، B و C) می‌باشند. رقیق‌سازی منی با رقیق کننده‌ها در زمان فرآوری و انجماد اسپرم، باعث کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی شده و به همین دلیل از آنتی‌اکسیدان‌های خارجی در رقیق کننده‌ها استفاده می-شود (بیلودا و همکاران ۲۰۰۰). پژوهش‌ها نشان می-دهند که افزودن ترکیباتی مانند آلفا توکوفرول، آنزیم-های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و ویتامین‌های E و C به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، اسپرم را در برابر تنش‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند (مالو و همکاران ۲۰۱۱). اما برخی آنتی‌آکسیدان‌های سنتتیک حاوی ترکیبات سمی می‌باشند و بنابراین امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی (گیاهی) به جای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مورد توجه محققین قرار گرفته است (یانیشلیوا و همکاران ۱۹۹۶). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها نظیر یک تیغ دو لبه عمل می‌کند به‌طوری که در یک محدوده بسیار ظریف از تغییرات غلظتی، این

ترکیبات با تغییر ماهیت تبدیل به ترکیبات خطرآفرین برای سلول خواهند شد (آیتکین و دروت ۲۰۲۰). بیشتر مطالعات انجام شده به حذف رادیکال‌های آزاد از سلول متمرکز شده است در حالی که هدف استفاده از آنتی-اکسیدان‌ها در رقیق کننده‌ها ایجاد تعادل بین رادیکال-های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌های سلولی می‌باشد و هرگونه تغییر در جهت افزایش نسبت رادیکال‌های آزاد شرایط استرس اکسیداتیو را ایجاد می‌کند (اسکاندالوس ۲۰۰۲). علاوه بر ترکیبات فنولیک موجود در گیاهان مانند فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و دی‌ترپن‌های فنولیک، بسیاری از گونه‌های گیاهی حاوی سطوح بالایی از ویتامین‌های C، E و کاروتنوئیدها نیز هستند که این ترکیبات نقش بسیار مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد به ویژه ROS و تجزیه عوامل پراکسید دارند (جوانمردی و همکاران ۲۰۰۳).

در پژوهشی افزودن عصاره گیاه رزماری به رقیق کننده توانست فراسنجه‌های تحرک کل، تحرک پیشرونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم قوچ را بهبود دهد (خدائی مطلق و همکاران ۲۰۱۴). در مطالعه مشابهی، افزودن عصاره گیاه رزماری به رقیق‌کننده منی بز، موجب بهبود فراسنجه-های تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و کاهش میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم شد که می‌تواند اسپرم را در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد حفظ کند (زنگانه و همکاران ۲۰۱۳). در آزمایشی دیگر افزودن عصاره آبی گیاه رزماری به رقیق‌کننده منی خوک باعث بهبود فراسنجه‌های تحرک و زنده‌مانی اسپرم شد و غلظت مالون دی آلدهید را به طور معنی‌داری کاهش داد (مالو و همکاران ۲۰۱۱). دقیق کیا و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که افزودن ۲ و ۴ میلی‌لیتر در دسی لیتر عصاره گیاه مرزنگوش به رقیق‌کننده منی گاو، فراسنجه‌های حرکتی اسپرم، زنده-مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی را بهبود و میزان مالون دی آلدهید را کاهش داد. در مطالعه دیگری افزودن سطح ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره آویشن به رقیق کننده اسپرم قوچ، اثرات مثبتی روی بسیاری از فراسنجه‌های حرکتی اسپرم و همچنین زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی داشت (واحدی و همکاران ۲۰۱۸). اثرات آنتی‌اکسیدانی گیاهان رزماری، مرزنگوش، آویشن و بسیاری دیگر از گیاهان داروئی در مطالعات انجام شده به دلیل وجود ترکیبات آنتی-اکسیدانی مانند پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها گزارش شده است. گیاه شاه اسپرم نیز همانند این گیاهان حاوی ترکیبات فنولیکی (فلاونوئیدها و فنولیک اسیدها) می-باشد (فارالونی و همکاران ۲۰۱۸). از گونه‌های مختلف گیاهی *Tanacetum* که شاه اسپرم نیز جزء این گونه‌ها می‌باشد، در صنعت مواد غذایی به عنوان نگهدارنده مورد استفاده قرار گرفته است که به دلیل وجود ترکیبات فنولیکی در این گیاهان و خاصیت آنتی-اکسیدانی آنها بوده است (ایوانسو و همکاران ۲۰۱۸).

نتیجه گیری کلی

در پژوهش حاضر اضافه نمودن سطوح ۸ و ۱۲ میلی-لیتر در دسی لیتر عصاره گیاه شاه اسپرم به رقیق کننده اسپرم بر پایه تریس، بسیاری از فراسنجه‌های حرکتی اسپرم، درصد زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و مورفولوژی اسپرم را بهبود داد. این تأثیرات مثبت را می‌توان به وجود ترکیبات متعدد پلی‌فنولیک نسبت داد که اثر آنتی‌اکسیدانی آن‌ها توسط اکثر مطالعات اثبات شده است. با توجه به محدودیت-های این مطالعه در تعیین دقیق اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه شاه اسپرم در رقیق کننده و همچنین عدم انجام تلقیح مصنوعی و تعیین باروی نیاز به مطالعات بیشتر در خصوص مکمل نمودن عصاره این گیاه به رقیق کننده انجمادی می‌باشد.

منابع مورد استفاده

Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS and Said TM, 2004. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reproductive BioMedicine Online 8: 616-27.

Aitken RJ and Sawyer D, 2003. The human spermatozoon – not waving but drowning. Advances in Experimental Medicine and Biology 518: 85-98.

Aitken RJ and Drevet JR, 2020. The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: a two-edged sword. Antioxidants 9(2):111.

Arora A, Nair GM and Strasburg MG, 1998. Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. Free Radical Biology and Medicine 2: 1355-1363.

Bączek KB, Kosakowska O, Przybył JL, Pióro-Jabrucka E, Costa R, Mondello L and Węglarz Z, 2017. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). Industrial Crops and Products 102: 154–163.

Baghshahi H, Riasi A, Mahdavi AH and Shirazi A, 2014. Antioxidant effects of clove bud (Syzygium aromaticum) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. Cryobiology 69: 482-487.

Bansal AK and Bilaspuri GS, 2011. Impacts of oxidative stress and Antioxidants one semen functions. Veterinary Medicine International Article ID 686137: 1-7.

Benedec D, Filip L, Vlase L, Bele C, Sevastre B, Raita O, Olah NK and Hanganu D, 2016. In vitro study of antioxidant activity and phenolic content of Chrysanthemum balsamita varieties. Journal of Pharmaceutical Sciences 29(4): 1359–1364.

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.

Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV, 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany 91: 179-194

Bucak MN, Tuncer PB, Sarıözkan S, Başpınar N, Taşpınar M, Çoyan K, Bilgili A, Akalın PP, Büyükleblebici S, Aydos S and Ilgaz S, 2010. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. Cryobiology 61: 248-53.

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

Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LHA, Evans G and Maxwell WMC, 2008. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. Animal Reproduction Science 108: 298-308.

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 6(4): 783-789.

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 17(12): 98-105.

Daghigh Kia H, Sadeghi Sadegh Abad F, Mohamadzadeh H, Vaseghi Dodran3and H and Ashrafi I, 2017. The effect of origanum vulgare extract as natural antioxidant on quality cryopreserved ram sperm. Journal of Animal Science Researches 26(4): 111-120. (In Persian)

Faraloni C, 2018. Antioxidant Property and Antimicrobial Activity of the Aromatic Plant Balsamita major Desf. International Journal of Clinical and Medical Microbiology 3: 138.

Hassanpouraghdam MB, Tabatabaie SJ, Nazemyieh H, Afla-tuni A and Esnaashari S, 2008. Chemical composition of the volatile oil from aerial parts of *Tanacetum balsamita* growing wild in northwest of Iran. Croatica Chemica Acta 12(3): 26-35.

Ivănescu BI, Tuchiluș CR, Corciovă AN, Lungu CR, Mihai CT, Gheldiu AM and Vlase LA, 2018. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of *Tanacetum vulgare*, *Tanacetum corymbosum* and *Tanacetum macrophyllum* extracts. Farmacia 66(2): 282-288.

Javanmardi J, Stushnoffb C, Lockeb E and Vivancob JM, 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. Food Chemistry 83: 547–55.

Jeong SY, Kim DR, Kim KC, Nam DU and Ahn Lee SC, 2004. Effect of seed roasting conditions on the antioxidant activity of defatted sesame meal extracts. Food and Chemical Toxicology 69: 377-381.

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 69: 217–222

Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JL and Sullivan R, 2000. Cryopreservation Alters the Levels of the Bull Sperm Surface Protein P25b. Journal of Andrology 21: 700-707.

Lotfipour F, Samiee M and Nazemiyeh H, 2007. Evaluation of the antibacterial activity of Salvia sahendica and Phlomis caucasica. Pharmaceutical Sciences 1: 29-34.

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 61: 142-147.

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

Purdy PH, 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research 63: 215-225.

Rice-Evans C, Miller NJ and Paganga G, 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Sciences 2: 152-159.

Roca J, Gil MA, Hernandez M, 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.

Scandalios JG, 2002. Oxidative stress responses - what have genome-scale studies taught us?. Genome Biology 3(7): 1019.1–1019.6.

Shahhoseini R, Azizi M, Asili J, Moshtaghi N and Samiei L, 2019. Comprehensive Assessment of Phytochemical Potential of *Tanacetum parthenium* (L.): Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, Essential Oil and Parthenolide. Journal of Essential Oil Bearing Plants 22(3): 614-629.

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. Iranian Journal of Applied Animal Science 8(2): 263-269

Yanishlieva NV and Marinova EM, 1996. Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 203(3): 220–223.

Zanganeh Z, Zhandi M, Zare Shahneh A, Najafi A, Nabi M and Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2013. Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Ruminant Research 114(1): 120.

Effects of Costmary (*Tanacetum balsamita* L.) extract on selected quality parameters of Moghani ram sperm after cryopreservation

V Vahedi[1]*

Received: March 4, 2020 Accepted: June 18, 2020
[1]Assistant Professor, Department of Animal Science, Moghan College of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
*Corresponding author: Email: vahediv@uma.ac.ir

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Researches

Journal of Animal Science/vol.30 No.4/ 2021/pp 71-82
https://animalscience.tabrizu.ac.ir

OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)

DOI: 10.22034/as.2021.38678.1560

Introduction: The artificial insemination is based on sperm cryopreservation technique that induces irreversible damages to motility, viability, plasma membrane integrity, and fertility of the sperm (Purdy 2006; Baghshahi et al. 2014). Physical and chemical damages during cryopreservation are associated with reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation of the phospholipids in the membrane by free radicals (Chatterjee et al. 2001). The removal of ROS is catalyzed by antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase (GSH-PX), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Numerous non-enzymatic defenses (vitamin C, vitamin E, and glutathione (GSH)) are also employed to protect cells from oxidative damages. An imbalance between free radical production and their removal leads to ageing and its subsequent progressive damage. Many studies have been investigated the protecting effects of synthetic and natural antioxidants against oxidative damage on spermatozoa during cryopreservation (Malo et al. 2010). Of many classes of natural compounds, plant secondary metabolites (e.g., flavonoids, tannins, coumarins, xanthons, phenolics, lignans and terpenoids) have repetitively shown antioxidative properties. Correspondingly, several studies have shown the positive effects of herbal antioxidants on the sperm quality during the freezing-thawing processes (Daghigh Kia et al. 2016; Vahedi et al. 2018). Costmary (*Tanacetum balsamita* L.) with antioxidant effects contains phenolic compounds, such as flavonoids and phenolic acids (Shahhoseini et al. 2019) (Bączek et al. 2017). The aim of current study was to evaluate the effect of costmary extract as a natural antioxidant on post-thawed ram sperm quality.

Material and methods: This study was performed at the Iranian Moghani sheep Breeding Center located in Jafarabad city, Province of Ardebil, Iran. Four mature and fertile rams (3-4 years old, mean live weight of 70±4.2 kg), were used in this study. Ejaculates were collected twice a week for 8 weeks by an artificial vagina (42-43°C). Only samples containing spermatozoa with greater than 70% motility were accepted for the experiment. To eliminate individual differences, semen samples were pooled and processed. The pooled ejaculate was diluted (37 ◦C) using egg yolk-citrate extender containing different concentrations of *Tanacetum balsamita* extract (0, 2, 4, 8, 12, and 16 mL/dL). Diluted semen samples were aspirated into 0.25 ml straws and equilibrated at 4°C for 3 h. After equilibration, the straws were placed on liquid nitrogen (LN2) vapor for 8 min, then plunged into liquid nitrogen, and stored in a liquid nitrogen tank until thawed and used for evaluation of sperm parameters. Prior to analysis, the frozen straws were thawed individually in a water bath (37 ◦C) for 30 s. A computer-assisted sperm analysis (HFT CASA, Hooshmand Fanavar Tehran Co,

Iran) was used to analyze sperm motility and velocity characteristics. Sperm viability was assessed using a modification of the eosin-nigrosin staining method described by Evans and Maxwell (1987). Sperm membrane functionality was evaluated using the hypoosmotic swelling test (HOST) (Revell and Mrode, 1994). For the assessment of the sperm morphology abnormalities, at least three drops of each sample were added to Eppendorf tubes containing 1 ml of Hancock solution (62.5 ml formalin (37%), 150 ml sodium saline solution, 150 ml buffer solution and 500 ml double-distilled water). The prepared slides were assessed by phase-contrast microscopy at the 400× magnification. All data were analyzed by completely randomized design using the GLM procedure of SAS (version 9.1, SAS Institute, 2004).

Results and discussion: Samples cryopreserved in 8 and 12 mL/dL had higher total motility and progressive motility compared to the control group (P<0.05). The percentage of VSL, VCL and VAP were higher (P<0.05) in the extender containing 8 and 12 mL/dL extract compared to control and 16 mL/dL groups. LIN parameter was higher (p<0.05) in 8 mL/dL compared to 16 mL/dL extract (46.83±3.82% vs. 40.52±3.23%). For parameter STR, the highest value (P<0.05) was observed at 8 and 12 mL/dL of extract (81.09±7.56% and 80.27±7.18%, respectively). The highest (p<0.05) percentage of sperm viability and plasma membrane integrity were observed in groups containing 8 and 12 mL/dL extract. Percentage of acrosome abnormality was higher (p< 0.05) in 12 mL/dL extract groups (21.25%) compared with control and 2 mL/dL extract groups (26.70% and 27.23%, respectively). Some studies have reported that herbal antioxidants reduce the free radicals following the freeze–thawing process (Ashrafi et al. 2013). In the present study, costmary extract treatment of the semen resulted in a significant improvement in motility parameters, viability and membrane integrity of frozen-thawed ram sperm. The main constituents of costmary extract have been reported to be polyphenolic compounds, such as flavonoids and phenolic acids (Faraloni, 2018). Among flavonoids, glycosides of luteolin, apigenin and quercetin are the most abundant ones while phenolic acids are mainly represented by chlorogenic, caffeic and dicaffeoylquinic acids. Reactive oxygen species occurrences during cryopreservation would lead to reduction of oxygen and sperm membrane lipid peroxidation thus loss of its integrity. Flavonoids protect membrane integrity by preventing the production of free radicals and lipid peroxidation hence hindering oxidative damage to the membrane components (Daghigh Kia et al. 2016). Our findings demonstrate the free radical scavenging and protective effect of costmary extract against oxidative damage during sperm cryopreservation.

Conclusion: In conclusion, this study showed that supplementation of extender with 12 mL/dL *Tanacetum balsamita* L. extract has a beneficial effect on the quality of frozen-thawed ram semen.

Keywords: Antioxidant, Freeze-thawing, Membrane integrity, Ram semen, *Tanacetum balsamita* extract