نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۵ شماره ۱/ سال۱۳۹۴

تاثیر سطوح مختلف عصاره الکلی مرزه سهندی بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاو هلشتاین

رقیه شهباززاده[۱]، حسین دقیق کیا[۲]، غلامعلی‌مقدم[۳]، غلامرضا دهقان[۴]، علی حسین‌خانی[۲] و ایرج اشرفی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۱۰

[۱] دانش‌آموخته ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۲] دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۳] استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۴] دانشیار دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز
[۵] دانشجوی دکتری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: استفاده از آنتی اکسیدان‌ها باعث بهبود کیفیت اسپرم پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشائی می‌شود. **هدف**: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر سطوح مختلف عصاره الکلی مرزه سهندی بر پارامترهای کیفی اسپرم گاو هلشتاین پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشائی بود. **روش کار**: در این پژوهش از ۳ راس گاو نر با سن ۵-۶ ساله استفاده شد. اسپرم‌گیری ۲ بار در هفته و توسط واژن مصنوعی انجام شد. نمونه‌های منی در هر بار اسپرم‌گیری با هم مخلوط شدند. تیمارهای آزمایشی شامل ۷ سطح عصاره اتانولی مرزه سهندی (۰، ۲، ٤، ۸، ۱۲، ۱٦ و۲۰ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر) بودند که بر نمونه‌های منی رقیق‌شده در رقیق کننده سیترات-زرده تخم مرغ افزوده شدند. سپس نمونه‌ها منجمد شده و بمدت ۳ هفته در تانک ازت نگهداری شدند. پس از یخ‌گشایی و ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه پارامترهای کیفی اسپرم نظیر تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و پراکسیداسیون لیپید ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که سطح ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر از عصاره مرزه سهندی به طور معنی‌داری سبب بهبودی پارامترهایی همچون تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی در مقایسه با شاهد شد ($P < ۰/۰۵$). میزان مالون دی‌آلدوئید تولیدی در تیمارهای ۲ و ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره کمتر از گروه کنترل بود اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. **نتیجه گیری نهایی**: سطح ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره الکلی مرزه سهندی تا حدی بر پارامترهای مورد بررسی تاثیر مثبت دارد.

واژگان کلیدی: عصاره مرزه، آنتی‌اکسیدان طبیعی، اسپرم گاو، حفاظت انجمادی، استرس اکسیداتیو

مقدمه

انجماد منی نقش بسیار مهمی در پیشرفت و توسعه تکنیک‌های تولیدمثلی از جمله تلقیح مصنوعی دارد (بوکاک و همکاران ۲۰۰۸). انجماد اسپرم با اعمال تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی در غشای اسپرم، میزان زنده‌مانی اسپرم بعد از یخ‌گشایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (هالت ۲۰۰۰). هر یک از مراحل انجماد (رقیق‌سازی، تعادل و سردسازی، انجماد و ذوب) می‌تواند به ساختار غشای پلاسمایی و عملکرد طبیعی اسپرم آسیب رسانده و تحرک و باروری اسپرم را کاهش دهند (آندرا و زمفیرسکوکو ۲۰۱۰). همچنین انجماد با تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) همراه است. گونه‌های اکسیژن فعال عوامل اکسید شده بسیار واکنش‌پذیر وابسته به دسته‌ای از رادیکال‌های آزاد هستند (سیکا ۱۹۹٦). آنتی‌اکسیدانها با مهار واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداتیو و ایجاد تعادل بین مواد اکسیدانی و آنتی اکسیدانی موجب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شوند (بانسال و بیلاسپوری ۲۰۱۱).

در حالت طبیعی پلاسمای منی دارای مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی برای مهار ROSها و محافظت علیه هر نوع آسیب وارده به اسپرم می‌باشد ولی در مقابل استرس-های وارده در جریان فرآیند انجماد-یخ‌گشایی، مراحل مختلف نگهداری اسپرم (چاترجی و همکاران ۲۰۰۱) و در جریان التهاب و عفونت‌های مجاری تناسلی، این مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی کافی نیستند (سیکا ۱۹۹٦). انواع آنتی اکسیدان‌های سنتتیک از جمله ملاتونین (اشرفی و همکاران ۲۰۱۳)، تورالاکس (پنا و همکاران ۲۰۰۳)، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، بوتیلید هیدروکسی تولوئن (روکا و همکاران ۲۰۰٤ و ۲۰۰۵) و سیستئین (کائوکت و همکاران ۲۰۱۰) در بهبود تحرک اسپرم بعد یخ‌گشایی مورد مطالعه قرار گرفته است. با این حال محدودیت در استفاده از آنتی اکسیدان‌های سنتتیک از جمله بوتیل هیدروکسی آنیزول[۱] (BHA) و بوتیل هیدروکسی تولوئن[۲] (BHT) بواسطه اثرات آنها سهم آنتی اکسیدان‌های طبیعی را افزایش می‌دهد (سوری و همکاران ۲۰۰٤). در چند سال اخیر تحقیقات در رابطه با آنتی اکسیدان‌های طبیعی بویژه از منشاء گیاهی افزایش یافته است (نیک آور و همکاران ۲۰۰۸).

عصاره بسیاری از گیاهان از جمله مرزه، رزماری، آویشن و مرزنجوش حاوی ترکیبات بیواکتیو از جمله فنول‌ها و فلاونوییدها هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی موثری را نشان داده و از آسیب حاصل از رادیکال‌های آزاد ممانعت می‌کنند (صادقی و همکاران ۲۰۱۲). یکی از خصوصیات مهم فلاونوییدها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها است که می‌تواند با تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل در مولکول مرتبط باشد (دراگانا و همکاران ۲۰۱۲). مرزه متعلق به خانواده نعنائیان بوده و شامل بیش از ۳۰ گونه است (کاوار و همکاران ۲۰۰۸) که بعنوان محرک اشتها، ضدنفخ، خلط آور، ضداسهال و داروی تقویت کننده جنسی استفاده شده است (سفیدکان و جامزاد ۲۰۰۵). خاصیت آنتی‌باکتریایی، ضدقارچی، ضددیابت، ضد ایدز و محرک تولیدمثل گونه‌های مرزه به اثبات رسیده که احتمالا دلیل آن وجود روغن‌های فرار، فلاونوئیدها و تری‌ترپنوئیدها می‌باشد (ممتاز و عبداللهی ۲۰۱۰).

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که عصاره مرزه سهندی[۳] منبع خوبی از ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی بوده و یکی از قویترین خنثی کنندگان رادیکال های آزاد است (صادقی و همکاران ۲۰۱۲). تحقیقات انجام گرفته توسط هایری و همکاران (۲۰۰٦) در زمینه تاثیر مرزه خوزستانی بر باروری موشهای نر نشان می‌دهد که تزریق ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌گرم برکیلوگرم از اسانس این

۱-Butylhydroxyanisole

۲-Butylhydroxytoluene

۳-Sahandica

گیاه به موش‌های نر، منجر به افزایش تعداد اسپرماتوگونیوم، اسپرماتیک کورد[۱]، سلول‌های لایدیگ و اسپرماتوزوئیدها شده و اندازه سلول‌های سرتولی نیز افزایش داشته است (هایری و همکاران ۲۰۰۶).

تاکنون گزارشی در رابطه با تاثیر عصاره مرزه سهندی بر پارامترهای بعد از یخ‌گشایی اسپرم صورت نگرفته است. هدف از انجام این آزمایش، بررسی تاثیر سطوح مختلف عصاره مرزه سهندی بر کیفیت اسپرم گاو نژاد هلشتاین می‌باشد.

مواد وروش‌ها

تهیه عصاره مرزه سهندی

گیاه مرزه از شهرستان کلیبر استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری شده و بعد از خشک کردن در سایه، آسیاب گردید. جهت عصاره‌گیری ابتدا مرزه آسیاب شده در داخل ارلن ریخته شد. سپس تا ارتفاع ۲ سانتی‌متر بالاتر از سطح مرزه، اتانول ۶۰ درصد ریخته و هر ۳ ساعت بهم زده شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت محتویات ارلن از کاغذ صافی عبور داده شد. عمل خیساندن و صاف کردن حدود ۳ بار تکرار گردید. محلول صاف شده به کمک دستگاه سوکسله تغلیظ شده و بعد در مجاورت هوای آزاد قرار داده شد تا حلال آن بطور کامل جدا گردد. عصاره غلیظ مرزه سهندی جهت مصرف در این آزمایش در ۵۰ میکرولیتر توئین ۸۰[۲] و آب دیونیزه حل شد (زاواتی و همکاران ۲۰۱۱).

جمع‌آوری و رقیق‌سازی منی

این تحقیق در مرکز اصلاح نژاد شمال غرب و غرب کشور انجام شد. بدین منظور از سه راس گاو هلشتاین (۵-۶ ساله، وزن ۸۵۰ کیلوگرم) به تعداد دو بار در هفته و به وسیله مهبل مصنوعی اسپرم‌گیری شد. نمونه‌هائی از منی که دارای رنگ کرمی، حجم بین ۵-۱۲ میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از 1×10^{9} در میلی‌لیتر، تحرک بیشتر از ۷۰ درصد و مورفولوژی کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیرطبیعی در هر انزال داشتند، به عنوان منی نرمال در نظر گرفته شده و در غیر اینصورت منی‌های جمع‌آوری شده حذف شدند (گیل و همکاران ۲۰۰۳). به منظور حذف اثرات فردی دام و با در نظر گرفتن جمعیت اسپرم در مایع منی، نمونه‌های منی هر دام در مقدار مساوی با هم مخلوط شدند.

در این آزمایش از رقیق کننده بر پایه سیترات-زرده تخم مرغ (سیترات ۶۸۰ میلی لیتر در لیتر، جنتامایسین ۵ میلی‌لیتر در لیتر، تایلوزین ۰/۲۵ میلی‌لیتر در لیتر، لینکوپک ۳ میلی‌لیتر در لیتر، زرده تخم‌مرغ ۲۵ درصد، گلیسرول: ۷ درصد و pH=۶/۹) (اشرفی و همکاران ۲۰۱۳) به همراه سطوح مختلف عصاره مرزه سهندی (۲۰، ۱۶، ۱۲، ۸، ۴، ۲، ۰ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر) استفاده شد. در رقیق‌سازی اسپرم گاو از روش دو مرحله‌ای استفاده شد به نحوی که ۳ درصد گلیسرول در مرحله اول و در دمای ۳۷°C (رقیق‌کننده A) و باقیمانده گلیسرول (۱۱ درصد) در دمای ۵°C (رقیق‌کننده B) به مایع منی افزوده شدند. ترکیب مواد و حجم رقیق‌کننده-های A و B در فرآوری اسپرم گاو به جز درصد گلیسرول کاملا یکسان بود. بعد از سپری‌شدن زمان سردسازی و تعادل، نمونه‌ها توسط دستگاه فیلینگ-سیلینگ در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری پر و بسته‌بندی شده و توسط دستگاه نیمه‌اتوماتیک انجماد مطابق دستورالعمل مرکز اصلاح‌نژاد منجمد شدند. بعد از انجماد برای نگهداری تا زمان ارزیابی به تانک‌های ازت منتقل شدند.

یخ گشایی و ارزیابی پارامترهای اسپرم

پایوت‌های حاوی منی منجمد شده از تانک ازت خارج شده و در داخل حمام آب گرم با دمای ۳۷°C به مدت ۴۵ ثانیه یخ‌گشایی شدند، سپس محتویات پایوت درون

۴- spermatid cords

۵-Tween 80

میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری تخلیه شده و جهت تطابق پذیری و بازگشت آب درون سلولی به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفتند.

تحرک اسپرم

پس از یخ‌گشایی و انکوباسیون، ویژگی‌های جنبایی، جنبایی پیش‌رونده و ویژگی‌های کنتیکی حرکتی برای تمام تیمارهای آزمایشی به کمک سیستم آنالیز رایانه‌ای (CASA)[۱] مجهز به میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۱۰۰×(Nikon, Japan) ارزیابی شدند. روش کار به این صورت بود که ۵ میکرولیتر از نمونه منی روی لام از قبل گرم شده (۳۷°C) قرار گرفته و بعد از پوشاندن با لامل توسط CASA آنالیز شد. ارزیابی بر اساس شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم صورت گرفت (الفتی و همکاران ۲۰۱۳). پارامترهایی که توسط این سیستم‌ها برآورد شدند شامل جنبایی کل[۲]، جنبایی پیشرونده[۳]، سرعت در مسیر مستقیم[٤]، سرعت در مسیر منحنی[۵]، میانگین سرعت در مسیر[٦]، درصد خطی بودن جنبایی[۷]، تحرک عرضی سر[۸] بودند.

زنده‌مانی اسپرم

وضعیت زنده‌مانی اسپرم‌ها بوسیله رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین (۱/٦۷ گرم رنگ ائوزینY، ۱۰ گرم رنگ نگروزین، ۲/۹ گرم سیترات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) بر اساس روش دی‌گراف و همکاران (۲۰۰۷) ارزیابی شد. روش رنگ‌آمیزی به این صورت است که گسترشی از یک قطره نمونه اسپرم و یک قطره رنگ روی لام گرم تهیه شده و زنده‌مانی تعداد ۲۰۰ اسپرم بوسیله روغن امرسیون و میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ × مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌هایی که به طور جزیی یا کامل رنگ ارغوانی را نشان دادند مرده و اسپرم‌هایی که از ورود رنگ به داخل خود ممانعت کرده بودند، به عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شدند.

یکپارچگی غشای پلاسمایی

یکپارچگی غشای پلاسمایی با استفاده از تست التهاب هیپواسموتیک (HOST) (٤/۹ گرم تری-سدیم سیترات دی‌هیدرات، ۹گرم D(-) فروکتوز در یک لیتر آب مقطر یونیزه) بر اساس روش بوکت و همکاران (۱۹۹۷) تعیین شد. برای این آزمایش ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک با ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده مخلوط و به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس نمونه با ملایمت مخلوط شده و یک قطره (حدود میکرولیتر ۵) روی اسلاید گرم قرار داده و زیر میکروسکوپ (۴۰۰×) بررسی شد. ۲۰۰ عدد اسپرم در هر اسلاید شمارش شده و درصد اسپرم‌هایی با دم تاب‌خورده (طبیعی) که دارای غشای سالم بودند و اسپرم‌هایی با دم صاف با غشای آسیب دیده تعیین شد.

ارزیابی پراکسیداسیون لیپید

برای ارزیابی پراکسیداسیون لیپید ابتدا هموژن سلولی تهیه شد. به این صورت که پایوت‌های حاوی منی رقیق شده منجمد در آب حاوی۳۷°C بمدت ٦۰ ثانیه یخ گشایی شده و بعد از تخلیه محتویات پایوت‌ها به میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی، بلافاصله پس از افزودن ۱ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۹ درصد با سرعت g ×۳۵۰۰ بمدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس سه بار با بافر سیترات شستشو داده و مجددا سانتریفیوژ شدند. در نهایت محلول رویی دور ریخته شده و پلت باقیمانده اسپرم‌ها در ۱ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه حل شدند و تا زمان ارزیابی نمونه‌ها در فریزر (-۸۰°C) نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید MDAبه عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید، نمونه‌ها در دمای

---

۱ - Computer Aided Semen Analyses

۲- Total Motility

۳- Progressive motility(PM)

٤ - Straight–line velocity (micron/sec) (VSL)

۵- Curvilinear velocity (micron/sec) (VCL)

٦- Average path velocity (micron/sec) (VAP)

۷- Linearity (%) (LIN= VSL/VCL×100) (LIN)

۸- Lateral head displacement (micron)

۳۷°C یخ‌گشایی شدند. ۲۵۰ میکرولیتر از هموژن سلولی به ۱ میلی لیتر محلول ۲۰ درصد تری کلریدریک اسید و ۰/۵ درصد تیوباربیتوریتیک اسید اضافه کرده و بمدت ۱ ساعت در دمای ۹۵°C حرارت داده شده و سپس سریعا روی یخ سرد شد. در مرحله بعد نمونه‌ها بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند (۱۰ هزار دور در دقیقه). سپس جذب نوری محلول رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده با استفاده از استاندارد MDA به صورت نانومول در میلی‌لیتر بیان گردید (پینهو و همکاران ۲۰۰۶).

آنالیز آماری

این آزمایش در ۵ تکرار انجام شد. داده‌های بدست آمده برای صفات مورد ارزیابی در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS (۹,۱,۳) و به کمک رویه GLM آنالیز شدند. برای مقایسه میانگین این صفات از آزمون مقایسه‌ای دانکن استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شدند. سطح احتمال خطای معنی‌داری ۵ درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

تحرک کل

تاثیر سطوح مختلف عصاره مرزه‌سهندی بر پارامترهای تحرک در جدول ۱ آمده است. درصد تحرک کل برای تیمارهای ۲، ۸ و ۱۲ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود ولی برای تیمار ۱۶و ۲۰ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر معنی‌دار (P < ۰/۰۵) بوده و باعث کاهش تحرک کل شده است. بعلاوه سطح ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره منجر به بالاترین درصد تحرک کل گردید (P < ۰/۰۵).

تحرک پیش‌رونده

استفاده ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر از عصاره، باعث افزایش معنی‌داری تحرک پیش‌رونده نسبت به تیمار شاهد شد (P< ۰/۰۵). سایر سطوح تیماری موجب بهبود معنی‌دار تحرک پیشرونده نسبت به گروه شاهد نشده و استفاده از ١٦ و ۲۰ میلی‌لیتر بر دسی-لیترعصاره، باعث کاهش قابل توجه تحرک پیش‌رونده نسبت به گروه شاهد شد (P < ۰/۰۵).

افزودن ۲ و ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره مرزه به محیط انجماد باعث بهبود (VCL) و (VSL) و (VAP) نسبت به گروه شاهد شد. مقدار و میانگین سرعت در مسیر مستقیم در سطح ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته (P< ۰/۰۵) اما برای صفت سرعت در مسیر منحنی افزایش غیرمعنی-دار بود. برای پارامترهای VAP و VSL، استفاده از سطح تیماری ۸ میلی‌لیتر بر دسی‌لیترنسبت به تیمار ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر کاهش معنی‌دار داشته اما با گروه شاهد و سطوح تیماری ۲ و ۱۲ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر غیرمعنی‌دار بود. پارامتر VCL در تیمار٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر نسبت به گروه شاهد و سطوح ۲، ۸ و ۱۲ میلی لیتر بر دسی‌لیتر معنی‌دار نبوده اما در تیمارهای ١٦ و ۲۰ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر باعث کاهش معنی‌داری شد. رقیق‌کننده حاوی ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره مرزه باعث بهبود معنی‌دار (ALH) و (LIN) بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی نسبت به تیمار شاهد گردید (<۰/۰۵ P).

زنده‌مانی، یکپارچگی غشای اسپرم و پراکسیداسیون لیپید

نتایج حاصل از ارزیابی زنده‌مانی، یکپارچگی غشای اسپرم و پراکسیداسیون لیپید در جدول ۲ نشان داده-شده است. سطح تیماری ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره در مقایسه با گروه شاهد، افزایش معنی‌داری در درصد اسپرم‌های زنده داشت (P< ۰/۰۵). با این وجود تیمارهای ۸ و ۱۲ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشته و تیمارهای ١٦ و۲۰ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر در مقایسه با گروه شاهد، باعث

کاهش درصد اسپرم‌های زنده شد. تعداد اسپرم‌هایی که دم‌های متورم و پیچ‌خورده داشتند در سطوح ۲ و ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر بیشتر بود بدین معنی که غشای اسپرم‌ها در برابر صدمات ناشی از انجماد به خوبی محافظت شدند. تفاوت تیمار ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بوده (P < ۰/۰۵) ولی اختلاف تیمارهای ۲، ۸ و ۱۲ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر با گروه شاهد غیرمعنی‌دار بوده و دوزهای ١٦ و ۲۰ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری در درصد اسپرم‌های متورم وپیچ خورده داشتند.

جدول ۱- میانگین حداقل مربعات ± خطای استاندارد پارامترهای تحرک در تیمارهای آزمایشی

صفات	شاهد	۲ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر	٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر	۸ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر	۱۲میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر	١٦میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر	۲۰میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر
تحرک کل (٪)	٥٩/٦^{b}±٧/٥	٦٦/٢^{ab}±١٠/٧	٧٥/٩^{a}±٦/٥	٥٦/١^{b}±١٢/٣	٥٤/٤^{bc}±١٤/٢	٤٢/٢^{cd}±٩/١	٣٨/٢ ^{d}±٥/٤
تحرک پیشرونده (٪)	٤٩/٤^{bc}±٨/٢	٥٧/٩ ^{ab}± ٩/١	٦٤/٧^{a}±٤/١	٤٦/٩^{bc}±١١/٦	٤٤/٢^{cd}±١١/٢	٣٣/١^{de}±٩/٤	٢٨/١^{e} ±٦/١
سرعت در مسیر منحنی (میکرون بر ثانیه)	٤٦/٧^{ab}±٧/٣	٥٢/١^{a}± ٥/٧	٥٨/١^{a}±٥/٥	٤٦/٨^{ab}±١١/٥	٤٧/٢^{ab}±٨/٨	٣٧/٨^{bc}±١١/٠	٣٢/٩^{c}±٥/٨
میانگین سرعت در مسیر (میکرون بر ثانیه)	٣٣/٣^{b} ±٥/٨	٣٨/٦^{ab} ±٤/٥	٤٢/٨^{a}±٣/٦	٣٣/٤^{b} ± ٧/٨	٣١/٩ ^{bc}±٥/٧	٢٤/٩^{cd}±٦/٦	٢٠/٦^{d} ±٣/٤
سرعت در مسیر مستقیم (میکرون بر ثانیه)	٢٩/٥^{b} ±٥/٥	٣٤/٦^{ab} ±٤/٣	٣٧/٨^{a}±٣/٨	٢٨/٩^{b} ± ٦/٩	٢٧/٥^{bc} ±٥/٠	٢١/٢^{cd}±٥/٧	١٧/٥^{d}±٣/١
تحرک عرضی سر (میکرون)	٢/١^{bc} ±٠/٢	٢/٣^{ab} ± ٠/٣	٢/٦^{a} ± ٠/٣	٢/٢^{ab}± ٠/٤	٢/٣^{ab} ± ٠/٢	١/٩^{bc} ± ٤	١/٧^{c} ± ٠/٢
خطی بودن تحرک (٪)	٥٢/٩^{b} ±٤/٢	٥٧/٨^{a} ± ٣/٥	٥٩/٤^{a}±٣/٥	٥٢/٨^{b} ± ١/٦	٤٨/٣^{c} ± ٣/٠	٤٤/١^{d}±١/٣	٤٤/٢^{d}± ٢/٣

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ٥٪

آنالیز آماری نتایج حاصل از ارزیابی میزان تولید MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید، نشان داد که بین سطوح تیمارهای استفاده شده در این آزمایش در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود ندارد؛ با این وجود کمترین سطح مالون دی-آلدهید در اثر استفاده از سطوح ۲ و mL/dl٤ عصاره در رقیق‌کننده بدست آمد.

جدول ۲- مقایسه زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید در اسپرم یخ‌گشایی شده گاو همراه با سطوح آزمایشی عصاره مرزه سهندی (میانگین ± خطای معیار)

غلظت عصاره (میلی‌لیتر بر دسی لیتر)	زنده‌مانی (٪)	یکپارچگی غشای پلاسمایی (٪)	مالون‌دی‌آلدهید (نانو مول بر دسی لیتر)
گروه شاهد	٦٦/٣^{b} ± ٧/٢	٦٢/١^{bc} ± ٦/٧	١٧/٥ ± ٣/٤
٢	٧٣/٣^{ab} ± ٦/٧	٧٠/٨^{ab} ± ٦/٤	١٣/٢ ± ٢/٣
٤	٧٩/٦^{a} ± ٧/١	٧٧/١^{a} ± ٦/٠	١٣/٥ ± ٢/٣
٨	٦٤/٣^{b} ± ٨/٩	٥٨/٦^{c} ± ١١/٢	١٥/ ٦ ± ٤/٣
١٢	٦٢/٣^{bc} ±١٠/٥	٥٦/٢^{cd} ±١٤/٥	١٥/٩ ± ٣/١
١٦	٥٣/٢^{cd} ± ٦/٦	٤٥/٣^{d} ± ٦/٦	١٤/٣ ± ٧/٤
٢٠	٤٩/٩^{d} ± ٦/٧	٤٤/٣^{d} ± ٧/٢	١٩/٤ ± ٤/٤

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ٥٪

بحث

در سالیان اخیر، تلاش‌های قابل توجهی برای بهبود تکنیک‌های انجماد و تلقیح مصنوعی توسط منی منجمد انجام شده است. انجماد اسپرم، یک تکنولوژی مهم برای محافظت و توزیع اسپرم‌هایی با باروری و ارزش ژنتیکی بالا است؛ با اینحال فرآیندهای انجماد-یخ‌گشایی باعث آسیب‌های برگشت‌ناپذیر به اندامک‌های درون سلولی اسپرم، تغییر در سیالیت غشا و فعالیت آنزیمی می‌شود (آلوارز و استوری ۱۹۸۹). همچنین، زنده‌مانی، تحرک، یکپارچگی غشای‌اسپرم، توانایی باروری و لقاح کاهش یافته (گیلان و ماکسول ۱۹۹۹) و با تولید ROS منجر به پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم می‌شود (مالو و همکاران ۲۰۱۱). اسپرم پستانداران به پراکسیداسیون لیپید ناشی از استرس اکسیداتیو در طی انجماد بسیار حساس است (ایتکین و فیشر ۱۹۹٤). مطالعات پیشین، اثرات مفید افزودن آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک به رقیق‌کننده انجماد منی برای کاهش اثرات مضر ROS را نشان داده‌اند (بیلدوا و همکاران ۲۰۰۱). با این حال به دلیل احتمال سمیت آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک و نیز دسترسی آسان به گیاهان دارویی، مقرون به صرفه بودن و صرف هزینه کمتر نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک و نیز تهیه آسان عصاره با حداقل امکانات آزمایشگاهی، استفاده از آنتی‌اکسیدانهای گیاهی مورد توجه قرار گرفته است (یانشلیوا و مارینوا ۱۹۹٦). اطلاعات محدودی در باره تاثیر آنتی‌اکسیدانهای گیاهی بر اسپرم وجود دارد. مطالعات اخیرا تاثیرات مثبت ناشی از استفاده عصاره رزماری را در رقیق کننده انجماد منی چندین گونه از جمله خوک (مالو و همکاران ۲۰۱۰)، سگ (گونزالز و همکاران ۲۰۱۰)، گوسفند (گیل و همکاران ۲۰۱۰) و بز (زنگانه و همکاران ۲۰۱۳) گزارش کرده‌اند. همچنین استفاده از عصاره آبی گیاه رودیولا ساکرا[1] در رقیق کننده منی خوک مورد بررسی قرار گرفته است (ژائو و همکاران ۲۰۰۹). نتایج تحقیقات مالو و همکاران (۲۰۱۱) نشان می‌دهد استفاده از عصاره رزماری در رقیق کننده منی موجب بهبود جنبایی کل و پیشرونده، زنده مانی و یکپارچگی آکروزوم شده و سطح MDA به طور قابل توجهی کاهش می یابد. در مطالعه‌ای اثر آنتی اکسیدانی عصاره آبی گیاه رودیولا ساکرا بر خصوصیات منی خوک بعد از انجماد بررسی شده و نتایج نشان داد که افزودن مقادیر ٤، ٦ و ۸ میلی‌گرم بر لیتر عصاره گیاه فوق با اثر خنثی‌کنندگی قوی علیه رادیکال آنیون سوپراکسید و کاهش پراکسیداسیون لیپید، موجب افزایش تحرک و یکپارچگی غشای پلاسمایی شده است (ژائو و همکاران ۲۰۰۹). زنگانه و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که عصاره آبی رزماری باعث بهبود جنبایی کل و پیشرونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و کاهش میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در اسپرم بز می‌گردد.

در تحقیقی که توسط امینی راد و همکاران (۱۳۸۸) انجام شد اثر آنتی‌اکسیدانی آب انار بر پارامترهای اسپرم و پتانسیل باروری موش‌ها بررسی گردیده و نشان داد که مصرف خوراکی آب انار در بهبود پارامترهای اسپرم موثر بوده و مصرف آب انار باعث کاهش معنی‌داری درصد اسپرم‌های غیر پیشرونده و غیر طبیعی شد.

صوفی و همکاران (۱۳۹۱) اثر عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز روی پارامترهای حرکتی و سلامت غشا اسپرم قوچ را بررسی کردند و نشان دادند که عصاره شبدر قرمز اثر منفی روی تحرک و سلامت غشای اسپرم قوچ دارد و عصاره شبدر قرمز با افزایش غلظت و زمان تمام پارامترهای حرکتی را به طور معنی داری کاهش داده و سلامت غشای اسپرم قوچ با افزایش غلظت

[1] Rhodiola sacra

عصاره بیشتر کاهش می‌یابد.

مطالعه ما اولین بررسی در رابطه با تاثیر عصاره مرزه سهندی بر روی پارامترهای اسپرم یخ‌گشایی شده گاو می‌باشد. همانطور که قبلا اشاره شده است مرزه دارای اثر آنتی‌اکسیدانی قوی بوده و احتمالا این گیاه با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس‌های اکسیداتیو باعث افزایش کیفیت اسپرم‌ها می‌شود. نتایج بررسی ما نشان می‌دهد که استفاده از عصاره مرزه در طی انجماد می‌تواند به طور موثری اسپرم را از آسیب سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت کرده و به طور قابل توجهی تحرک کل و پیشرونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشا را بهبود دهد. نتایج نشان می‌دهد که منی منجمد شده با رقیق کننده حاوی ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره منجر به بالاترین سطح تحرک کل و پیش‌رونده، یکپارچگی غشا و زنده‌مانی بعد از یخ‌گشایی می‌شود. این بهبود در تحرک کل و پیش‌رونده احتمالا با یکپارچگی غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرماتوزوا مرتبط می‌باشد (مالو و همکاران ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱، ژائو و همکاران ۲۰۰۹). استفاده از ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر تاثیر مطلوبی در خنثی‌کردن عوامل اکسیداسیونی و بهبود صفت تحرک پیش‌رونده داشته درحالیکه دوزهای بالاتر تاثیر منفی داشتند. نتایج ما در مورد پارامترهای تحرک با نتایج تحقیقات مالو و همکاران (۲۰۱۱)، ژائو و همکاران (۲۰۰۹) و زنگانه و همکاران (۲۰۱۳) و امینی راد و همکاران (۱۳۸۸) مطابقت داشته اما با نتایج صوفی و همکاران (۱۳۹۱) مغایرت دارد.

همچنین استفاده ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر از عصاره مرزه سهندی زنده‌مانی را به‌طور قابل‌توجهی افزایش داده و میزان اسپرم‌های مرده را در مقایسه با سطوح دیگر تیماری کاهش داد؛ درحالیکه استفاده از سطوح ١٦ و ۲۰ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر اثر معکوسی بر اسپرم‌های زنده داشت. نتایج ما در مورد پارامتر زنده‌مانی با نتایج تحقیقات مالو و همکاران (۲۰۱۱)، ژائو و همکاران (۲۰۰۹) و زنگانه و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد.

بخشی از تاثیر مثبت رقیق کننده حاوی ٤ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره بر تحرک کل و پیش‌رونده احتمالا با زنده‌مانی بالاتر و کاهش اسپرم‌های مرده در این رقیق کننده مرتبط باشد. بنابر این می‌توان استنباط کرد که عصاره مرزه در این سطح تاثیر مثبتی بر غشای اسپرم داشت. به عبارت دیگر نتایج تست HOST نشان داد که افزودن عصاره مرزه سهندی به رقیق کننده اسپرم، باعث می‌شود غشای پلاسمایی اسپرم در طی فرآیند انجماد آسیب کمتری ببیند. استفاده از سایر سطوح در رقیق‌کننده، بویژه دزهای بالاتر، نه تنها اثر محافظتی برغشای اسپرم نداشته بلکه به دلیل بهم زدن فشار اسمزی بر غشای اسپرم آسیب وارد کرده است. نتایج مربوط به تست HOST با نتایج تحقیقات مالو و همکاران (۲۰۱۱)، ژائو و همکاران (۲۰۰۹) زنگانه و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت داشته اما با نتایج صوفی و همکاران (۱۳۹۱) مغایرت دارد.

در این مطالعه مشاهده شد که افزودن مرزه سهندی باعث کاهش سطح MDA بعد انجماد شد اما این کاهش معنی‌دار نبود. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعات مالو و همکاران (۲۰۱۱)، ژائو و همکاران (۲۰۰۹) مغایرت دارد، این تفاوت احتمالا ناشی از اسپرم گونه‌های حیوانی، نوع و گونه گیاه، روش عصاره‌گیری، دز استفاده شده از عصاره و ترکیبات رقیق‌کننده باشد. همچنین دلیل دیگر این مغایرت، تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین عصاره‌های آبی و اتانولی با ترکیبات بالای فنولیک اسیدها از جمله رزمارینیک اسید می‌باشد که توانایی خنثی‌کردن رادیکال‌ها از طریق گروه‌های هیدروکسیل را دارد (سرانو و همکاران ۲۰۱۱). در این تحقیق عصاره مرزه سهندی نتوانست از پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم جلوگیری کند. بهرحال، MDA یک ترکیب واسطه در فرآیند اکسیداسیون لیپید بوده و نمی‌تواند پارامتر قوی برای تعیین کیفیت اسپرم بعد یخ‌گشایی باشد (سلمانی و همکاران ۲۰۱۳).

مکانیسم اصلی تاثیر مرزه در انجماد اسپرم‌ها هنوز مشخص نشده است ولی مکانیسم کمکی برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرزه توانایی فلاونوییدهای موجود در این گیاه در پایدارسازی غشاها از طریق کاهش سیالیت غشا است (هاربورن و همکاران ۲۰۰۰). افزایش در سیالیت غشای پلاسمایی، نفوذپذیری و بی‌ثباتی غشا موجب کاهش عمر اسپرم‌ها می‌شود (واتسون ۱۹۹۵). فاکتورهای بسیاری از جمله محل رشد گیاه، روش عصاره‌گیری و نوع محلول استفاده شده برای عصاره-گیری بایستی مورد مطالعه قرار گیرند.

نتیجه‌گیری کلی

عصاره مرزه سهندی به عنوان مکمل افزوده شده به رقیق‌کننده انجماد اسپرم می‌تواند تاثیر مثبتی بر پارامترهای میکروسکوپیکی بعد از یخ‌گشایی داشته باشد. با وجود اینکه نتایج حاصل از این مطالعه و تحقیقات پیشین نشان می‌دهند که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نقش مهمی در کاهش اکسیداسیون لیپید و بهبود ویژگی‌های اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده دارند، مطالعات بیشتری برای شناخت و شناسایی ترکیبات فعال موجود در عصاره مرزه و ارزیابی قدرت باروری اسپرم‌های تیمار شده با این عصاره مورد نیاز است.

منابع مورد استفاده

امینی راد، ا، خلیلی، م، سلطانی‌گرد فرامرزی، ح، ۱۳۸۸. بررسی تأثیر مصرف آب انار بر پارامترهای اسپرم و پتانسیل باروری در موش. مجله پزشکی هرمزگان، جلد ۳، صفحه های۱۸۲-۱۸۸.

صوفی پ، فرخی اردبیلی ف، ملکی نژاد ح، برنوسی ا، ۱۳۹۱. اثر عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز روی پارامترهای حرکتی و سلامت غشا اسپرم قوچ . پنجمین کنگره علوم دامی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان.

Aitken J and Fisher H, 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. Bioessays 16(4): 259–267.

Alvarez JG and Storey BT, 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. Gamete Res 23(1): 77–90.

Andreea A and Zamfirescucu S, 2010. Role of antioxidant additives in the protection of the cryopreserved semen against free radicals. Romanian Biotechnological Letters. 15(3): 33-41.

Ashrafi I, Kohram H and Farrokhi Ardabili F, 2013. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. Anim Reprod Scie 139(1-4): 25-30.

Ashrafi I, Kohram H and Tayefi-Nasrabadi H, 2013. Antioxidant effects of bovine serum albumin on kinetics, microscopic and oxidative characters of cryopreserved bull spermatozoa. Spanish Journal of Agricultural Research 11(3): 695-701.

Bucak MN, Atessahin A and Yuce A, 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. Small Ruminant Res 75(2-3): 128–134.

Bansal AK and Bilaspuri GS, 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet Med Int 1-7.

Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C and Sirard MA, 2001. Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology 56(2): 275-86.

Buckett WM, Luchas MJ, Aird IA, Farquharson RG, Kingland CR and Lewis-Jones DI, 1997. The hypo-osmotic swelling test in recurrent miscarriage. Fertil Steril 68(3): 506-509.

Chatterjee S, de Lamirande E and Gagnon C, 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. J Mol Reprod Dev 60(4): 498–506.

Cavar S, Maksimovic M, Solic ME, Mujkic AJ and Besta R, 2008. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two Satureja essential oils. Food Chemistry 111(3): 648–653.

De Graaf SP, Evans G, Gillan L, Guerra MM, Maxwell WM and O'Brien JK, 2007. The influence of anti-oxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa, Theriogenology 67(2): 217–227.

Dragana M. Stanisavljević, Saša S. Stojiĉević, Sofija M. ĐorĊević, Branislav P. Zlatković, Dragan T. Veliĉković, Ivana T. Karabegović, Miodrag L. Lazić. 2012. Antioxidant activity, the content of total phenols and flavonoids in the ethanol extracts of *mentha longifolia* (l.) Hudson dried by the use of different techniques. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly 18(3): 411-420.

González N, Gil L, Martinez F, Malo C, Cano R, Mur P and Espinosa E, 2010. Effect of natural antioxidant rosemary in canine soya freezing extender. Reprod Domest Anim 45: 88.

Gil J, Lundeheim N, Soderquist L and Rodriiuez-Martinez H, 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology 59(5-6): 1241-1255.

Gil L, Mascaró F, Mur P, Gale I, Silva A, González N, Malo C and Cano R, 2010. Freezing ram semen: The effect of combination of soya and rosemary essences as a freezing extender on post-thaw sperm motility. Reprod Domest Anim 45: 91.

Gillan L and Maxwell WM, 1999. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. J Reprod Fertil Suppl 54: 271-283.

Holt WV, 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim Reprod Sci 62(1-3): 3-22.

Harborne JB and Williams CA, 2000. Advances in Flavonoid research since 1992. Phytochemistry 55(6): 481-504.

Haeri S, Minaie B, Amin G, Nikfar S, Khorasani R, Esmaily H, Salehnia A and Abdollahi M, 2006. Effect of Satureja khuzestanica essential oil on male rat fertility. Fitoterapia 77(7-8): 495-499.

Kaeoket K, Chanapiwat P, Tummaruk P and Techakumphu M, 2010. Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen. Asian J Andro 12(5): 760-765.

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(9): 1735-1741.

Malo C, Gil L, Gonzalez N, Martínez F, Cano R, de Blas I and Espinosa E, 2010. Antioxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (Rosmarinus officinalis). Cryobiology 61(1): 142-147.

Momtaz S and Abdollahi M, 2010. An update on pharmacology of Satureja Species; From Antioxidant, Antimicrobial. Antidiabetes and anti-hyperlipidemic to reproductive stimulation. International Journal of Pharmacology 6(4): 454-461.

Nickavar B, Alinaghi A and Kamalinejad M, 2008. Evaluation of the antioxidant properties of five Mentha species. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 7(3): 203-209.

Olfati Karaji R, Daghigh Kia H and Ashrafi I, 2014. Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze-thaw bull sperm. Cell and Tissue Banking 15(3): 461-470.

Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M and Rodriguez Martinez H, 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. Anim Reprod Sci 78(1-2): 85–98.

Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, Dal-Pizzol F and Moreira JC, 2006. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. Cell Biol Int 30(10): 848-853.

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. J Androl 25(3): 397–405.

Roca J, Rodriguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM and Martinez EA, 2005. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. J Androl 26(1): 15–24.

Sadeghi Ghotbabadi1F, Alizadeh A, Zadehbagheri M, Kamelmanesh MM and Shaabani M, 2012. Phytochemical composition of the essential oil, total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity in Iranian Satureja Sahendica Bornm at different ontogenesis conditions. Journal of Medicinal Plants Research 6(19): 3525-3534.

Salmani H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Towhidi A, Zare-Shahneh A and Zhandi M, 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semenextender on goat semen quality after freeze–thawing. Small Rumin Res 112(1-3): 123–127.

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

Serrano C, Matos O, Teixeira B, Ramos C, Neng N, Nogueira J, Nunes ML and Marques A, 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of Satureja Montana L. extracts. J Sci Food Agric 91(9): 1554-1560.

Sikka SC, 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front Biosci 1:e78-86.

Souri E, Amin GH, Dehmobed-Sharifabadi A, Nazifi A and Farsam H, 2004. Antioxidative Activity of Sixty Plants from Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 3: 55-59.

Watson PF, 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod Fertil Dev 7(4): 871–891.

Yanishlieva NV and Marinova EM, 1996. Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. Z Lebensm Unters Forsch 203(3): 220 –223.

Zanganeh Z, Zhandi M, Zare Shahneh A, Najafi A, Mahdi Nabi M and Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2013. Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Rumin Res 114(1): 120-125

Zhao Hw, Li Qw, Ning Gz, Han ZS, Jiang ZL and Duan YF, 2009. Rhodiola sacra aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen. Theriogenology 71(5): 849-857.

.

Effect of different levels of *Satureja sahendica* alcoholic extract on the quality of freeze-thawed Holstein bull spermatozoa

R Shahbazzadeh[1], H Daghigh Kia[2], Gh Moghaddam[3], Gh Dehghan[4], A Hosseinkhani[2] and I Ashrafi[5]

Received: December 04, 2013 Accepted: April 30, 2014

[1] MSc Graduated Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4]Associate Professor, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[5]PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
*Corresponding author: Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

Abstract

BACKGROUND: The use of antioxidants can improve sperm quality after freeze/thawing process. **OBJECTIVES:** The aim of the present study was to investigate the effect of *Satureja Sahendica* alcoholic extract on the quality of Holstein bull sperm after cryopreservation. **METHODS:** In this study, three matured bulls, aging 5-6 years old were used. Semen samples were collected twice a week, using an artificial vagina. Semen samples were pooled after each sampling. Experimental treatments included seven levels of *Satureja Sahendica* ethanol extracts (0, 2, 4, 8, 12, 16, and 20 mL/dL) which diluted with citrate-egg yolk diluents containing. Then, samples were frozen and transferred to liquid nitrogen tanks for three weeks. Thereafter and after thawing and incubation for 5 min, sperm quality parameters including motility, viability, membrane integrity and lipid peroxidation were evaluated. **Results:** The level of 4 mL/dL *Satureja Sahendica* extract significantly improved some parameters including motility, viability and plasma membrane integrity compared to control ($P<0.05$). The MDA concentration was lower by inclusion of 2 and 4 mL/dL extract compared to the control group, but this reduction was not significant. **CONCLUSIONS:** The level of 4 ml/dl alcoholic extraction of *Satureja Sahendica* has to somewhat positive effect on nominated parameters.

Key words: Satureja extract, Natural antioxidants, Bull semen, Cryopreservation, Oxidative stress