نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۶ شماره ۳/ سال۱۳۹۵

اثر سیلی‌مارین بر ذخیره سازی منی خروس در دمای ۴ °C

حسن ضیائی‌راد[۱]، محمد روستائی‌علی‌مهر[۲*] و مهرداد محمدی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹٤/۳/۱۷

[۱] دانشجو کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
[۲] دانشیار گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
*مسئول مکاتبه: Email: roostaei@guilan.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: سیلی‌مارین یک پلی فنل است که توانایی خنثی سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن را دارد و می‌تواند در ذخیره سازی اسپرم مفید باشد. **هدف**: این آزمایش به منظور بررسی اثر سیلی‌مارین بر ذخیره‌سازی اسپرم خروس در ٤°C انجام شد. **روش کار**: جمع‌آوری منی دو بار در هفته در ٥ نوبت از ۱۵ قطعه خروس بالغ انجام شد. انزال‌ها در هر نوبت بعد از تجمیع به پنج قسمت تقسیم شد. مقدار صفر (شاهد،S_0)، ٥٠ (S_{50})، ۱۰۰ (S_{100})،۱٥٠ (S_{150}) و ۲۰۰ (S_{200}) میکروگرم در میلی‌لیتر سیلی‌مارین به هر قسمت اضافه شد. سپس نمونه‌ها تا ٤ °C سرد شد و به مدت ۷۲ ساعت در این دما نگهداری شد. در زمان‌های صفر، ٢٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی، سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی (رنگ‌آمیزی هوخست ۳۳۲٥۸) و تحرک اسپرم ارزیابی شد. در زمان ٤٨ به منظور بررسی پراکسیداسیون چربی غلظت مالون‌دی-آلدهید (MDA) در ($۱۰^٦$× ۳۰۰) اسپرم اندازه‌گیری شد. **نتایج**: اثر متقابل سیلی‌مارین و زمان ذخیره‌سازی بر سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی و تحرک پیش‌رونده اسپرم معنی‌دار بود (P<۰/۰٥). در ساعت ٤٨ و ۷۲، به ترتیب بیشترین تحرک پیش‌رونده اسپرم در S_{50} (۵۹٪/۲۰) یا S_{100} (٦۱٪/۲۰) و S_{100} (٥۲٪/۰۰) و بیشترین سلامت غشای پلاسمایی اسپرم به ترتیب در S_{50} (٦۸٪/۱۲) یا S_{100} (٦۸٪/۳۲) و S_{100} (٦۲٪/٥۰) مشاهده شد (P<۰/۰٥). بیشترین زنده‌مانی اسپرم در زمان‌های ٤٨ و ۷۲ به ترتیب در S_{50} (به ترتیب ۷۱/٥۰٪ و ٥۹/۹٤٪) و S_{100} (به ترتیب ۷۱٪/٥٦ و ٦۲/٤٨٪) مشاهده شد (P<۰/۰٥). بیشترین میزان تولید MDA (۱/۱۲ µM/mL) و کمترین (۰/٥۹ µM/mL) به ترتیب در S_{200} و S_{100} مشاهده شد (P<۰/۰٥). **نتیجه‌گیری نهایی**: افزودن ۱۰۰ µg/mL سیلی‌مارین به منی سبب بهبود ماندگاری اسپرم خروس در ٤ °C می‌شود.

واژگان کلیدی:اسپرم خروس، فلاونوئید، آنتی‌اکسیدان، سیلی‌مارین

مقدمه

تلقیح مصنوعی از جمله روش‌های مدیریتی جهت افزایش راندمان تولید مثل در گله‌های مرغ مادر و لاین است. به طوریکه از نظر اصلاح نژادی با تلقیح مصنوعی می‌توان قدرت بارورکردن را در خروس‌های ممتاز افزایش داده و همچنین از خروس‌های مسن که دارای ارزش ژنتیکی بالایی هستند استفاده کرد (ضمیری

۱۳۸۰). ازجمله معایب این روش کاهش سریع قدرت باروری اسپرم‌ها به دلیل اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع و تشکیل رادیکال‌های آزاد، طی ذخیره‌سازی منی به صورت مایع یا یخ‌زده است (احمدی و ضمیری ۱۳۸٦).

در روند ذخیره سازی اسپرم، اگر چه به کمک سرما سرعت متابولیسم سلول و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن کاهش می‌یابد ولی وقوع پراکسیداسیون چربی-ها امری اجتناب ناپذیر است. نتیجه پراکسیداسیون چربی‌ها غشا، کاهش اسیدهای چرب غیراشباع و تولید مالون‌دای‌آلدهید (MDA) و ٤-هایدروکسی نوننول است. از آنجا که غلظت‌های بالای اسید چرب غیر اشباع برای حفظ سیالیت غشاء و تحرک اسپرم ضروری است، کاهش تحرک اسپرم در این شرایط قابل توجیه است (بامبر و همکاران ۲۰۰۰). همچنین، پراکسیداسیون چربی‌های غشای اسپرم سبب کاهش توان باروری، کاهش واکنش آکروزومی، تخریب کروماتین اسپرم و کاهش لقاح اووسیت می‌شود (کوداما و همکاران ۱۹۹٦و ورما و کانوارک ۱۹۹۹). اسپرم سلولی است که به دلیل مقدار ناچیز سیتوپلاسم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اندکی دارد (برکو و همکاران ۲۰۰۳). به همین دلیل اسپرم جهت کاهش اثر مضر رادیکال‌های آزاد اکسیژن وابسته به محیط اطراف، یعنی مایع منی است (برکو و همکاران ۲۰۰۳). از آنجاییکه رقیق سازی منی در فرایند عمل آوری منی اجتناب ناپذیر است لذا افزودن مواد آنتی اکسیدان به منی جهت ذخیره سازی به عنوان یک راه کار عملی مطرح است (بلسبوییس و همکاران۱۹۹۳ و دانگو و دانگو ۱۹۹۷).

عصاره گیاه ماریتیغال حاوی ۷۰-۸۰ درصد فلاونولیگنان سیلی‌مارین با فرمول شیمیایی $C_{25}H_{22}O_{10}$ است (رادکو و سیبولسکی ۲۰۰۷). قبلاً تصور می‌شد که سیلی‌مارین ترکیب خالصی با ساختار ۷-کرومانول-۳-متیل- تاکسی‌فولین است، اما با ابداع روش‌های دقیق‌تر برای تجزیه وجداسازی سیلی‌مارین مشخص شد که سیلی‌مارین شامل مخلوطی از شش ایزومـر سیلی-بین[1] و B، ایزوسیلی‌بین[2] و B، سیلی‌کریستین[3] و سیلی‌دیانین[4]است (کاواسینکا و همکاران ۲۰۰۳). سیلی-بین جز اصلی سیلی‌مارین است که ۳۰-۲۰ درصد از کل فلاولیگنان‌ها را شامل می‌شود و دو ایزومر آن یعنی سیلی‌بین A و B به نسبت تقریبی ۱:۱ وجود دارند. دو ایزومر ایزوسیلی‌بین یعنی ایزوسیلی‌بین A و B نیز به نسبت تقریبی ۷:۳ وجود دارند (کاواسینکا و همکاران ۲۰۰۳). به هر حال، آنچه به نام سیلی‌مارین عرضه می-شود مخلوطی از این شش ایزومر است (لی و لیو ۲۰۰۳). اثرات حفاظتی و آنتی‌اکسیدانی سیلی‌مارین در کشت سلول‌های لنفوسیتی و لوکوسیتی انسان به اثبات رسیده است (آندرسون و همکاران ۱۹۹٤ و لوچر و همکاران ۱۹۹۸). حساسیت بالای غشای پلاسمایی اسپرم خروس به اکسیداسیون سبب شده است که افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدان به منی خروس در زمان ذخیره سازی آن صورت مایع توصیه شود (دانگو و دانگو ۱۹۹۷). سیلی‌مارین جزء پلی فنل‌ها است و توانایی جذب و خنثی سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن را دارد (آندرسون و همکاران۱۹۹٤). بعلاوه سیلی‌مارین می-تواند مصرف اکسیژن و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از متابولیسم سلول را کاهش دهد (فراگالی و همکاران ۲۰۰۰). لذا هدف مطالعه حاضر مطالعه اثر مقادیر مختلف سیلی‌مارین بر منی خروس طی ذخیره سازی در ٤ درجه سانتی‌گراد است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش با استفاده از ۱۵ قطعه خروس سالم نژاد راس ۳۰۸ با سن۳۲ هفتگی در دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. خروس‌ها در قفس‌های

---

[1] Silybin
[2] Isosilybin
[3] Silychristin
[4] Silydianin

انفرادی به ابعاد (۷۵×۵۰× ٦۰ سانتیمتر) در دمای ۱۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد و تحت یک برنامه نوری با ١٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. جیره غذایی بر اساس توصیه شرکت راس تهیه شد و مقدار ۱۲۵ گرم در ابتدای پرورش تا ۱۳۵ گرم در انتهای پرورش برای هر خروس در نظر گرفته شد. خوراک در یک وعده و بلافاصله بعد از روشنایی صبح در اختیار پرندگان قرار داده شد و آب نیز به صورت آزاد در دسترس بود. نمونه‌های منی پس از ۱۰ روز (عادت‌دهی) و با استفاده از روش مالش شکمی بر اساس روش باروس و کوئین (۱۹۳۷) توسط یک تکنسین مجرب جمع‌آوری شد. نمونه‌های منی در ٥ نوبت با فاصله دو روز (حداقل از ۱۲ خروس در هر نوبت) جمع‌آوری شد. برای رقیق کردن نمونه‌ها از رقیق‌کننده سکستون (سیترات پتاسیم منوهیدرات mg ٦٤۰، L-گلوتامات سدیم g ۸/۰۷، کلرید منیزیمmg۳٤۰، فروکتوز g ٥، فسفات دی‌پتاسیم تری هیدرات g ۱۲/۷، فسفات منوپتاسیم mg٦٥۰، TES g°۳/۹٥، استات سدیم g٤/۳ در یک لیتر آب مقطر؛ pH= ۷/٤) استفاده شد. با توجه به غظلت منی خروس (در حدود ۱۰^۹ × ٥ اسپرم در هر میلی لیتر) و به منظور ممانعت از افت کیفیت نمونه‌های در زمان انتقال به آزمایشگاه، بعد از انزال دو قسمت منی با یک قسمت رقیق کننده مخلوط شد. سپس نمونه‌ها بلافاصله بوسیله فلاکس عایق حرارتی حاوی آب ۳۹ °C، به دور هرگونه نور به آزمایشگاه منتقل شدند (موس و همکاران۲۰۱۰). تحرک پیش‌رونده اسپرم و غلظت اسپرم با توجه به رقیق‌سازی اولیه در هر نمونه تعیین شد. نمونه‌هایی که تحرک کمتر از ۷۰ درصد و غلظت کمتر از ۱۰^٦× ۳۰۰۰ اسپرم در میلی‌لیتر داشتند از آزمایش حذف شدند. سپس انزال‌ها تجمیع شد و بوسیله رقیق‌کننده سکستون تا غلظت mL/اسپرم ۱۰^۹× ٤ رقیق شد. به منظور حل کردن سیلی‌مارین (Sigma, USA) از DMSO (Sigma, USA) استفاده شد. مقدار mg ٤۰۰ سیلی‌مارین در یک میلی‌لیتر DMSO حل شد بوسیله رقیق کننده سکستون محلول µ ٤۰۰g/mL سیلی‌مارین تهیه شد. نمونه‌های رقیق شده به ٥ بخش مساوی تقسیم و به هر بخش به صورت حجم به حجم ۱: ۱ رقیق‌کننده سکستون حاوی صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و µ ٤۰۰g/mL اضافه شد تا غلظت نهایی اسپرم به ۱۰^۹× ۲ در میلی‌لیتر و سیلی‌مارین به صفر، ٥۰، ۱۰۰، ۱٥۰ و µ ۲۰۰g/mL رسید. سپس نمونه‌ها به کمک دستگاه تست چمبر (Kaito, Japan) با سرعت ۰/۲٥ درجه در دقیقه تا °C ٤ سرد شد و به مدت ۷۲ ساعت در این دما ذخیره شد. جهت تعیین روزانه سلامت غشای پلاسمایی، تحرک و زنده‌مانی اسپرم در زمان-های صفر، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی مقداری از نمونه‌ها برداشته شد. بعد از ٤۸ ساعت ذخیره‌سازی، مقدار ۱٥۰ میکرولیتر از نمونه ها (که حاوی اسپرم ۱۰^٦× ۳۰۰ بود) جهت بررسی پراکسیداسیون چربی‌ها اسپرم برداشته شد. به این منظور غلظت مالون‌دی-آلدهید (µM/mL) در تیمارها بر اساس روش (کمارسان و همکاران ۲۰۰۹) تعیین شد. این روش بر پایه واکنش یک مولکول مالون‌دی‌آلدهید با ۲ مولکول اسید تیوباربیتوریک و تولید مولکولی صورتی رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ٥۳۲ نانومتر دارد.

ارزیابی اسپرم

غلظت اسپرم با کمک لام هموسایتومتر و میکروسکوپ (Olympus, Japan) با بزرگنمایی ٤۰۰ × بعد از رقیق کردن (۱/۲۰۰) نمونه های با آب انجام شد. میانگین تعدادسلول شمارش شده در پنج مربع با مساحت ۰/۰٤ میلی‌متر مربع تعیین و سپس تعداد اسپرم در واحد حجم (میلی لیتر) تعیین شد.

به منظور بررسی تحرک پیشرونده اسپرم پنج میکرولیتر از نمونه رقیق شده روی یک لام قرار داده شده و با گذاشتن یک لامل روی آن تحرک اسپرم در ٥ تا ۷ میدان دید با تخمین ۱۰٪ با کمک میکروسکوپ فاز

---

[5] 2-[(1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)amino]ethanesulfonic acid

متضـاد مجهـز بـه صـفحه گـرم بـا بزرگنمـایی ٤٠٠ × توسط یک تکنسـین مجـرب تعیـین شـد. میـانگین اعـداد بدست آمده بعنوان نتیجه ثبت شد (طباطبایی۲۰۱۲).

ارزیابی زنده‌مانی اسپرم با استفاده از رنگ هوخست بیس بنزامید H33258 (AppliChem,Germany) انجام شد (لیو و همکاران ۱۹۹۱). بطور خلاصه: بعد از اینکه نمونه‌ها به غلظت ۱۰^۹× ۰/۰۳ اسپرم در میلی‌لیتر رسانده شد، µ۱۰L از این نمونه‌ها با µ۱۰L از محلول رنگ هوخست بیس‌بنزامید (µ ۲۰g/mL ازهوخست بیس بنزامید H33258 در بافر M ۰/۱٥٤ سدیم کلرید و M ۰/۰۱۵ تری سدیم سیترات pH=۷) مخلوط شد و بعد از ۳۰ ثانیه در دمای اتاق µ ٥L از نمونه روی لام قرارداد شده و با گذاشتن لامل بر روی آن، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus IX70, Japan) و فیلتر WU با بزرگنمایی٤٠٠×، ۲۰۰ عدد اسپرم در شرایط نور بسیار کم بررسی و اسپرم‌های با رنگ آبی به عنوان پاسخ منفی (مرده) و اسپرم‌های بدون رنگ به عنوان پاسخ مثبت (زنده) در نظر گرفته شدند. برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم µ ۲٥L از نمونه‌ی اسپرم با µL ٥٠٠ از محلول هایپواسموتیک (۱گرم سیترات سدیم در ۱۰۰میلی‌لیتر آب مقطر با فشار اسمزی معادل ۱۰۰ میلی اسمول در کیلوگرم، pH=۷) مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه آون با دمای ۳۷°C قرار گرفت (مورنو و همکاران۲۰۰۹). سپس با استفاده از میکروسکوپ فاز متضاد با بزرگنمایی ٤٠٠×، حداقل در ٥ میدان دید ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی شد. اسپرم‌های دارای دم متورم به عنوان پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌های با دم بدون تورم به عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی ناسالم) در نظر گرفته شدند. نتایج بدست آمده از غلظت MDA در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم-افزار SAS و رویه GLM تجزیه شد. نتایج بدست‌آمده از تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی در قالب طرح کاملا تصادفی و به صورت داده‌های تکرار شده در زمان با استفاده از نرم افزار SAS و رویه Mixed آنالیز شدند. نتایج به صورت Lsmean ± SE ارائه و سطوح معنی‌داری در سطح ٥ درصد (P<۰/۰٥) در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج اثرمستقل سیلی‌مارین (جدول۱) نشان داد که بیشترین سلامت غشای پلاسمایی، تحرک پیش-رونده،زنده‌مانی اسپرم در مقدار٥۰ و ۱۰۰mg/mL مشاهد شد (P<۰/۰٥).

اثرمتقابل سیلی‌مارین و زمان ذخیره‌سازی برتحرک پیش‌رونده اسپرم معنی‌دار بود (شکل ۱، P<۰/۰٥). درزمان صفر ذخیره‌سازی اسپرم اختلاف معنی‌داری بین مقادیر مختلف سیلی‌مارین مشاهده نشد (P>۰/۰٥). درزمان ۲٤، تحرک اسپرم در مقدار ٥۰ میکروگرم سیلی‌مارین (۱/٦۹ ±۷۲/۰۰ درصد) بیشتر از آن در مقدار ۲۰۰ میکروگرم سیلی‌مارین (۱/٦۹±٦۷/۲۰ درصد) بود (P<۰/۰٥). درزمان ٤۸ بیشترین تحرک اسپرم درمقدار ۱۰۰ میکروگرم سیلی‌مارین (۱/٦۹ ± ٦۱/۲۰ درصد) و ٥۰ میکروگرم سیلی‌مارین (۱/٦۹ ± ٥۹/۲۰ درصد) مشاهده شد (P<۰/۰٥) و کمترین تحرک اسپرم در مقدار ۱٥۰ میکروگرم سیلی‌مارین (۱/٦۹±٤۲/۸۰ درصد) و ۲۰۰ میکروگرم سیلی‌مارین (۱/٦۹±٤۰/۸۰ درصد) مشاهده شد (P<۰/۰٥). پس از ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی اسپرم، بیشترین تحرک اسپرم در مقدار ۱۰۰ میکروگرم سیلی‌مارین (۰۰/٦۹±٥۲/۱درصد) و کمترین تحرک اسپرم در مقدار ۲۰۰ میکروگرم سیلی-مارین (٦۰/٦۹±۲۷/۱ درصد) مشاهده شد (P<۰/۰٥).

اثرمتقابل سیلی‌مارین و زمان ذخیره‌سازی بر زنده‌مانی اسپرم خروس معنی‌دار بود (شکل ۲، P<۰/۰٥). در زمان صفر ذخیره‌سازی اسپرم اختلاف معنی‌داری بین مقادیر مختلف سیلی‌مارین مشاهده نشد (P>۰/۰٥). در زمان ۲٤، کمترین زنده‌مانی اسپرم مربوط به مقدار ۲۰۰ میکروگرم سیلی‌مارین (٤٦/۸۹±۷٥/۱ درصد) بود (P<۰/۰٥) و بین دیگر مقادیر سیلی‌مارین اختلاف معنی-

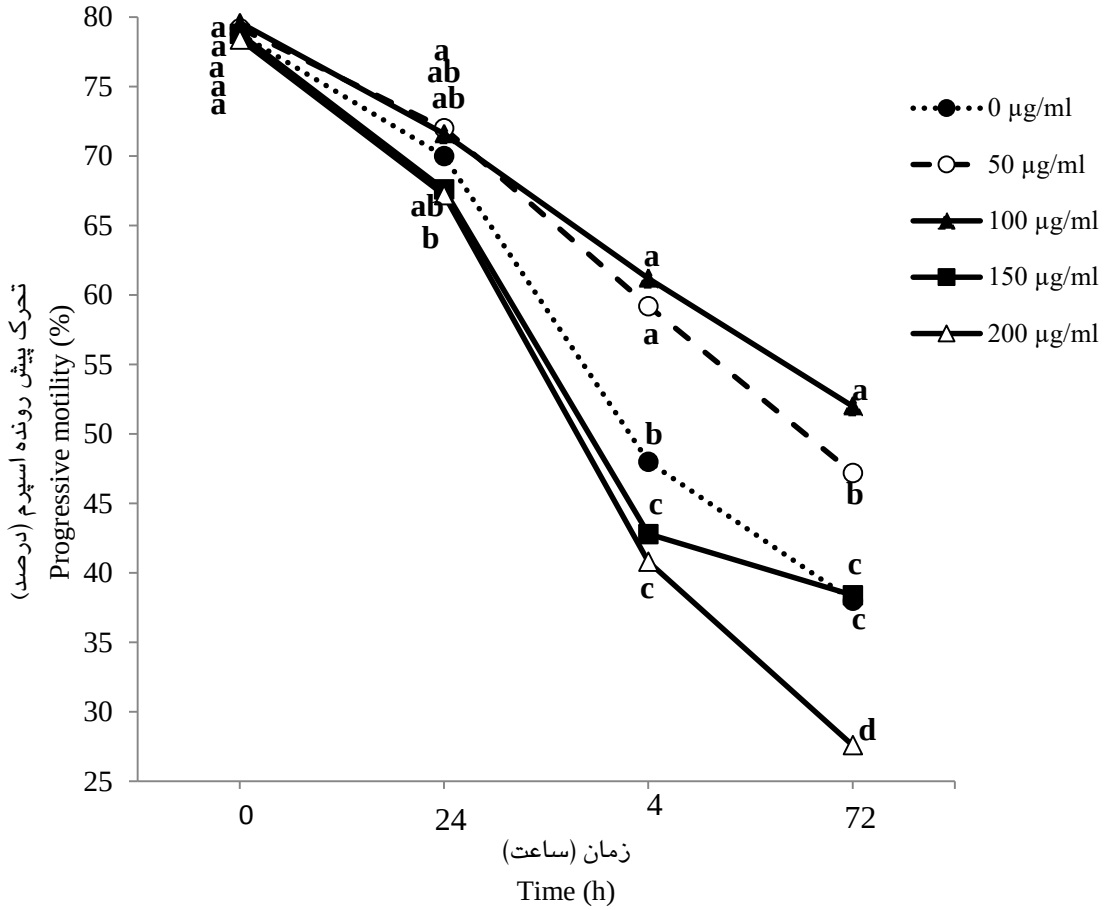
داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در زمان ٤٨، بیشترین زنده‌مانی اسپرم درمقدار ۱۰۰ میکروگرم سیلی‌مارین (۷۱/٥٦±۱/۸۹ درصد) و ٥۰ میکروگرم سیلی‌مارین (۷۱/٥۰±۱/۸۹ درصد) بود و کمترین زنده‌مانی اسپرم در مقدار ۲۰۰ میکروگرم سیلی‌مارین (٥۳/٦٤±۱/۸۹ درصد) مشاهده شد (P<۰/۰٥). پس از ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی، بیشترین زنده‌مانی اسپرم درمقدار ۱۰۰ میکروگرم سیلی‌مارین (٦۲/۱±٤۸/۸۹ درصد) و ٥۰ میکروگرم سیلی‌مارین (٥۹/۱±۹٤/۸۹ درصد) مشاهده شد (P<۰/۰٥). کمترین زنده‌مانی اسپرم درمقدار ۱٥۰ میکروگرم سیلی‌مارین (٤٥/۱±۷٦/۸۹ درصد) و ۲۰۰ میکروگرم سیلی‌مارین (٤۳/۱±٤۲/۸۹ درصد) مشاهده شد (P<۰/۰٥). اثرمتقابل سیلی‌مارین و زمان ذخیره-سازی برسلامت غشای پلاسمایی اسپرم معنی‌دار بود (شکل۳، P<۰/۰٥). درزمان صفر اختلاف معنی‌داری بین مقادیر مختلف سیلی‌مارین مشاهده نشد (P>۰/۰٥).

جدول ۱- اثر مستقل سیلی‌مارین و زمان ذخیره سازی بر درصد تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم

Table 1- Main effect of silymarin and storage time on sperm motility, viability and membrane integrity

عامل تغییر Variable		سلامت غشای پلاسمایی Membrane integrity	زنده‌مانی Viability	تحرک پیش‌رونده Progressive motility
سیلی‌مارین Silymarin (µg/ml)	0	68.6^{b}	71.7^{b}	58.7^{b}
	50	74.3^{a}	75.5^{a}	64.4^{a}
	100	74.3^{a}	76.2^{a}	66.1^{a}
	150	67.7^{b}	68.8^{c}	56.9^{b}
	200	63.3^{c}	65.1^{d}	53.5^{c}
SE		0.57	0.94	0.84
زمان ذخیره سازی Storage time (h)	0	88.4^{a}	88.4^{a}	78.9^{a}
	24	79.3^{b}	80.7^{b}	69.6^{b}
	48	60.5^{c}	64.2^{c}	50.4^{c}
	72	50.3^{d}	52.6^{d}	40.6^{d}
SE		0.51	0.84	0.75

$^{a-d}$Different superscripts indicate significant differences among treatments (P<0.05)

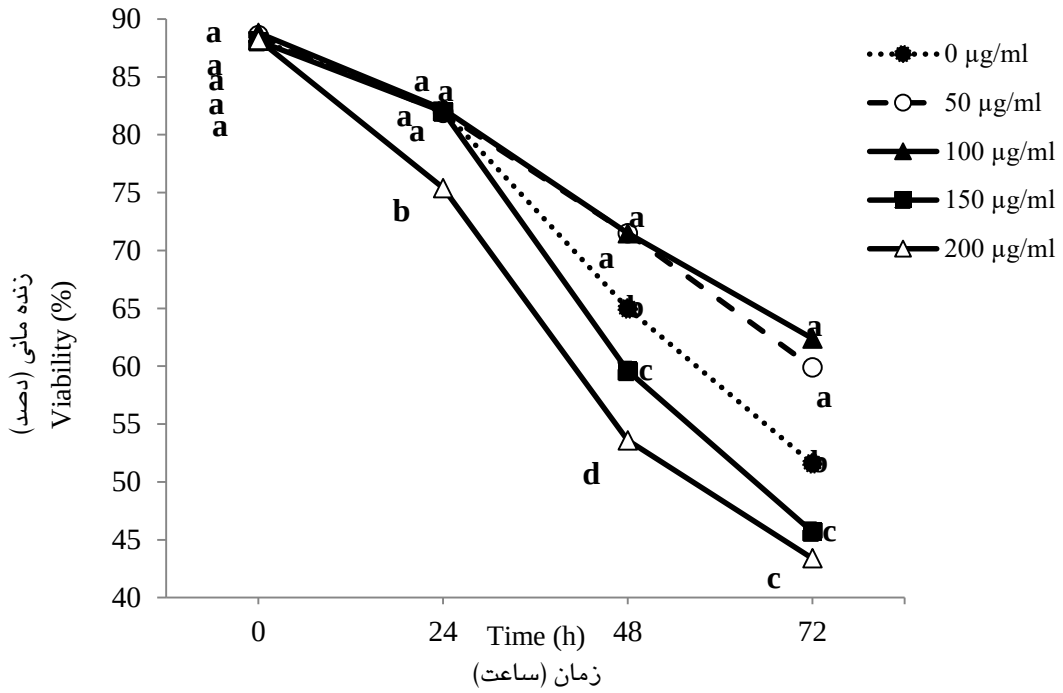


شکل ۱- اثر متقابل سیلی‌مارین و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک پیش‌رونده اسپرم

Figure 1- Interaction effect of silymarin and storage time on sperm progressive motility

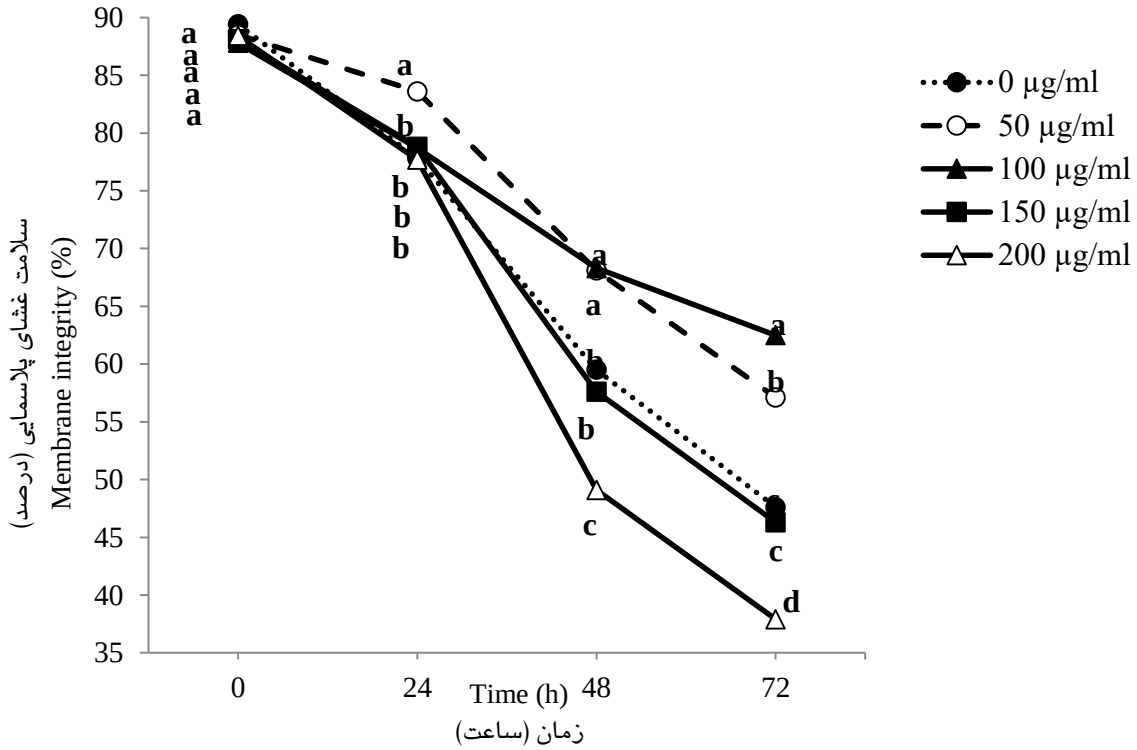
حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

Dissimilar letters show significantly different ($P < 0.05$).



شکل۲- اثر متقابل سیلی‌مارین و زمان ذخیره‌سازی بر زنده‌مانی اسپرم خروس

Figure 2- Interaction effect of silymarin and storage time on sperm viability



شکل۳- اثر متقابل سیلی‌مارین و زمان ذخیره‌سازی بر سلامت غشای پلاسمایی اسپرم

Figure 3- Interaction effect of silymarin and storage time on sperm membrane integrity

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

Dissimilar letters show significantly different ($P < 0.05$).

جدول۲- اثر سیلی‌مارین برپراکسیداسیون چربی اسپرم (اسپرم ۱۰^۶×۳۰۰) پس از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی در دمای ۴°C (Lsmean ± SE)

Table 2- Effect of silymarin on sperm lipid peroxidation after 48 h incubation at 4 ℃ (Lsmean ± SE)

سیلی‌مارین (میکروگرم در میلی-لیتر) silymarin(µg/ml)	MDA۱۰^۹ (میکرومول در ۰/۰۳)× MDA (µm/0.03×10^9)
0	0.85±0.065^b
50	0.87±0.065^b
100	0.59±0.065^c
150	0.90±0.065^b
200	1.12±0.065^a

a-cDifferent superscripts indicate significant differences among treatments (P<0.05)

درزمان ٢٤، بیشترین سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در مقدار ٥٠ میکروگرم سیلی‌مارین (١/١٤±٨٣/٦٢ درصد) مشاهده شد (P<٠/٠٥). بین دیگر مقادیر سیلی-مارین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>٠/٠٥). درزمان ٤٨، بیشترین سلامت غشای پلاسمایی اسپرم مربوط به مقدار ١٠٠ میکروگرم سیلی‌مارین (١/١٤±٦٨/٣٢ درصد) و ٥٠ میکروگرم سیلی‌مارین (١/١٤±٦٨/١٢ درصد) بود (P<٠/٠٥)، کمترین سلامت غشای پلاسمایی اسپرم مربوط به مقدار ٢٠٠ میکروگرم سیلی‌مارین (١٤/١٤±٤٩/١ درصد) بود (P<٠/٠٥). پس از ٧٢ ساعت ذخیره‌سازی اسپرم، بیشترین و کمترین سلامت غشای پلاسمایی اسپرم به ترتیب در مقدار ١٠٠ میکروگرم سیلی‌مارین (٥٠/١٤±٦٢/١) و مقدار ٢٠٠ میکروگرم سیلی‌مارین (٩٤/١٤±٣٧/١ درصد) مشاهد شد (P<٠/٠٥). بیشترین وکمترین میزان تولید MDA مربوط به مقدار ٢٠٠ و ١٠٠ میکروگرم سیلی‌مارین بود (جدول ٢، P<٠/٠٥)، بین دیگر مقادیر سیلی‌مارین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>٠/٠٥).

بحث

نتایج نشان داد مقدار ٥٠ و ١٠٠ میکروگرم سیلی‌مارین در میلی‌لیتر سبب بهبود زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم خروس طی ٤٨ ساعت ذخیره‌سازی در ٤ °C شد. البته پس از ٧٢ ساعت ذخیره‌سازی در ٤ °C بیشترین سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در مقدار ١٠٠ میکروگرم سیلی‌مارین مشاهده شد اگر چه که زنده‌مانی اسپرم در مقادیر ٥٠ و ١٠٠ میکروگرم سیلی-مارین پس از ٧٢ ساعت ذخیره‌سازی تفاوتی را نشان نداد. مشخص شده است که سیلی‌مارین از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب بهبود سلامت غشای سلول‌های شش انسان (پودر و همکاران ٢٠١٢)، افزایش زنده‌مانی سلول‌های کبد موش (باساگا و همکاران ١٩٩٧)، افزایش زنده‌مانی سلول‌های لنفاوی موش (کیم و شارما ٢٠٠٣) و ممانعت از آسیب‌های DNA در سلول‌های لنفوسیت‌های انسان (آندرسون و همکاران ١٩٩٤) می‌شود. به علاوه سیلی‌مارین با افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (موزس و همکاران ١٩٩١) و گلوتاتیون پراکسیداز (آلتورجای و همکاران ١٩٩٢) در گلبول‌های قرمز، آثار آنتی اکسیدانی خود را تشدید می‌کند و سبب افزایش پایداری غشای سلول می‌شود. از طرفی سیلی‌مارین در غلظت ١٠٠ میکرومول سبب افزایش مقاومت اسمزی در سلول‌های کبدی جدا شده از موش در شرایط کاهش فشار اسمزی شده است (راملینی و ملدولسی ١٩٧٦). همچنین، سیلی-مارین به طور معنی داری از لیز شدن (پارگی) سلول-های کبدی موش در حضور تریتون x100 جلوگیری می‌کند (باسیگلیو و همکاران ٢٠٠٩). گزارش شده است که ترکیبات فلاونوئیدی با اثر بر گروه‌های قطبی فسفولیپیدهای غشای سلولی مانع از اکسیداسیون و از هم پاشیدگی غشا می‌شوند (ارلجمان و همکاران ٢٠٠٤). سیلی‌مارین به دلیل ماهیت چربی دوست خود به طور محکم با ترکیبات غشای پلاسمایی متصل می‌شود و بدین ترتیب باافزایش استحکام غشای پلاسمایی، از

شکستگی و از هم‌گسیختگی آن جلوگیری می‌کند (باسیگلیو و همکاران ۲۰۰۹، راملینی و ملدولسی ۱۹۷٤). بنابراین به نظر می‌رسد سیلی‌مارین بواسطه حمایت از ساختار غشای پلاسمایی و کاهش آثار مضر عوامل اکسیدان طی ذخیره‌سازی در ٤ °C سبب بهبود ماندگاری اسپرم خروس می‌شود. نتایج نشان داد بعد از ٤۸ ساعت ذخیره‌سازی در ٤ °C، بیشترین تحرک اسپرم خروس در مقادیر ۵۰ یا ۱۰۰ میکروگرم سیلی-مارین مشاهد شد. البته پس از ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی در ٤ °C بیشترین تحرک اسپرم در مقدار ۱۰۰ میکروگرم سیلی‌مارین مشاهده شد. گزارش شده است که افزودن سایر آنتی‌اکسیدان‌ها مانند ویتامین E به منی رقیق شده خروس (نورانی و همکاران ۱۳۸٦، طباطبایی و همکاران ۲۰۱۱)، بوقلمون (دانگو و دانگو ۱۹۹۷)، خوک (براینینگر و همکاران ۲۰۰۵) سبب بهبود تحرک اسپرم طی ذخیره سازی شده است. همچنین افزودن آنتی اکسیدان‌های با منشا گیاهی مانند کاتچین به منی بز سبب بهبود تحرک اسپرم طی ذخیره سازی در ۵ درجه سانتیگراد شده است (پاردی و همکاران ۲۰۰٤). مشخص شده است که بهبود فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در نتیجه افزودن لیکوپن به جیره موش‌هایی که در شرایط تنش اکسیداتیو قرار داشتند، سبب افزایش تحرک اسپرم می‌شود (تارک و همکاران ۲۰۰۷). از طرفی مشخص شده است که سیلی‌مارین ماده آنتی اکسیدان قوی بوده (بورساری و همکاران ۲۰۰۱) و افزودن ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سیلی‌مارین به محیط کشت سلول‌های ماکروفاژ موش و ذخیره-سازی این سلول‌ها به مدت ۲٤ ساعت سبب مهار بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز و تولید اکسید نیتروژن (NO) می‌شود (کانگ و همکاران ۲۰۰۲). اگرچه غلظت-های کم NO سبب افزایش ظرفیت‌پذیری اسپرم می‌شود (زینی و همکاران ۱۹۹۵)، اما افزایش مقدار آن سبب کاهش تحرک اسپرم خواهد شد (بالرسیا و همکاران ۲۰۰٤). افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون چربی‌ها سبب اختلال در غشای میتوکندری، کاهش میزان ATP و آسیب آکسونم اسپرم می‌شود که در نهایت باعث کاهش حرکت پیش‌رونده اسپرم خواهد شد (آرمسترونگ و همکاران ۱۹۹۹، بلسبوییس و همکاران ۱۹۹۹، لونگ و کرامر ۲۰۰۳، سانوکا و کارپیزس ۲۰۰٤، سرولینی و همکاران ۲۰۰٦). بنابراین، سیلی‌مارین احتمالا از طریق کاهش آثار سمی گونه‌های فعال اکسیژن سبب بهبود تحرک اسپرم خروس طی ذخیره‌سازی در دمای ٤ °C می‌شود. در پژوهش حاضر سیلی‌مارین در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و پس از ٤۸ ساعت، سبب کاهش میزان تولید MDA در منی خروس شد. گزارش شده است که سیلی‌مارین سبب کاهش تولید MDA در سلول‌های کبد موش (پیترانگلو و همکاران ۱۹۹۵)، ریه انسان و موش (باساگا و همکاران ۱۹۹۷)، اپیتلیوم کلون موش (کراز و همکاران ۲۰۰۱)، گلبول‌های قرمز انسان (کیروسیگا و همکاران ۲۰۰۷)، پانکراس موش(سوتو و همکاران ۲۰۰۳) سلول‌های تک هسته‌ای خون انسان (کیروسیکا و همکاران ۲۰۱۰) و ماکروفاژهای موش (کانگ و همکاران ۲۰۰۲) می‌شود. مشخص شده است که طی ذخیره-سازی اسپرم در شرایط برون‌تنی، واکنش‌های پراکسیداسیونی به دلیل تولید گونه‌های فعال اکسیژن نظیر سوپر اکسید و هیدروکسیل و ترکیبات بیولوژیکی غیر رادیکالی نظیر پراکسید هیدروژن و اسید هیپوکلریک توسط اسپرم‌های مرده در حضور اکسیژن محیط، تشدیدمی‌شوند (بوکاک و همکاران ۲۰۰۹). بعلاوه، افزایش غلظت MDA در منی خروس همبستگی بالایی باکاهش زنده‌مانی و ناباروری اسپرم دارد (فوجیهارا و کوگا ۱۹۸٤). بنابراین افزودن ۱۰۰ میکرو گرم سیلی‌مارین به منی رقیق شده خروس در روند ذخیره سازی احتمالا با ممانعت از پراکسیداسیون چربی سبب حفظ کیفیت اسپرم می شود.

در مطالعه حاضر مقادیر بیشتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سیلی‌مارین سبب کاهش تحرک، زنده مانی و

سلامت غشای پلاسمایی اسپرم شد. علاوه بر این پراکسیداسیون چربی‌های اسپرم در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیترسیلی‌مارین افزایش یافت. گزارش شده است که ۸۰ میکروگرم سیلی‌مارین در میلی لیتر بعد از ۱۲ ساعت هیچ گونه اثری بر زنده‌مانی سلول‌های اپیدرمی و فیبروبلاست موش ندارد ولی بعد ٤۸ ساعت از طریق افزایش بیان پروتئین‌های القا کننده آپوپتوز و آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری سبب القای آپوپتوز و کاهش زنده‌مانی می‌شود (کاتییر و همکاران ۲۰۰۵). همچنین، مشخص شده است که سیلی‌مارین در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای مدت ۲٤ ساعت سبب افزایش زنده‌مانی سلول‌های شش انسان شد ولی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای مدت ٤۸ و ۷۲ ساعت سبب کاهش زنده‌مانی این سلول‌ها شد (پودر و همکاران ۲۰۱۲). به علاوه، سیلی-مارین در غلظت ۱٦۰ میکروگرم در میلی لیتر سبب کاهش معنی‌داری در زنده‌مانی سلول‌های لنفوسیت‌های T خون انسان پس از ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی شد (قراگوزلو و امیر قفران ۲۰۰۷). بیان شده است که عملکرد بهینه آنتی‌آکسیدان‌ها در غلظت‌های معینی به وقوع می‌پیوندد، به طوریکه با افزایش غلظت، عملکرد آن‌ها معکوس شده و سبب القای اکسیداسیون می‌شوند (سااو و کاتلر ۱۹۹۳). این موضوع در مورد سایر آنتی اکسیدان‌ها با منشا گیاهی مانند عصاره چای سبز (چانگ و همکاران ۲۰۰۱) و کوئرسیتین (روباسکیویسز و همکاران ۲۰۰۷) نیز به اثبات رسیده است. بنابر این به نظر می‌رسد که غلظت ۲۰۰ میکرو مول سیلی‌مارین آثار مخربی بر اسپرم خروس در روند ذخیره سازی در ٤ درجه سانتیگراد دارد.

نتیجه‌گیری کلی

افزودن میزان ۱۰۰میکرومول سیلی‌مارین به منی رقیق شده خروس سبب کاهش پراکسیداسیون چربی و همچنین حفظ ساختار و عملکرد اسپرم طی روند ذخیره سازی در ٤ درجه سانتیگراد می‌شود.

سپاسگزاری

از شرکت نوید مرغ گیلان بابت حمایت‌های مالی قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

احمدی ح و ضمیری م ج، ۱۳۸٦. اثر ویتامین‌های E و C بر توان جنبایی و باروری اسپرم رقیق‌شده‌ی خروس‌های بومی فارس در دمای ٤ تا ٥ درجه‌ی سانتی‌گراد. مجموعه مقالات دومین کنگره علوم دامی و آبزیان کشور. ص، ۱٤۷۹-۱٤۷۷.

ضمیری م ج. ۱۳۸۰. تولیدمثل در پرندگان اهلی (ترجمه). انتشارات دانشگاه شیراز. ۲٤٤ صفحه.

نورانی ب، ضمیری م ج و روغنی الف، ۱۳۸٦. اثر پیرووات، هیدروکسی تولوئن بوتیله‌شده (BHT) و سدیم پیروات بر اسپر رقیق-شده‌ی خروس‌های بومی فارس نگهداری شده در دمای ٤-٥ درجه سانتی‌گراد. مجموعه مقاله‌های دومین کنگره علوم دامی و آبزیان. موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج. ص: ۱٥۳۹-۱٥٤۲.

Altorjay I, Dalmi L, Sari B, Imre S and Balla G, 1992.The effect of silibinin (Legalon) on the the free radical scavenger mechanisms of human erythrocytes in vitro. Acta Physiol Hung 80: 375-380.

Anderson D, Yu TW, Phillps BJ and Schmwzer P, 1994.The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygenradical- generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. Mutat Res 307: 261-271.

Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ and Sikka SC, 1999. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. Free Radic Biol Med 26: 869-880.

Balercia G, Moretti S, Vignini A, Magagnini M, Mantero F, Boscaro M, Lamonica GR and Mazzanti L, 2004. Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. J Androl 25:245-249.

Basaga H, Poli G, Tekkaya C and Aras I, 1997. Free radical scavenging and antioxidative properties of 'silibin' complexes on microsomal lipid peroxidation. Cell Biochem Funct 15: 27-33.

Basiglio CL, Pozzi EJS, Mottino AD and Roma MG, 2009. Differential effects of silymarin and its active component silybinin on plasma membrane stability and hepatocellular lysis. Chem Biol Interact 179: 297-303.

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

Blesbois E, Grasseau I and Blum JC, 1993.Effect of vitamin E on fowl semen storage at 4 ºC. Theriogenology 39: 771-779.

Blesbois E, Grasseau I and Hermier D, 1999.Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2-5 ˚C. Theriogenology 52: 325-334.

Borsari M, Gabbi C, Ghelfi F, Grandi R, Saladini M, Severi S and Borella F, 2001. Silybin, a new iron-chelating agent. J Inorg Biochem 85: 123-129.

Breininger E, Beorlegui NB, Oflaherty CM and Beconi MT, 2005. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. Theriogenology 63: 2126-2135.

Breque C, Surai P and Brillard JP, 2003. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. Mol Reprod Dev 66: 314-323.

Bucak MN, Sariozkan S, Tuncer PB, Ulutas PK and Akcadage HI, 2009. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in angora goat semen following cryopreservation. Small Ruminant Res 81: 90-95.

Burrows WH and Quinn JP, 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poult Sci 14: 251-254.

Cao G and Cutler RG, 1993. High concentrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. Arch Gerontol Geriatr 17: 189-201.

Cerolini S, Zainiboni L, Maldjian A and Gliozzi T, 2006.Effect of docosahexaenoic acid and α-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. Theriogenology 66: 877-886.

Chung LY, Cheung TC, Kong SK, Fung KP, Choy YM, Chan ZH and Kwok TT, 2001. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. Life Sci 68: 1207-1214.

Cruz T, Galvez J, Crespo E, Ocete MA and Zarzuelo A, 2001. Effects of silymarin on the acute stage of the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. Planta Med 67: 94-96.

Donoghue AM and Donoghue DJ, 1997.Effect of water and lipid soluble antioxidants on turkeysperm viability, membrane integrity and motility during liquid storage. Poult Sci 76: 1440-1445.

Erlejman AG, Verstraeten SV, Fraga CG and Oteiza PI, 2004. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. Free Radic Res 38: 1311-1320.

Fujihara N and Koga O, 1984. Prevention of the production of lipid peroxide in rooster spermatozoa. Anim Reprod Sci 7: 385-390.

Gharagozloo M and Amirghofran Z, 2007. Effects of silymarin on the spontaneous proliferation and cell cycle of human peripheral blood leukemia T cells. J Cancer Res Clin Oncol 133: 525-532.

Kang JS, Jeon YJ, Kim HM, Han SH and Yang KH, 2002. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by Silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. J Pharmacol Exp Ther. 302:138-144.

Katiyar SK, Roy AM and Baliga MS, 2005. Silymarin induces apoptosis primarily through a p53-dependent pathway involving Bcl-2/Bax, cytochrome crelease, and caspase activation. Mol Cancer Ther 4: 207-216.

Kim SH and Sharma RP 2003. Cytotoxicity of inorganic mercury in murine T and B lymphoma cell lines: involvement of reactive oxygen species, Ca (2+) homeostasis, and cytokine gene expression. Toxicol In Vitro 17: 385-395.

Kiruthiga PV, Pandian SK and Devi KP, 2010. Silymarin protects PBMC against B(a)P induced toxicity by replenishing redox status and modulating glutathione metabolizing enzymes—An in vitro study. Toxicol Appl Pharmacol 247: 116-128.

Kiruthiga PV, Shafreen RB, Pandian SK, Arun S, Govindu S and Devi KP, 2007. Protective effect of silymarin on erythrocyte haemolysate against benzo(a)pyrene and exogenous reactive oxygen species (H2O2) induced oxidative stress. Chemosphere 68: 1511-1518.

Kodama H, Kuribayashi Y and Gagnon C, 1996.Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. J Androl 17: 151-157.

Kumaresan A, Kadirvel G, Bujarbaruah KM, Bardoloi RK, Das A, Kumar Sand Naskar S, 2009. Preservation of boar semen at 18 ^{o}c induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. Anim Reprod Scie 110: 162-171.

Kvasnicka F, BibaB, SevcikR, Voldrich M, KratkaJ, 2003. Analysis of the active components of Silymarin. J Chromatogr A 990: 239-245.

Lee DYW and Liu Y, 2003. Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A,and isosilybin B, isolated from Silybum marianum (milk thistle). J Nat Prod 66: 1171-1174.

Leeuw AM, Daas GHJ and Woelders H, 1991. The fix vital stain method simultaneous determination of viability and acrosomal and status of bovine spermatozoa. J Androl 12: 112-118.

Locher R, Suter PM, Weyhenmeyer R and Vetter W, 1998. Inhibitory action of silibinin on low density lipoprotein oxidation. Arzneimittelforschung 48:236-239.

Long JA and Kramer M, 2003.Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. Poult Sci 82:1802-1807.

Moce E, Grasseau I and Blesbois E, 2010. Cryoprotectant and freezing process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. Anim Reprod Sci 122: 359-366.

Moreno JS, Castaño C, Coloma MA, Brunet AG, Díaz AT, Sebastián AL and Campo JL, 2009.Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. Poult Sci 88: 2661-2669.

Muzes G, Deak G, Lang I, Nekam K, Gergely P and Feher J, 1991. Effect of the bioflavonoid Silymarin on the in vitro activity and expression of superoxide dismutase (SOD) enzyme. Acta Physiol Hung 78: 3-9.

Pietrangelo A, Borella F, Casalgrandi G, Montosi G, Ceccarelli D, Gallesi D, Giovannini F, Gasparetto A and Masini A, 1995. Antioxidant activity of silybin in vivo during longterm iron overload in rats. Gastroenterology 109: 1941-1949.

Podder B, Kim YS, Zerin T and Song HY, 2012. Antioxidant effect of silymarin on paraquat-induced human lung adenocarcinoma A549 cell line. Food Chem Toxicol 50: 3206-3214.

Purdy PH, Ericsson SA, Dodsona RE, Sternes KL and Garner DL, 2004. Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. Small Ruminant Res 55: 239-243.

Radko L and CybulskiW, 2007. Application of silymarin in human and animal medicine. J P C C R 1: 22-26.

Ramellini G and Meldolesi J, 1974. Stabilization of isolated rat liver plasma membranes by treatment *in vitro* with silymarin. Arzneimittelforschung 24: 806-808

Ramellini G and Meldolesi J, 1976. Liver protection by silymarin: in vitro effect on dissociated rat hepatocytes. Arzneimittelforschung 26: 69-73.

Robaszkiewicz A, Balcerczyk A and Bartosz G, 2007. Antioxidative and prooxidative effect of quercetin on A549 cell. Cell Bio Int 31: 1245-1250.

Sanocka D and Kurpisz M, 2004.Reactive oxygen species and sperm cells. Reproductive Biology and Endocrinology 2: 1-7.

Soto C, Recoba R, Barron H, Alvarez C and Favari L, 2003. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 136: 205-212.

Tabatabaei S, 2012. Effect of ascorbic acid on chicken semen quality during liquid storage. Comp Cl Path 21: 621-626.

Tabatabaei S, Batavani R and Ayen E, 2011.Effects of vitamin E addition to chicken semen on sperm quality during in vitro storage of semen. Vet Res Forum 2: 103-111.

Turk G, Atessahin A, Sonmez M, Yuce A and Osman A, 2007. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. Theriogenology 67: 778-785.

Verma A and Kanwark KC, 1999.Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. Asian J Androl 1: 151-154.

Zini A, Lamirande ED and Gagnon C, 1995. Low levels of nitric oxide promote sperm capacitation in vitro. J Androl 16:424-431.

Effect of silymarin on rooster semen during storage at 4 °C

H Ziaeirad[1], M Roostaei-Ali Mehr[2*] and M Mohammadi[2]

Received: April 30, 2014 Accepted: June 07, 2015

[1]MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[2]Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[*]Corresponding author: E-mail: roostaei@guilan.ac.ir

Abstract

BACKGROUND: Silymarin is a polyphenol, which has scavenging ability of reactive oxygen species, and it can improve spermatozoa storage. **OBJECTIVES:** Experiment was conducted to evaluate the effect of silymarin on rooster sperm storage at 4 °C. **METHODS**: Semen collection was performed twice a week in 5 times by using 15 mature roosters. In each session, ejaculates were pooled and split into five parts. The amount of 0 (S_0), 50 (S_{50}), 100 (S_{100}), 150 (S_{150}) and 200 (S_{200}) µg/mL silymarin were added to each part. After that, samples were chilled to 4 ^{O}C and kept until 72 h. Sperm viability (by staining Hoechst 33258), motility and functional membrane integrity were evaluated at 0, 24, 48 and 72 h. To assay lipid peroxidation, the concentration of malondialdehyde (MDA) was determined by 300×10^6 spermatozoa at 48 h. **RESULTS**: There was interaction between silymarin and storage time on sperm motility, viability and functional membrane integrity ($P<0.05$). At 48 and 72 h, the highest of sperm motility (59.20% or 61.20% and 52.00%, respectively), and functional membrane integrity (68.12% or 68.32% and 62.50%, respectively) were observed by S_{50} or S_{100} and S_{100}, respectively ($P<0.05$). The highest of sperm viability was observed by S_{50} (71/50% and 59/94% respectively) and S_{100} (71/56% and 62/48% respectively) at 48 and 72 h, respectively ($P<0.05$). The concentration of MDA was highest (1.12 µM/mL) and lowest (0.59 µM/mL) in S_{200} and S_{100}, respectively ($P<0.05$). **CONCLUSIONS**: The addition of 100 µg/mL silymarin to semen improves longevity of rooster spermatozoa at 4°C.

Key word: Chicken spermatozoa, Flavonoid, Antioxidant, Silymarin