تاثیرغلظت‌های مختلف عصاره اتری بره موم، بر ویژگی‌های اسپرم قوچ زل

چکیده:

پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره اتری بره موم، بر ویژگی‌های اسپرم قوچ زل انجام شد. پژوهش در قالب طرح کامل تصادفی با تیمارهای آزمایشی شامل، غلظت‌های مختلف عصاره اتری: (۰/۲۵، ۰/۵ ، ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و رقیق کننده بدون عصاره به عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. عصاره اتری در محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO[1]) حل و به رقیق کننده اضافه شد. به همین دلیل اثر DMSO نیز به عنوان شاهد بررسی شد. ارزیابی فراسنجه‌های کمی اسپرم پس از یخ‌گشایی و همچنین در حالت مایع برای زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از نگهداری در دمای یخچال انجام شدند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره اتری تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشتند (p <۰/۰۵). نتایج نشان دادند که در حالت مایع، تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمای اسپرم و پس از یخ‌گشایی، تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر جنبایی، زنده‌مانی و غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی، اثر افزایشی معنی‌داری (p <۰/۰۵) نسبت به سایر تیمارها داشتند. همچنین تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هم در حالت مایع و هم پس از یخ‌گشایی ، اثر معنی داری (p <۰/۰۵) بر ریخت‌شناسی و افزایش فعالیت میتوکندری اسپرم داشتند. بنابراین پژوهش حاضر نشان داد، افزودن غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره اتری منجربه افزایش کیفیت اسپرم (جنبایی، زنده-مانی، ریخت‌شناسی، یکپارچگی غشای پلاسما، فعالیت میتوکندری و غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی) در حالت مایع و پس از یخ‌گشایی شد.

واژه‌های کلیدی: *عصاره اتری، بره موم، انجماد، اسپرم قوچ*

Effect of different concentrations of ether extract of propolis on the sperm characteristics of Zel ram

Abstract

In the present study, the effect of ether extract of propolis on the semen characteristics of Zel's ram under short and long-term preservation was investigated. The experimental groups comprised different concentrations of ether extract (0, 0.25, 0.5, and 1 mg/mL) and dimethyl sulfoxide (DMSO). The samples were evaluated at 0, 24, 48, and 72 hours after storage at 4 °C and following the freeze-thawing process. During the cold storage, sperm quality traits motility, viability, membrane integrity, mitochondrial activity, malondialdehyde concentration (MDA), and morphology increased significantly (P<0.05) at concentrations of 0.25 and 0.5 mg/mL ether extract in comparison with the control group. Our results revealed that the total motility, viability, and membrane integrity in the concentration of 0.5 mg/mL ether extract were higher than the control group (P<0.05) at 4 °C. Also, motility, viability and malondialdehyde concentration (MDA) were higher in concentrations of 0.25 mg/mL ether extract than in the control group in the freeze-thawing process. Mitochondrial activity and morphology of spermatozoid at 0.25 and 0.5 mg/mL ether extract were higher than the control group (P<0.05) in storage at 4 °C and freeze-thawing process. Results showed adding ether extract at the concentrations of 0.25 and 0.5 mg/mL to the semen extender improved the quality of spermatozoid in the Zel breed sheep.

KEYWORDS: *Ether extract, Propolis, Cryopreservation, Ram sperm*

[1]. Dimethyl sulfoxide

مقدمه

در سراسر جهان، تقاضای رو به رشد برای دسترسی به غذا و نیاز به پروتئین حیوانی به عنوان یک مشکل، منجر شده تا کشاورزان در اصلاح و مدیریت دام، کارآمد باشند. برای دسترسی به این اهداف، توسعه فناوری‌های جدید برای تولیدمثل گونه‌های مختلف دام و بهبود تولید محصولات حیوانی، مورد نیاز است (Davis & White, 2020). تلقیح مصنوعی با اسپرم مایع و منجمد یک تکنیک کمک باروری ضروری در همه گونه‌های پستانداران است و موجب افزایش بازده تولیدمثلی و تامین پروتئین حیوانی می‌شود (Iv´an Y´anez-Ortiz *et al*., 2022). در واقع، انجماد اسپرم امکان ذخیره‌سازی طولانی مدت، پراکندگی ژن حیوانات برتر ژنتیکی از نسلی به نسل دیگر و انتقال مایع منی برای مدت طولانی و به دورترین مکان‌ها را فراهم می‌کند (Veerkamp & Beerda, 2007). با این حال، مشکلات زیادی در رابطه با انجماد وجود دارد زیرا اسپرم‌ها به تغییرات دما بسیار حساس هستند و پس از یخ‌گشایی، زنده ماندن آنها به خطر می‌افتد که در نهایت باعث کاهش باروری اسپرم می‌شود (Nijs *et al*., 2009). این امر منجربه پژوهش در مورد کیفیت اسپرم پس از یخ‌گشایی (به عنوان مثال تحرک، زنده مانی، یکپارچگی غشای پلاسما، آکروزوم و DNA و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[1] و...) شده است (Baghshahi *et al* 2014). تنش اکسیداتیو و تولید بیش از حد ROS منجربه آسیب‌های برگشت ناپذیر DNA و پروتئین‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش آپاپتوزیس و کاهش کیفیت و باروری اسپرم خواهد شد (Chatterjee *et al*., 2001). به منظور ویژگی‌های اسپرم مایع، منجمد، جلوگیری از تنش اکسیداتیو و حذف رادیکال‌های آزاد فعال، از آنتی اکسیدان‌ها در محیط‌های اسپرم مایع و منجمد استفاده می‌شود (Malo *et al*., 2010). از آنجایی که آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی می‌توانند عوارض جانبی داشته باشند، امروزه بیشتر از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی استفاده می‌شود (Lin *et al*., 2011). بره موم از منابع گیاهی توسط زنبورهای عسل جمع‌آوری می‌شود و مهم‌ترین اجزای آن اسیدهای فنولی، فلاوونوئیدها، مواد موم-چربی و بسیاری اجزای دیگر مانند ویتامین‌ها، پروتئین‌ها، آمینواسیدها و قندها هستند. بره موم دارای خاصیت درمانی (بیولوژیکی/دارویی) مانند خاصیت ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، تعدیل‌کننده ایمنی، ضد تومور، ضد سرطان، ضد زخم، محافظت از کبد و محافظت از قلب است (Farooqui & A. Farooqui., 2010). چربی‌های موجود در غشاء اسپرم با تحرک و زنده‌مانی اسپرم پس از یخ‌گشایی ارتباط مستقیم دارند. چربی‌ها، تنش اکسیداتیو و تولید ROS، فرآیندهای التهابی را تعدیل می‌کنند و به عنوان یک جزء از غشاء، نقش مهمی در نفوذپذیری غشاء دارند به‌طوری که نفوذپذیری وکشش غشاء را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند (Collodel *et al*., 2020). افزودن چربی‌ها به محیط رقیق‌کننده، انجمادپذیری، قدرت باروری و تحرک اسپرم قوچ در شرایط برون‌تنی را بهبود می‌بخشد (Badr *et al*., 2004). بنابراین باتوجه به اینکه افزایش اکسیدان‌ها و کاهش تحرک اسپرم از عوامل اصلی ناباروری هستند و افزودن ترکیبات بره موم در محیط‌های اسپرم مایع و منجمد، می‌تواند از اسپرم در برابر آسیب‌های یخ‌گشایی محافظت کرده و منجربه افزایش زنده‌مانی و تحرک اسپرم می‌شوند. همچنین از آنجایی که یک جنبه مهم از تلقیح مصنوعی با اسپرم مایع و منجمد، مربوط به فرآیندهایی است که در طول لقاح و رشد جنین قبل از لانه‌گزینی رخ می‌دهد (Iv´an Y´anez-Ortiz *et al*., 2022). درنتیجه، اسپرم باکیفیت لازمه‌ی موفقیت در لقاح، تشکیل جنینی با کیفیت و افزایش تولیدمثل و باروری است و گامی مهم در جهت استفاده بهینه از تلقیح مصنوعی، از این رو این پژوهش به بررسی تاثیر افزودن عصاره اتری بره موم به محیط‌های رقیق کننده اسپرم مایع و منجمد می پردازد.

هدف از این پژوهش، تاثیر عصاره اتری بره موم بر ویژگی‌های اسپرم مایع قوچ زل (در دمای ۴ درجه سانتی گراد) و تاثیر عصاره اتری بره موم بر ویژگی‌های اسپرم منجمد قوچ زل (در ازت مایع) است.

[1]. Reactive Oxygen Species

پیشینه پژوهش

چربی‌ها، تنش اکسیداتیو و تولید ROS، فرآیندهای التهابی را تعدیل می‌کنند و به عنوان یک جزء از غشاء، نقش مهمی در نفوذپذیری غشاء دارند به‌طوری که نفوذپذیری وکشش غشاء را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند. ترکیبات گلیکولیپیدی در غشاء با جذب و مصرف اسیدهای چرب از رقیق کننده موجب افزایش سیالیت غشاء می‌شوند. همچنین منجربه افزایش انعطاف‌پذیری دم اسپرم که لازمه تحرک اسپرم است، می‌شوند. همچنین نشان داده شده است که یکی از دلایل کاهش زنده‌مانی اسپرم به دنبال ذخیره مایع منی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است که از متابولیسم اکسیژن (O2) تولید می‌شوند. اسپرم پستانداران، یک سلول فعال است که به طور خود به خود ROS تولید می‌کند. ROS بیش از حد که در طول ذخیره مایع منی تولید می‌شود، واکنش‌های اکسیداتیو را آغاز می‌کند که در نهایت منجر به مرگ سلول‌های اسپرم می‌شود (Collodel *et al*., 2020). افزودن اسید اولئیک می‌تواند تحرک اسپرم قوچ، درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ، درصد اسپرم با غشای پلاسمایی سالم، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را در شرایط ذخیره‌سازی مایع، افزایش دهد (Badr *et al*., 2004). غشای پلاسمایی اسپرم از اندامک‌ها در برابر آسیب‌های مکانیکی محافظت می‌کند و به عنوان فیلتری برای تبادل مواد درون و برون سلولی عمل می‌کند. یکپارچگی غشای پلاسمایی برای اسپرم بسیار مهم است زیرا بر متابولیسم مرتبط با تحرک و زنده‌مانی اسپرم تأثیر می‌گذارد (Yousif *et al*., 2024). اسید اولئیک و اسید پالمیتیک با تقویت بتا اکسیداسیون در میتوکندری برای تولید ATP، منجربه افزایش تحرک، ریخت شناسی، یکپارچگی غشاء، یکپارچگی آکروزوم، فعالیت میتوکندری و کیفیت اسپرم گراز در طول ذخیره‌سازی مایع می‌شود در حالی که آپاپتوزیس را کاهش می‌دهد (Zhu *et al*., 2020). چربی‌ها بخش عمده سلول‌های جانوری را در بر می‌گیرند و در اسپرم نه تنها منبع انرژی محسوب می‌شوند بلکه در تمام مراحلی که منجر به باروری می‌شوند مانند تحرک، قابلیت زنده‌مانی و بلوغ نیز دخالت دارند که ساختارهای فیزیولوژیکی غشاء دولایه را حفظ نموده، همچنین از دست دادن انرژی را کاهش داده و میتوکندری را برای استفاده انرژی در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند واکنش آکروزوم و ظرفیت پذیری حمایت می‌کند (*et al*., Aksoyet 2006). چربی‌های موجود در غشاء اسپرم با تحرک و زنده‌مانی اسپرم پس از یخ‌گشایی ارتباط مستقیم دارند. اسیدهای چرب غیراشباع در غشای سلول اسپرماتوزوئید موجب افزایش انعطاف‌پذیری دم اسپرماتوزوئید شده و از پارگی غشاء و مرگ سلولی در اثر تشکیل بلورهای یخ جلوگیری می‌کند. افزودن چربی‌ها به محیط رقیق‌کننده، انجمادپذیری، قدرت باروری و تحرک اسپرم قوچ در شرایط برون‌تنی را بهبود می‌بخشد (Badr *et al*., 2004). توانایی لقاح برای ارزیابی دقیق کیفیت مایع منی استفاده می‌شود و بهترین فراسنجه برای ارزیابی کیفیت منی منجمد در نظر گرفته می‌شود (Vale *et al*., 1998). افزایش نرخ آبستنی رابطه مستقیمی با بهتر شدن ویژگی‌های اسپرم مانند تحرک، یکپارچگی غشاء، زنده‌مانی اسپرم، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیمی محیط اسپرم پس از یخ‌گشایی منی گاو دارد. اسید اولئیک منجربه کاهش غلظت مالون دی آلدئید اسپرم قوچ، افزایش سطح ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و در نهایت افزایش کیفیت اسپرم قوچ در نگهداری مایع در دمای پایین می‌شود (Hashem *et al*., 2017).

روش شناسی پژوهش

این پژوهش از مهر تا اواخر اسفند ۱۴۰۲ در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده علوم دامی و شیلات و مزرعه پژوهشی گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام و تاثیر عصاره اتری بره موم، بر ویژگی‌های اسپرم قوچ زل بررسی شد. تیمارهای آزمایشی شامل، غلظت‌های مختلف عصاره اتری: (۰/۲۵، ۰/۵ ، ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) (Komarek *et al*., 1964) و رقیق کننده بدون عصاره به عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. عصاره اتری در محلول دی متیل سولفوکساید[1] (DMSO) حل و به رقیق کننده

[1]. Dimethyl sulfoxide

اضافه شد. به همین دلیل اثر DMSO نیز به عنوان گروه شاهد بررسی شد.

نمونه گیری، فرآوری منی مایع

به‌منظور انجام این آزمایش ۴ رأس قوچ نژاد زل (۲ الی ۳ ساله با میانگین وزن ۲ ± ۴۵ کیلوگرم) برای منی‌گیری به کمک واژن مصنوعی استفاده شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده بلافاصله با فلاسک آب ۳۷ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه منتقل و در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ارزیابی اولیه، نمونه‌های با جنبایی بیش از ۷۰ درصد و حجم بیش از۰/۵میلی لیتر، را با یکدیگر مخلوط شدند تا اثرات فردی هر دام از بین رود. رقیق‌سازی نمونه‌ها به نسبت ۱ حجم منی و ۲۰ حجم رقیق کننده انجام و ارزیابی فراسنجه‌های کمی اسپرم برای زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت انجام شدند (Linford *et al*., 1976).

رقیق‌سازی، فرآیند یخ‌گشایی منی

منی مخلوط شده با رقیق‌کننده بر پایه تریس – زرده تخم مرغ، رقیق‌سازی شد (Vahedi., 2020). منی رقیق شده به داخل پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتر کشیده و برای مدت ۵ ساعت در دمای۴ درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به دمای تعادل قرار گرفت. سپس پایوت‌ها بلافاصله در فاصله ۷ سانتی‌متری بخار نیتروژن مایع به مدت ۱۲ دقیقه قرار گرفت تا منجمد شوند و به داخل نیتروژن مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور و تا زمان ذوب در این دما نگهداری شدند. بعد از ده روز ذخیره‌سازی، پایوت‌ها در حمام آب گرم ۳۷ درجه به مدت ۳۰ ثانیه ذوب شدند. منی مخلوط شده با رقیق‌کننده بر پایه تریس – زرده تخم مرغ، رقیق و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره و ارزیابی فراسنجه‌های کمی اسپرم پیش و پس از انجماد انجام شد. pH رقیق‌کننده پایه روی ۷ تنظیم، سپس درون بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در همان روز مورد استفاده قرار گرفت (Vahedi., 2020).

(جدول ۱): اجزای رقیق کننده ی پایه (Vahedi., 2020).

مواد	مقدار
زرده تخم‌مرغ	۲۰درصد
اسید سیتریک	۱/۴گرم
تریس	۲/۷۰گرم
فروکتور	۱گرم
گلیسرول	۶/۵درصد
آب دوبار تقطیر	۱۰۰ میلی‌لیتر

روش جداسازی عصاره اتری از بره موم

مقدار ۵۰ گرم بره موم در ۲۰۰ سی‌سی دی اتیل اتر به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر حل شد. بعد از ۴۸ ساعت کل محلول را از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس این مایع زیر گاز نیتروژن برده تا تمام دی اتیل اتر بخار شد و عصاره به دیواره فالکون بچسبد. نمونه باقی مانده را با فریز درایر خشک شد (Momennejad., 2019).

ارزیابی تحرک (جنبایی) اسپرماتوزوئید

به منظور بررسی ویژگی‌های تحرک اسپرماتوزوئید پس از یخ‌گشایی در گروه‌های مختلف آزمایشی با میکروسکوپ معکوس فاز کنتراست (Nikon Eclipse TE 300) با بزرگنمایی۲۰۰ برابر با روش چشمی ارزیابی شدند. چهار پایوت از هر گروه آزمایشی یخ‌گشایی

ویراستاری نشده

شده و به داخل لوله‌های آزمایش جدا انتقال داده شدند. پس از گرم شدن لام بر روی صفحه گرم کننده، با استفاده از سمپلر ۵ میکرو لیتر از نمونه منی روی لام تخلیه و یک لامل تمیز روی آن قرار گرفت. برای برآورد درصد تحرک کل اسپرماتوزوئید، هشت میدان دید به صورت تصادفی گزینش و با استفاده از شیوه ارزیابی چشمی تحرک کل اسپرماتوزوئید ارزیابی شد (Bucak *et al*., 2009).

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرماتوزوئید

به منظور ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرماتوزوئید، از آزمون یکپارچگی غشاء[1] (HOST) استفاده شد. آزمون یکپارچگی غشاء بر اساس اسمولاریته محیطی که اسپرماتوزوئید در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. اسپرماتوزوئید با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریته کمتر، به سرعت واکنش داد و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. بدیهی است که تنها اسپرماتوزوئیدهای با غشای پلاسمایی سالم قادر بودند به این نوع تغییر واکنش دهند و اسپرماتوزوئید که غشای پلاسمایی آن‌ها آسیب دید بودند هیچ واکنشی نشان ندادند. در واقع پس از انجام این ارزیابی، اسپرماتوزوئید با دم گره خورده(غشای سالم) و اسپرماتوزوئید که دم آن‌ها صاف است به عنوان اسپرماتوزوئید با غشای آسیب دیده در نظر گرفته شد. برای این منظور۳۰ میکرولیتر از منی به ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هایپو اسموتیک هاست که حاوی ۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات سدیم، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس۳۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد انکوبه شد، ارزیابی و شمارش اسپرماتوزوئید با استفاده از میکروسکوپ نوری فازکنتراست با بزرگنمایی۴۰۰ برابر صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوئید شمارش و درصد اسپرماتوزوئیدهای با دم گرده خورده (غشای سالم) نسبت به گره نخورده (غشای آسیب دیده) محاسبه شد (Revell and Morde, 1994).

ارزیابی ناهنجاری‌های ریخت شناسی اسپرماتوزوئید

برای بررسی ریخت‌شناسی اسپرماتوزوئید از محلول هانکوک استفاده شد (Hancock., 1956). برای ارزیابی ناهنجاری های ریخت شناسی اسپرماتوزوئید، ۱۰میکرولیتر از هر نمونه به ۱۵۰ میکرولیتر محلول هانکوک اضافه شد. سپس سه قطره ۲۰ (میکرولیتر) از این محلول روی لام قرار گرفته و به وسیله لامل پوشانده شد. ارزیابی و شمارش اسپرماتوزوئید با استفاده از میکروسکوپ نوری فاز کنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوئید شمارش و به صورت درصد کل اسپرماتوزوآ سالم به کل اسپرماتوزوئید شمارش شده، گزارش شد (Hancock., 1956).

ارزیابی درصد زنده مانی اسپرماتوزوئید

نمونه های منی از نظر درصد اسپرماتوزوئید زنده و مرده با رنگ آمیزی ائوزین - نگروزین مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمون به وسیله روش رنگ آمیزی ائوزین - نگروزین انجام شد. برای ذوب از حمام آب ۳۷ درجه سانتی گراد استفاده شد، نمونه به مدت ۳۰ ثانیه داخل این آب قرار گرفت. سپس در ابتدا ۵ میکرولیتر از نمونه منی با ۵ میکرولیتر رنگ روی لام به آرامی مخلوط و با لام دیگر گسترش تهیه شد. جهت خشک کردن، نمونه گسترش یافته به مدت سه دقیقه در دمای۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. تعداد ۲۰۰ اسپرماتوزوئید به وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی۱۰۰۰ برابر ارزیابی شد. اسپرماتوزوئیدهایی که به طور کلی یا جزئی رنگ قرمز مایل به بنفش به خود بگیرند، مرده و اسپرماتوزوئیدهایی که رنگ به خود نگیرند زنده محسوب شدند (Evans and Maxwell., 1987).

اندازه‌گیری درصد میتوکندری‌های فعال اسپرم

از رنگ فلورسنت رودامین ۱۲۳ برای ارزیابی فعالیت میتوکندری استفاده شد. ۱۰ میکرو لیتر از رودامین ۱۲۳ (۰/۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر آب مقطر) به۵۰۰ میکرولیتر نمونه‌ی رقیق مایع منی (۱۰۶*۵۰ اسپرماتوزوئید/ میلی‌لیتر) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷

[1]. Hypo-osmotic Swelling Test

درجه در تاریکی انکوبه شدند. سپس به مدت سه دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و پلت اسپرماتوزوئید با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول بافرفسفات به حالت معلق درآمد. سپس با ۵ میکرو لیتر نمونه لام تهیه شد. اسپرماتوزوئید با رنگ سبز زیر میکروسکوپ فلورسنت به‌عنوان اسپرماتوزوئید با میتوکندری سالم در نظر گرفته شد (Johnson *et al*.,1980).

اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی

یک میلی‌لیتر از هر نمونه منی با یک میلی‌لیتر EDTA[1]، یک میلی‌لیتر BHT[2] و دو میلی‌لیتر TCA[3] با هم مخلوط و به داخل لوله های آزمایش(فالکون) ریخته و با دور ۱۲۰۰ برای مدت ۱۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس یک میلی لیتر از محلول بالای لوله‌های آزمایش با یک میلی‌لیتر TBA[4] در میکروتیوب، مخلوط شد و برای مدت ۲۰ دقیقه درون آب ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت (Esterbauer and Cheeseman., 1990).

روش آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و رویه GLM (General Linear Model) انجام شد. برای مقایسه میانگین از آزمون توکی با سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. این آزمایش با چهار تیمار و چهار تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد.

مدل آماری شامل طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار :

$$Yij = \mu + Xi + eij$$

- Yij: مقدار عددی هر مشاهده
- μ: میانگین مشاهده
- Xi:اثر تیمار i ام
- eij: اثر عوامل باقی مان

یافته‌های پژوهش

نتایج پژوهش در حالت مایع و پس از یخ‌گشایی در جدول‌های ۲ تا ۸ نشان داده شدند. همچنین نتایج حاصل از آنالیز عصاره اتری بره موم با روش GC-MS در جدول ۹ ارائه شده است.

---

1. Ethylenediaminetetraacetic Acid
2. Butylated Hydroxytoluene
3. Trichloroacetic Acid
4. Thiobarbituric Acid

ویراستاری نشده

تحرک (جنبایی) اسپرم

باتوجه به جدول ۲، نتایج نشان دادند که جنبایی اسپرم در حالت مایع، با افزودن غلظت‌های مختلف عصاره اتری در زمان پنج ساعت نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند (p <۰/۰۵). درحالی که جنبایی اسپرم در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت در تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر معنی‌داری (p <۰/۰۵) نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. مشخص شد که با افزایش زمان، جنبایی اسپرم در همه تیمارها کاهش یافت ولی جنبایی در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. همچنین در حالت پس از یخ-گشایی، جنبایی اسپرم در تیمارهای ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر معنی‌داری (p <۰/۰۵) نسبت به تیمار شاهد داشتند (جدول ۸). نتایج نشان دادند که در حالت مایع، تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر جنبایی اسپرم و در حالت پس از یخ‌گشایی ، تیمار ۰/۲۵ میلی-گرم در میلی‌لیتر بر جنبایی اسپرم اثر افزایشی معنی‌داری (p <۰/۰۵) نسبت به سایر تیمارها داشتند.

(جدول ۲): تاثیرعصاره اتری بر جنبایی اسپرم قوچ در حالت مایع

زمان		غلظت تیمارها			
(ساعت)	شاهد	۰/۲۵ mg/mL	۰/۵ mg/mL	۱mg/mL	DMSO
۵	۷۶/۶۲ ± ۰/۹۶ a	۸۴/۳۹ ± ۰/۹۴a	۸۳/۹۵ ± ۱/۷۹a	۷۹/۱۹ ± ۳/۰۶a	۸۲/۸۴ ± ۲/۶۵a
۲٤	۵۴/۹۶ ± ۱/۱۶ b	۶۸/۵۷ ± ۳/۶۰ a	۶۵/۹۵ ± ۲/۸۵ ab	۵۴/۸۸ ± ۳/۷۲ b	۵۴/۶۱ ± ۱/۶۶ b
٤۸	۲۵/۲۵ ± ۰/۸۲ d	۵۳/۲۴ ± ۲/۴۵ b	۶۲/۷۳ ± ۱/۹۲ a	۳۶/۳۴ ± ۱/۶۸ c	۲۵/۱۷ ± ۱/۷۸ d
۷۲	۸/۷۲ ± ۰/۷۳ d	۴۸/۹۳ ± ۱/۹۶ b	۵۸/۹۰ ± ۲/۶۴ a	۲۹/۷۹ ± ۱/۴۵ c	۸/۶۰ ± ۰/۳۵ d

a-b: حروف نامشابه در هر ردیف به منزله تفاوت معنی دار بین تیمارها است (P< ۰/۰۵). DMSO (دی متیل سولفوکساید)

ویراستاری نشده

یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم

باتوجه به جدول ۳، نتایج نشان دادند که یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در حالت مایع، با افزودن غلظت‌های مختلف عصاره اتری در زمان پنج ساعت نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p < ۰/۰۵$) درحالی که در زمان۴۸ و ۷۲ ساعت در تیمارهای ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. نتایج نشان دادند که در زمان ۷۲ ساعت تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم اثر افزایشی معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) نسبت به سایر تیمارها داشت. همچنین در حالت پس از یخ‌گشایی ، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در تیمارهای ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) نسبت به تیمار شاهد داشتند (جدول ۸).

(جدول ۳): تاثیرعصاره اتری بر یکپارچگی اسپرم قوچ در حالت مایع

زمان	غلظت تیمارها				
(ساعت)	شاهد	۰/۲۵ mg/mL	۰/۵ mg/mL	۱mg/mL	DMSO
۵	۹۳/۷۵ ± ۱/۱۰ [a]	۹۲/۵ ± ۱/۷۰ [a]	۹۳/۲۵ ± ۲/۸۶ [a]	۹۱/۷۵ ± ۱/ ۹۳ [a]	۹۳/۲۵ ± ۱/۷۵ [a]
۲٤	۷۵ ± ۱/۴۷ [a]	۷۹/۵ ± ۱/۷۰ [a]	۷۹/۵ ± ۱/۵۵ [a]	۸۲ ± ۲/۱۶ [a]	۷۵ ± ۱/۷۷ [a]
٤۸	۴۵ ± ۲/۱۶ [b]	۶۴/۷۵ ± ۲/۸۶ [a]	۷۲/۷۵ ± ۱/۴۹ [a]	۷۱/۷۵ ± ۱/۴۹ [a]	۴۳/۵ ± ۲/۲۱ [b]
۷۲	۳۹/۳۷ ± ۱/۲۵ [c]	۵۹/۵ ± ۱/۸۴ [b]	۷۰/۷۵ ± ۱/۱۰ [a]	۶۰/۷۵ ± ۱/۷۰ [b]	۴۰/۲۵ ± ۱/۷۵ [c]

a-b: حروف نامشابه در هر ردیف به منزله تفاوت معنی دار بین تیمارها است ($P < ۰/۰۵$). DMSO (دی متیل سولفوکساید)

ویراستاری نشده

ناهنجاری‌های ریخت شناسی اسپرم

باتوجه به جدول ۴، نتایج ارزیابی ناهنجاری‌های ریخت شناسی اسپرم نشان دادند که در حالت مـایع، بـا افـزودن غلظـت‌هـای مختلـف عصاره اتری در زمان پنج و ۲۴ ساعت نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند (p <۰/۰۵). درحالی که در زمـان ۴۸ و ۷۲ سـاعت تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ و۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشتند (p <۰/۰۵). در حالـت پـس از یـخ‌گشـایی، باتوجه به نتایج ریخت‌شناسی، غلظت‌های مختلف عصاره اتری نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری (p <۰/۰۵) داشتند (جدول ۸).

(جدول ٤): تاثیرعصاره اتری بر ریخت شناسی اسپرم قوچ در حالت مایع

زمان	غلظت تیمارها				
(ساعت)	شاهد	۰/۲۵ mg/mL	۰/۵ mg/mL	۱mg/mL	DMSO
۵	۹۰/۵ ± ۰/۶۴ a	۹۲ ± ۱/۵۸a	۹۴/۲۵ ± ۱/۹۳a	۹۴/۲۵ ± ۱/۷۵ a	۹۴ ± ۱/۲۵ a
۲٤	۸۹/۵ ± ۰/۶۴ a	۹۱/۷۵ ± ۱/۴۹ a	۹۲/۵ ± ۱/۷۰ a	۹۳/۲۵ ± ۱/۸۸ a	۹۳/۵ ± ۱/۸۴ a
٤۸	۵۹/۷۵ ± ۰/۸۵ b	۸۹ ± ۱/۵۸ a	۹۱/۲۵ ± ۱/۱۰ a	۸۹/۷۵ ± ۰/۸۵ a	۵۸/۵ ± ۱/۷۰ b
۷۲	۳۹/۲۵ ± ۱/۲۵ b	۸۸ ± ۱/۸۲ a	۸۹ ± ۱/۲۹ a	۸۸/۷۵ ± ۱/۱۰ a	۳۹/۲۵ ± ۱/۳۷ b

a-b: حروف نامشابه در هر ردیف به منزله تفاوت معنی دار بین تیمارها است (P< ۰/۰۵). DMSO (دی متیل سولفوکساید)

ویراستاری نشده

درصد زنده‌مانی اسپرم

باتوجه به جدول ۵، نتایج نشان دادند که زنده‌مانی اسپرم در حالت مایع، با افزودن غلظت‌های مختلف عصاره اتری در زمان پنج ساعت نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند (p <۰/۰۵). درحالی که زنده‌مانی اسپرم در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت در تیمارهای ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر معنی‌داری (p <۰/۰۵) نسبت به تیمار شاهد نشان دادند.همچنین در حالت پس از یخ‌گشایی، زنده‌مانی اسپرم در تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر معنی‌داری (p <۰/۰۵) نسبت به تیمار شاهد داشتند (جدول ۸). نتایج نشان دادند که در حالت مایع، تیمار ۰/۵ و ۱میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر زنده‌مانی اسپرم و در حالت پس از یخ‌گشایی ، تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر زنده‌مانی اسپرم اثر افزایشی معنی‌داری (p <۰/۰۵) نسبت به سایر تیمارها داشتند.

(جدول ۵): تاثیرعصاره اتری بر زنده‌مانی اسپرم قوچ در حالت مایع

زمان	غلظت تیمارها				
(ساعت)	شاهد	۰/۲۵ mg/mL	۰/۵ mg/mL	۱mg/mL	DMSO
۵	۸۴/۲۵ ± ۱/۷۹ [a]	۹۱ ± ۰/۹۱[a]	۹۱ ± ۱/۲۹ [a]	۸۴/۷۵ ± ۳/۶۳ [a]	۸۹/۲۵ ± ۱/۲۵ [a]
۲٤	۷۰/۷۵ ± ۰/۸۵ [b]	۸۲/۲۵ ± ۲/۶۵ [a]	۷۴ ± ۲/۶۱ [ab]	۷۱ ± ۲/۱۶ [b]	۷۰/۲۵ ± ۰/۸۵ [b]
٤۸	۴۹/۲۵ ± ۰/۸۵ [c]	۶۴/۲۵ ± ۱/۹۳ [b]	۷۲/۵ ± ۱/۷۰ [a]	۷۰/۵ ± ۱/۷۰ [ab]	۴۹ ± ۲/۳۸ [c]
۷۲	۳۹/۲۵ ± ۰/۸۵ [c]	۶۱/۵ ± ۱/۷۰ [b]	۷۰/۲۵ ± ۱/۹۳ [a]	۶۷/۲۵ ± ۱/۴۹ [ab]	۳۸/۵ ± ۱/۹۳ [c]

a-b: حروف نامشابه در هر ردیف به منزله تفاوت معنی دار بین تیمارها است (P< ۰/۰۵). DMSO (دی متیل سولفوکساید)

ویراستاری شده

درصد میتوکندری‌های فعال اسپرم

باتوجه به جدول ۶، نتایج نشان دادند که درصد میتوکندری‌های فعال اسپرم در حالت مایع، با افزودن غلظت‌های مختلف عصاره اتـری در زمان پنج ساعت نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند (p <۰/۰۵). درحالی که درصد میتوکندری‌های فعال اسـپرم در زمـان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر معنی‌داری (p <۰/۰۵) نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. همچنـین مشخص شد که پس از یخ‌گشایی، تمام غلظت‌های مختلف عصاره اتری نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی داری نشان دادنـد (p <۰/۰۵) (جدول۸).

(جدول ٦): تاثیرعصاره اتری بر فعالیت میتوکندری اسپرم قوچ در حالت مایع

زمان		غلظت تیمارها			
(ساعت)	شاهد	۰/۲۵ mg/mL	۰/۵ mg/mL	۱mg/mL	DMSO
۵	۷۳/۷۵ ± ۱/۷۵ a	۶۹/۲۵ ± ۱/۴۹ a	۷۲/۲۵ ± ۱/۲۵ a	۷۶/۷۵ ± ۲/۶۲ a	۷۲ ± ۱/۲۹a
۲٤	۱۹/۲۵ ± ۰/۸۵ b	۶۹ ± ۳/۱۰ a	۷۱ ± ۲/۰۸ a	۷۴/۵ ± ۳/۴۰ a	۲۱ ± ۱/۲۹ b
٤۸	۱۸/۷۵ ± ۱/۴۹ c	۶۷/۵ ± ۲/۲۱ ab	۶۱/۵ ± ۲/۹۵ b	۷۱/۷۵ ± ۲/۵۹ a	۲۰/۷۵ ± ۱/۱۰ c
۷۲	۱۴/۷۵ ± ۱/۲۵ b	۴۹/۵ ± ۳/۳۲ a	۵۷/۲۵ ± ۴/۷۱ a	۵۰/۷۵ ± ۲/۲۸ a	۱۶/۵ ± ۱/۵۵ b

a-b: حروف نامشابه در هر ردیف به منزله تفاوت معنی دار بین تیمارها است (P< ۰/۰۵). DMSO (دی متیل سولفوکساید

ویراستاری نشده

غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی

باتوجه به جدول ۷، نتایج نشان دادند که غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی در حالت مایع، با افزودن غلظت‌های مختلف عصاره اتری در زمان پنج ساعت نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند (p <۰/۰۵) درحالی که غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشتند (p <۰/۰۵). باتوجه به جدول ۸، در حالت پس از یخ‌گشایی ، نتایج نشان دادند که غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی، در تیمارهای ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی-لیتر نسبت به تیمار شاهد اثر معنی‌داری داشتند (p <۰/۰۵). همچنین در حالت پس از یخ‌گشایی ، تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی، اثر افزایشی معنی‌داری (p <۰/۰۵) نسبت به سایر تیمارها داشتند.

(جدول ۷): تاثیرعصاره اتری بر غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی قوچ در حالت مایع

زمان	غلظت تیمارها				
(ساعت)	شاهد	۰/۲۵ mg/mL	۰/۵ mg/mL	۱mg/mL	DMSO
۵	۵/۹۰ ± ۰/۵۳ [a]	۴/۹۶ ± ۰/۵۳ [a]	۴/۱۳ ± ۰/۵۰ [a]	۵/۸۸ ± ۰/۵۲ [a]	۵/۷۳ ± ۰/۳۵ [a]
۲٤	۹/۱۲ ± ۰/۲۴ [a]	۶/۰۳ ± ۰/۷۰ [b]	۴/۹۰ ± ۰/۵۵ [b]	۷/۱۳ ± ۰/۵۷ [ab]	۸/۶۹ ± ۰/۳۶ [a]
٤۸	۱۰/۷۵ ± ۰/۳۶ [ab]	۶/۲۳ ± ۰/۶۷ [c]	۵/۸۰ ± ۰/۶۶ [c]	۷/۹۵ ± ۰/۵۸ [bc]	۹/۷۸ ± ۰/۲۰ [ab]
۷۲	۱۱/۶۶ ± ۰/۳۱ [a]	۷/۹۱ ± ۰/۷۲ [b]	۷/۰۹ ± ۰/۸۰ [b]	۹/۰۶ ± ۰/۷۸ [ab]	۱۱/۲۹ ± ۰/۲۸ [a]

a-b: حروف نامشابه در هر ردیف به منزله تفاوت معنی دار بین تیمارها است (P< ۰/۰۵). DMSO (دی متیل سولفوکساید)

ویراستاری نشده

(جدول ۸): تاثیرعصاره اتری بر فراسنجه‌های اسپرم قوچ در حالت پس از یخ‌گشایی

فراسنجه‌های اسپرم	غلظت تیمارها				
	شاهد	۰/۲۵ mg/mL	۰/۵ mg/mL	۱mg/mL	DMSO
جنبایی	۱۱/۷۰ ± ۰/۶۲ c	۳۸/۹۸ ± ۱/۹۷ a	۲۱/۳۶ ± ۱/۰۸ b	۱۷/۵۸ ± ۰/۱۶ b	۱۱/۶۸ ± ۰/۵۷ c
یکپارچگی غشا	۲۲± ۲/۲۱ c	۳۸/۷۵ ± ۱/۳۷ a	۳۲/۵ ± ۱/۷۰ a	۳۱ ± ۲/۱۹ ab	۲۲ ± ۲/۴۸ c
ریخت شناسی	۵۲ ± ۲/۱۶ b	۷۳ ± ۱/۷۷ a	۶۹ ± ۱/۴۷ a	۶۸/۲۵ ± ۱/۳۷ a	۵۲/۵ ± ۲/۳۹ b
زنده مانی	۲۳/۷۵ ± ۱/۷۵ c	۴۶/۵ ± ۱/۷۰ a	۳۴/۲۵ ± ۱/۹۳ b	۲۹ ± ۱/۲۹ cb	۲۳/۵ ± ۱/۷۰ c
فعالیت میتوکندری	۱۸/۷۵ ± ۱/۴۹ b	۳۱ ± ۱/۲۹ a	۳۰/۵ ± ۱/۷۰ a	۲۷/۵ ± ۱/۵۵ a	۱۸ ± ۱/۸۲ b
غلظت مالون دی آلدئید	۷۳/۷۳ ± ۱/۹۰ a	۳۸/۷۴ ± ۱/۵۴ d	۴۷/۶۱ ± ۱/۲۲ c	۵۸/۸۷ ± ۱/۵۶ b	۷۶/۰۸ ± ۲/۵۴ a

a-b: حروف نامشابه در هر ردیف به منزله تفاوت معنی دار بین تیمارها است ($P< ۰/۰۵$). DMSO (دی متیل سولفوکساید)

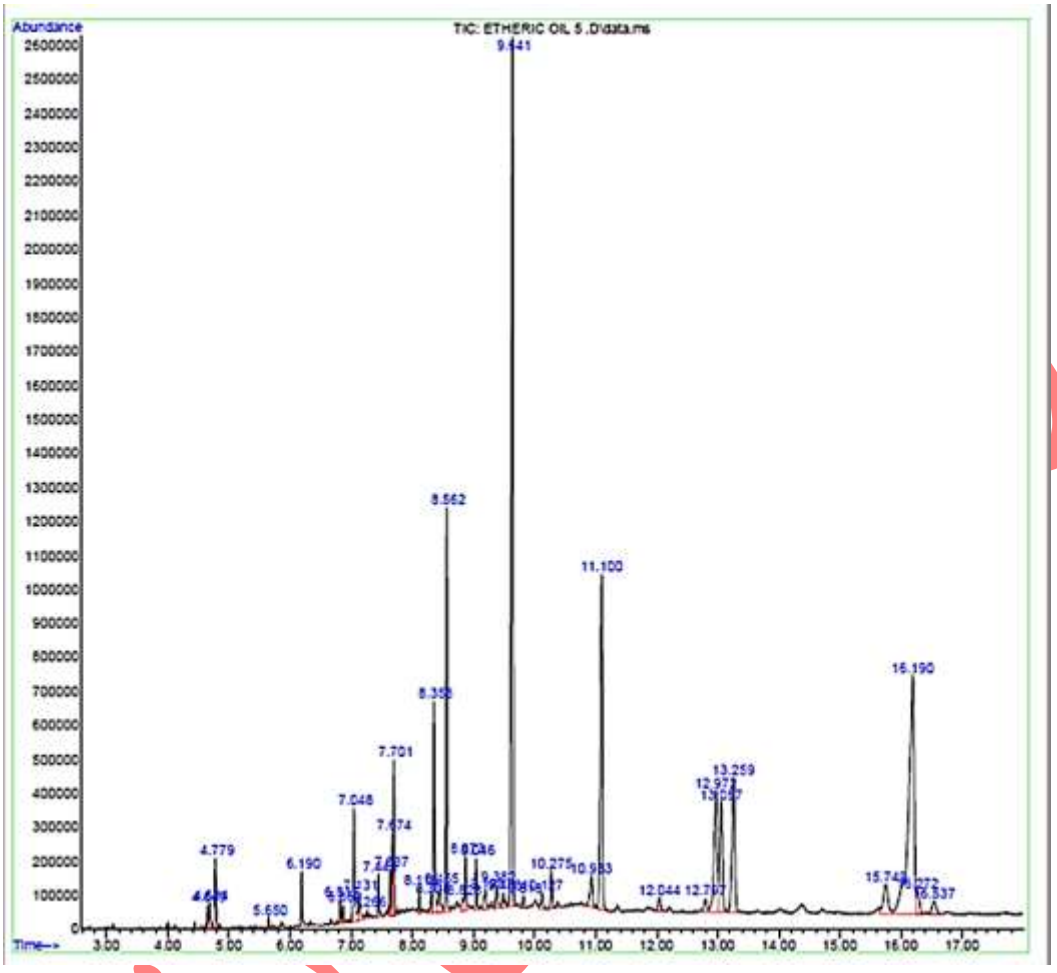
ویراستاری نشده

آنالیز عصاره اتری بره موم با روش GC-MS

نتایج حاصل از آنالیز عصاره اتری بره موم با روش GC-MS در جدول ۹ ارائه شده است. نتایج این آنالیز نشان داد که عصاره اتری بره موم شامل۳۴ ترکیب بود (جدول۹).

(جدول ۹): ترکیبات عصاره اتری بره موم با روش GC-MS

تعداد ترکیبات	مواد شناسایی شده اتری	سطح زیر منحنی(%)	Retention time (min)
۱	Gama.-eudesmol	۰/۳۰	۴/۶۴۷
۲	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene	۰/۴۸	۴/۶۸۳
۳	2-Naphthalenemethanol, decahydro-.alpha.,.alpha.,4a-trimethyl-8-methylene	۱/۳۷	۴/۷۷۷
۴	1H-Indene, 1-ethylideneoctahydro-7a-methyl-, (1Z,3a.alpha.,7a.beta.)	۰/۱۵	۵/۶۴۸
۵	Palmitic acid	۰/۸۲	۶/۱۸۸
۶	Heneicosane	۰/۲۸	۶/۸۱۶
۷	tert-Butyl perbenzoate	۰/۳۰	۶/۸۶۸
۸	Oleic Acid	۲/۴۵	۷/۰۴۹
۹	Octadecanoic acid	۰/۷۲	۷/۱۳۲
۱۰	Eicosane	۱/۸۲	۷/۲۶۷
۱۱	4-(2-Methoxyphenyl)-3-methylbutan-2-ol	۰/۶۷	۷/۴۴۴
۱۲	1-[2-Hydroxy-4-methyl-5-(1-methylethyl)phenyl]-1-heptanone	۰/۶۳	۷/۶۳۶
۱۳	2-Propenoic acid, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)	۱/۰۳	۷/۶۷۲
۱۴	Tricosane	۱/۹۰	۷/۷۰۳
۱۵	Pyridine-3-carboxamide, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)-	۰/۳۹	۸/۳۱۰
۱۶	2-Propen-1-one, 1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenyl-,	۴/۱۵	۸/۳۵۷
۱۷	1-Tetracosanol	۰/۷۷	۸/۴۵۵
۱۸	Docosane	۱۱/۵۱	۸/۵۶۴
۱۹	4H-1-Benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-phenyl-,	۱/۰۲	۸/۸۲۹
۲۰	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	۰/۹۸	۸/۸۷۰
۲۱	4,14-Bis(hydroxymethyl)-[2.2]metacyclophane	۰/۶۴	۹/۱۹۷
۲۲	n-Tetracosanol-1	۰/۳۷	۹/۴۸۸
۲۳	Heptacosane	۲۱/۰۳	۹/۶۴۳
۲۴	Ethyl 2-acetamido-3,3,3-trifluoro-2-(4-fluoroanilino)propionate	۰/۴۹	۱۰/۱۲۶
۲۵	Octadecane	۰/۸۲	۱۰/۲۷۷
۲۶	13-Tetradecen-1-ol acetate	۱/۱۹	۱۰/۹۳۰
۲۷	Celidoniol, deoxy	۱۰/۲۱	۱۱/۱۰۲
۲۸	Octadecane	۱/۲۵	۱۲/۰۴۶
۲۹	Leucettidine	۰/۵۳	۱۲/۷۹۸
۳۰	1-Heptacosanol	۵/۶۴	۱۲/۹۶۹
۳۱	n-Tetracosanol-1	۴/۱۰	۱۳/۰۵۸
۳۲	1,19-Eicosadiene	۲/۰۴	۱۵/۷۵۱
۳۳	(Z) 9-Tricosene	۱۸/۹۶	۱۶/۱۹۲
۳۴	Triacontyl acetate	۰/۹۹	۱۶/۲۶۹



نگاره ۱ . کروماتوگرام GC-MS عصاره اتری بره موم

بحث

در این پژوهش تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره اتری بره موم، بر فراسنجه‌های اسپرم قوچ زل در حالت مایع و پس از یخ‌گشایی مورد بررسی قرار گرفت. در پژوهش حاضر مشخص شده است که عصاره اتری بره موم که با GC-MS ارزیابی شده بود دارای ترکیباتی مانند 4H-1-Benzopyran-4-one ,β-Eudesmol, 2-Propen-1-one, (Z)-9-Tricosene ,Heptacosane ,Palmitic acid ,Oleic Acid بود (جدول ۹).

تاثیر عصاره اتری بره موم برنگهداری کوتاه مدت اسپرم

نتایج این پژوهش نشان داد که در حالت مایع، تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمای اسپرم اثر افزایشی معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) نسبت به تیمار شاهد داشتند. تاثیر مثبت تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر ریخت‌شناسی و افزایش فعالیت میتوکندری اسپرم نیز نشان داده شد.

نتایج این پژوهش نشان دادند که، در حالت مایع تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره اتری بر جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای اسپرم اثر افزایشی معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) نسبت به تیمار شاهد داشت. اسید اولئیک از جمله ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره اتری است که

افزودن آن به رقیق‌کننده منی گاو بر یکپارچگی غشای اسپرم، تاثیر مثبت دارد. غشای پلاسمایی اسپرم از اندامک‌ها در برابر آسیب‌های مکانیکی محافظت می‌کند و به عنوان فیلتری برای تبادل مواد درون و برون سلولی عمل می‌کند. یکپارچگی غشای پلاسمایی برای اسپرم بسیار مهم است زیرا بر متابولیسم مرتبط با تحرک و زنده‌مانی اسپرم تأثیر می‌گذارد (Yousif *et al*., 2024) نشان دادند که چربی-ها، تنش اکسیداتیو و تولید ROS، فرآیندهای التهابی را تعدیل می‌کنند و به عنوان یک جزء از غشاء، نقش مهمی در نفوذپذیری غشاء دارند به‌طوری که نفوذپذیری وکشش غشاء را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند (Collodel *et al*., 2020). ترکیبات گلیکولیپیدی در غشاء با جذب و مصرف اسیدهای چرب از رقیق کننده موجب افزایش سیالیت غشاء می‌شوند. همچنین منجربه افزایش انعطاف‌پذیری دم اسپرم که لازمه تحرک اسپرم است، می‌شوند. همچنین نشان داده شده است که یکی از دلایل کاهش زنده‌مانی اسپرم به دنبال ذخیره مایع منی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است که از متابولیسم اکسیژن (O2) تولید می‌شوند. اسپرم پستانداران، یک سلول فعال است که به طور خود به خود ROS تولید می‌کند. ROS بیش از حد که در طول ذخیره مایع منی تولید می‌شود، واکنش‌های اکسیداتیو را آغاز می‌کند که در نهایت منجر به مرگ سلول‌های اسپرم می‌شود. افزودن اسید اولئیک می‌تواند تحرک اسپرم قوچ، درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ، درصد اسپرم با غشای پلاسمایی سالم، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را در شرایط ذخیره‌سازی مایع، افزایش دهد (Badr *et al*., 2004) که با یافته‌های پژوهش کنونی هم‌خوانی دارد . پژوهش‌های پیشین نشان دادند که با افزودن دوزهای پایین اسید اولئیک، سطح آنتی‌اکسیدان در پلاسمای منی و اسپرم افزایش یافته و تاثیر مثبت بر کیفیت مایع منی مرغ در طول نگهداری کوتاه مدت دارد (Eslami *et al*., 2016). همچنین تاثیرات مفید اسید اولئیک بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بر روی موش صحرایی، سلول‌های بتای پانکراس انسان، سلول‌های سرطانی سینه، تخمدان، معده انسان و اسپرم خروس نشان داده شده است (Hashem *et al*., 2017). در پژوهش حاضر، یکی از ترکیبات مهم عصاره اتری 2-Naphthalenemethanol بوده که با دستگاه GC/MS شناساسس شد و نام دیگر آن β-Eudesmol می‌باشد، دارای فعالیت‌های آنتی اکسیدانی است و سلول را از آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد حفظ می‌کند. این ترکیب می‌تواند به عنوان یک عامل محافظتی در برابر تنش اکسیداتیو عمل کند (Azevedo, 2018) و در جنبایی، زنده‌مانی اسپرم موثر باشد. بنابراین اثر افزایشی در جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای اسپرم قوچ با افزودن عصاره اتری را می‌توان وجود اسید اولئیک و β-Eudesmol دانست. یافته های ما تاثیر مثبت تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر ریخت‌شناسی و افزایش فعالیت میتوکندری اسپرم را نشان داد. مشخص شده است که افزودن اسید اولئیک و اسید پالمیتیک با تقویت بتا اکسیداسیون در میتوکندری برای تولید ATP، منجربه افزایش تحرک، ریخت شناسی، یکپارچگی غشاء، یکپارچگی آکروزوم، فعالیت میتوکندری و کیفیت اسپرم گراز در طول ذخیره‌سازی مایع می‌شود در حالی که آپاپتوزیس را کاهش می‌دهد (Zhu *et al*., 2020). پژوهش‌های پیشین نشان دادند که چربی‌ها بخش عمده سلول‌های جانوری را در بر می‌گیرند و در اسپرم نه تنها منبع انرژی محسوب می‌شوند بلکه در تمام مراحلی که منجر به باروری می‌شوند مانند تحرک، قابلیت زنده‌مانی و بلوغ نیز دخالت دارند که ساختارهای فیزیولوژیکی غشاء دولایه را حفظ نموده، همچنین از دست دادن انرژی را کاهش داده و میتوکندری را برای استفاده انرژی در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند واکنش آکروزوم و ظرفیت پذیری حمایت می‌کند (Aksoyet *et al*., 2006) که با نتایج پژوهش کنونی هم خوانی دارد.

تاثیر عصاره اتری بره موم بر انجماد اسپرم

باتوجه به ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم پس از یخ‌گشایی مشخص شد که تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به تیمار شاهد، تاثیر معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) بر جنبایی و زنده‌مانی اسپرم داشت. همچنین یافته‌ها نشان دادند که تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) در ریخت‌شناسی و افزایش فعالیت میتوکندری اسپرم داشتند.

یافته‌های این پژوهش نشان دادند که تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به تیمار شاهد، تاثیر معنـی‌داری (p <۰/۰۵) بـر جنبـایی و زنده‌مانی اسپرم داشت. علاوه بر اینکه اسید اولئیک منجربه بهتر شدن ویژگی‌های اسپرم می‌شود (Meizel & Turner, 1983). نشان داده شده است که اسیدهای چرب، مانند اسید اولئیک، منجربه انجام واکنش آکروزومی در اسـپرم همسـتر در شـرایط آزمایشـگاهی مـی‌شـود (Hossain *et al*., 2007). اهمیت چربی‌ها، در غشای پلاسمایی و پلاسمای مایع منی برای عملکرد اسپرم از مدت‌هـا قبـل شـناخته شـده است. چربی‌های موجود در غشاء اسپرم با تحرک و زنده‌مانی اسپرم پس از یخ‌گشایی ارتباط مستقیم دارند. اسیدهای چـرب غیراشـباع در غشای سلول اسپرماتوزوئید موجب افزایش انعطاف‌پذیری دم اسپرماتوزوئید شده و از پارگی غشاء و مرگ سلولی در اثر تشـکیل بلورهـای یخ جلوگیری می‌کند (Badr *et al*., 2004). افزودن چربی‌ها به محیط رقیق‌کننده، انجمادپذیری، قدرت بـاروری و تحـرک اسـپرم قـوچ در شرایط برون‌تنی را بهبود می‌بخشد (Badr *et al*., 2004). افزودن اسید اولئیک به منی گاو، با افزایش نـرخ آبسـتنی در گـاو همـراه اسـت (Pickett *et al*., 1976). توانایی لقاح برای ارزیابی دقیق کیفیت مایع منی استفاده می‌شود و بهترین فراسنجه برای ارزیـابی کیفیـت منـی منجمد در نظر گرفته می‌شود (Vale *et al*., 1998). افزایش نرخ آبستنی رابطه مستقیمی با بهتر شدن ویژگی‌های اسـپرم ماننـد تحـرک، یکپارچگی غشاء، زنده‌مانی اسپرم، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیمی محیط اسپرم پس از یخ‌گشایی منـی گـاو دارد. پـژوهش‌هـای پیشین نشان دادند که افزودن اسید اولئیک منجربه کاهش (ROS) و افزایش کیفیت منی قوچ پـس از یـخ‌گشـایی مـی‌شـود (Soltani, 2023). همچنین β-Eudesmol و 2-Propen-1-one نیز دارای فعالیت‌های آنتی اکسیدانی اند که سلول را از آسیب ناشی از رادیکـال‌هـای آزاد حفظ و منجربه افزایش درصد جنبایی و زنده‌مانی در اسپرم می‌شوند (Azevedo, 2018 ; Jasim *et al*., 2021). بنابراین تـاثیر عصـاره اتری بر جنبایی، زنده‌مانی و کیفیت اسپرم پس از یخ‌گشایی را می‌توان به اثر ترکیبات موجود در عصاره اتری نسبت داد.

یافته‌ها نشان دادند که تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثـر معنـی‌داری (p <۰/۰۵) در ریخـت‌شناسـی و افـزایش فعالیـت میتوکندری اسپرم داشتند. اسیدهای چرب به‌وسیله اکسیداسیون میتوکندری در قسمت میانی اسـپرم، متـابولیز مـی‌شـوند. افـزودن اسـید اولئیک و اسید پالمیتیک منجربه افزایش میزان گلوکز اسپرم، فعالیت میتوکندریایی و همچنین تولید ATP می‌شـوند. در نتیجـه از اسـید اولئیک و اسید پالمیتیک برای تولید ATP از راه اکسیداسیون در میتوکندری استفاده که منجربه افزایش فعالیت میتوکندری در اسپرم گراز می‌شود (Zhu *et al*., 2020). نشان داده شده است که 4H-1-Benzopyran-4-one (Quercetin) در نگهداری بلند مدت منی قوچ با حفـظ ساختار میتوکندریایی منجربه حفظ جنبایی اسپرم قوچ می‌شود. همچنین پس از یخ‌گشایی منجربه حفظ یکارچگی DNA و افزایش زنـده-مانی اسپرم می‌شود (McNiven & Richardson, 2006) که با یافته‌های پژوهش کنونی هم‌خوانی دارند.

تاثیر عصاره اتری بره موم بر غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی

یافته‌ها نشان دادند که غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی در حالت مایع، با افزودن غلظت‌های مختلف عصاره اتری بره موم در زمان پنج ساعت نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند (p <۰/۰۵) و در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین تاثیر و تیمار ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کمترین تاثیر را نسبت به تیمار شاهد داشتند. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که در حالت پس از یخ‌گشایی، غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی، در تیمارهای ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به تیمار شاهد اثر معنی‌داری داشتند (p <۰/۰۵) و تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی، اثر افزایشی معنی‌داری (p <۰/۰۵) نسبت به سایر تیمارها داشت. در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و در حالت مایع ، تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین اثر و تیمار ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کمترین اثر در غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی را نسبت به تیمار شاهد داشتند. یافته‌های پژوهش‌های پیشین نشان دادند که اسید اولئیک منجربه کاهش غلظت مالون دی آلدئید اسپرم قوچ، افزایش سطح ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و در نهایت افزایش کیفیت اسپرم قوچ در نگهداری مایع در دمای پایین می‌شود (Hashem *et al*., 2017). همچنین پژوهش‌های پیشین نشان دادند که افزودن دوزهای پایین اسید اولئیک منجربه کاهش پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) و افزایش آنتی‌اکسیدان در پلاسمای منی و اسپرم در طول نگهداری کوتاه مدت مایع منی مرغ می‌شود و تاثیر مثبت بر کیفیت مایع منی مرغ دارد (Eslami *et al*., 2016) و با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد. در حالت پس از یخ‌گشایی، غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی، در تیمارهای ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به تیمار شاهد اثر معنی‌داری داشتند (p <۰/۰۵) و تیمار

۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی، اثر افزایشی معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) نسبت به سایر تیمارها داشت. یافته‌های پیشین نشان دادند که افزودن اسید اولئیک به رقیق‌کننده منی منجربه کاهش پراکسیداسیون لیپیدی (MDA)، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و افزایش کیفیت منی قوچ پس از یخ‌گشایی می‌شود (Soltani, 2023). همچنین نشان دادند که Heptacosane یک آلکان با زنجیره مستقیم با ۲۷ اتم کربن است که به طور طبیعی در چندین گیاه، حشرات و در بافت نشخوارکنندگان یافت می‌شود. نشان داده شده است، Heptacosane ترکیبات اصلی عصاره اتری هستند که P–گلیکوپروتئین (یکی از مکانیسم‌های مقاومت دارویی) و فعالیت ATPase را در بیماران مبتلا به مقاومت دارویی مهار می‌کند. به این دلیل، می توان آنها را در ترکیب با داروهای مختلف شیمی درمانی ضد سرطان برای اثربخشی در بیماران مبتلا به مقاومت دارویی استفاده کرد. استفاده از محصولات طبیعی مانند فلاونوئیدها نیز منجربه مهار فعالیت P–گلیکوپروتئین می‌شوند. بیشتر این ترکیبات طبیعی قابلیت مهار فعالیت ATPase و کاهش بیان ژن کد کننده P–گلیکوپروتئین را دارند (Labbozzetta *et al*., 2022). (Z) -9-Tricosene ازجمله دیگر ترکیبات عصاره اتری است که یک فرمون حشره ای برای جذب نرها در جفت‌گیری است. فرمون‌ها اجزای فرار هستند آنها از آلکان‌های با زنجیره کوتاه با گروه های استوکسی یا ترپن‌ها مشتق شده اند و دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می‌باشند (Wicker-Thomas, 2007). 2-Propen-1-one (Chalcones) ترکیبات آغازگر بیوسنتز فلاونوئیدها و ایزوفلاونوئیدها اند که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی زیادی هستند (Jasim *et al*., 2021). 4H-1-Benzopyran-4-one (Quercetin) نیز به عنوان یکی از ترکیبات عصاره اتری، منجربه کاهش غلظت مالون دی آلدئید در منی نریان می‌شود (McNiven & Richardson, 2006). تاثیر عصاره اتری بر غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی را می‌توان به ویژگی‌های ترکیبات موجود در عصاره اتری نسبت داد. احتمالا علت روند کاهشی غلظت زیاد عصاره اتری بره موم (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) را می‌توان به مقدار زیاد اسیدهای چرب و ترکیبات آنتی اکسیدانی نسبت داد که خود منجربه تولید اکسیدان‌ها می‌شوند.

نتیجه‌گیری

بنابراین نتایج پژوهش حاضر نشان داد، افزودن عصاره اتری منجربه افزایش جنبایی، زنده‌مانی و فعالیت میتوکندری و کاهش غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی و در نهایت افزایش کیفیت اسپرم در حالت مایع و پس از یخ‌گشایی شد.

منابع

۱. مومن نژاد، مجتبی. (۱۳۹۷). تاثیر بره موم بر نگهداری کوتاه و بلند مدت منی قوچ. *پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد* به راهنمایی حمید دلدار. مازندران: دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۲. واحدی، وحید. (۱۳۹۹). بررسی اثرات عصاره گیاه شاه اسپرم بر برخی از فراسنجه های کیفی اسپرم قوچ مغانی پس از انجماد و یخ گشایی. *پژوهشهای علوم دامی* (دانش کشاورزی)، ۳۰(۴)، ۷۱–۸۲.

3. Azevedo, D. C. (2018). Eudesmol and its derivatives as potent antioxidants: a combined experimental and theoretical study. *Journal of Molecular Structure*, 1164: 449-456.
4. Aksoy, Y., Aksoy, H., Altinkaynak, K., Aydin, H. R. & Ozkan, A. (2006). Sperm fatty acid composition in subfertile men. Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids. *Sciencedirect*, 75(2): 75-79.
5. Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sarıözkan, S. & Ulutaş, P. A. (2009). Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research*, 81(1), 13-1.
6. Baghshahi, H., A. Riasi, A.H. Mahdavi & A. Shirazi. (2014). Antioxidant effects of clove bud (Syzygium aromaticum) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. *Cryobiology*, 69: 482-487.
7. Badr, M.R., Abdel-Malak, M.G. & Shaker, M. H. (2004). Influence of some fatty acids and cholesterol addition to semen extender on freezability and in vitro fertilizing potential of ram spermatozoa. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 50: 304-318.
8. Collodel, G., Castellini, C., Chung-Yung Lee, J. & Signorini, C. (2020). Relevance of fatty acids to sperm maturation and quality. *oxidative medicine and cellular longevity*, 124(14).

9. Chatterjee, S., Lamirande, E. & Gagnon, C. (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction and Development*, 60: 498-506.
10. Davis, T.C. & White, R.R. (2020). Breeding animals to feed people: the many roles of animal reproduction in ensuring global food security. *Theriogenology* ,150: 27–33.
11. Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *In Methods in enzymology*, 186 (407-421). Academic Press.
12. Evans, G., & Maxwell, W. C. (1987). Salamons' artificial insemination of sheep and goats (No. Ed. 2), *Butterworths*.
13. Eslami, M., Ghaniei, A. & Rad, H. M. (2016). Effect of the rooster semen enrichment with oleic acid on the quality of semen during chilled storage. *Poultry science*, 95(6): 1418-1424.
14. Farooqui, T. & A Farooqui A. (2010). Molecular Mechanism Underlying the Therapeutic Activities of Propolis: A Critical Review .*Current Nutrition and Food Science*, (14)186-199.
15. Hancock, J. (1956). The morphology of boar spermatozoa. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 76: 84-97.
16. Hossain, S., Tareq, K., Hammano, K.-I. & Tsujii, H. (2007). Effect of fatty acids on boar sperm motility viability and acrosome reaction. *Reproductive medicine biology of Reproduction*, 6, 235-239.
17. Hashem, E. Z., Haddad, R. & Eslami, M. (2017). Evaluation of ram semen enrichment with oleic acid on different spermatozoa parameters during low temperature liquid storage. *Small Ruminant Research*, 150: 30-39.
18. Iv´an Y´anez-Ortiz., Catal´an, J., Rodríguez-Gil, J. E., Mir´, J. o & Yeste, M. (2022). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep .*Animal Reproduction Science*, 246.
19. Johnson LV, M.L. & Walsh, L.B. Chen. (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc NatI Acad Sci USA*, 77:990.
20. Jasim, H. A., Nahar, L., Jasim, M. A., Moore, S. A., Ritchie, K. J. & Sarker, S. D. (2021). Chalcones: Synthetic chemistry follows where nature leads. *Biomolecules*, 11(8): 1203.
21. Komarek , R. J., Pickett, B. W., Lanz, R. N. & Jensen, R. G. (1964). Lipid composition of bovine spermatozoa and seminal plasma. *Journal of Dairy Science.*
22. Lin, K.W., Yang, S.C. & Lin, C.N. (2011). Antioxidant constituents from the stems and fruits of Momordica charantia *Food Chemistry*, 127(2): 609-614.
23. Linford, E., Glover, F.A., Bishop, C. & Stewart, D.L. (1976). The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bulls. *Reproduction and Fertility*, 47: 283-291.
24. Labbozzetta, M., Poma, P., Tutone, M., McCubrey, J. A., Sajeva, M. & Notarbartolo, M. (2022). Phytol and heptacosane are possible tools to overcome multidrug resistance in an in vitro model of acute myeloid leukemia. *Pharmaceuticals*, 15 (3): 356.
25. Meizel, S. & Turner, K. O. (1983). Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids. *FEBS letters*, 161(2): 315-318.
26. Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Martínez, F., Cano, R., Blas, I. de & 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.
27. McNiven, M. A. & Richardson, G. F. (2006). Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. *Cell Preservation Technology* ,4(3): 169-177.
28. Momennejad, M. (2019). Effect of Propolis on short term preservation and cryopreservation of ram semen. Master's thesis by Hamid Deldar.Mazandaran: Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University .
29. (*inPersian*)
30. Nijs, M., Creemers, E., Cox, A., Janssen, M., Vanheusden, E., Castro-Sanchez, Thijs, Y., H. & Ombelet, W. (2009). Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reproduction Biomed*, 19: 202–206.
31. Pickett, B., Faulkner, L., Seidel Jr, G., Berndtson, W & Voss, J. (1976). Reproductive physiology of the stallion. IV. Seminal and behavioral characteristics. *Journal of animal science*,43, 617-625.

32. Revell, S.G. & Mrode , R.A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36: 77–86.
33. Soltani, L. (2023). Role of Oleic Acid and Trehalose on Frozen-Thawed Ram Semen. *Cryoletters*, 44(6): 343-351.
34. Silva, J. C., Rodrigues, S., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1790-1795.
35. Veerkamp, R.F. & Beerda, B. (2007). Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology*, 68: 266–273.
36. Vale, W., Marques, J., Ohashi, O., Sousa, J., Silva, A., de Souza, H & Ribeiro, H. (1998). Buffalo reproduction and breeding in Brazil, In: 4th Sipar of lipid-based cryoprotectants. *Biology of reproduction* ,74, 359-365.
37. Vahedi, V. (2020). Effects of Costmary (Tanacetum balsamita L.) extract on selected quality parameters of Moghani ram sperm after cryopreservation. *Journal of Animal Science*, 30(4) ,71-82. (*inPersian*)
38. Wicker-Thomas, C. (2007). Pheromonal communication involved in courtship behavior in Diptera. *Journal of Insect Physiology* ,53(11): 1089-1100.
39. Yousif, A. I., Abd-Elaziz, M. A. & Shehabeldin, A. M. (2024). Nano-oleic Acid inTris-Extender: Effects on Bull Sperm Cryopreservation, Fertility, and Post-thaw Antioxidant Status. *Journal of Sustainable Agricultural and Environmental Sciences* ,3(4): 9-18.
40. Zhu, Z., Li, R., Feng, C., Liu, R., Zheng, Y., Hoque, S. M., Wu, D., Lu, H., Zhang, T. & Zeng, W. (2020). Exogenous oleic acid and palmitic acid improve boar sperm motility via enhancing mitochondrial β-oxidation for ATP generation. *Animals* ,10(4): 591.

Introduction

In all mammalian species, sperm cryopreservation is an essential Assisted Reproductive Technique (Davis and White, 2020). Sperm cryopreservation allows for long-term storage, transport of semen for long distances regardless of the location and gene dispersal of genetically superior animals from generation to generation (Veerkamp & Beerda, 2007). Because, there are several barriers associated to cryopreservation and Sperm are very sensitive to temperature changes, their viability is compromised after thawing. (Nijs *et al*., 2009). This, has led to an exhaustive series of studies on post-thaw sperm quality a bout of production of reactive oxygen species (ROS) and integrity of plasma membrane because excessive production of ROS can impair sperm integrity causing male infertility. Propolis is a natural resinous substance collected by bees and mainly these isolated compounds belong to main groups, flavonoids (Malo *et al*., 2010). Propolis has several properties including antioxidant properties and it is considered as a strong natural antioxidant because it contains flavonoid as a scavenger of ROS for protecting cellular membranes from lipid peroxidation by increasing antioxidant enzymes to attack ROS (Farooqui & A. Farooqui., 2010).Therefore, In the present study, the effect of ether extract of propolis on the semen characteristics of Zel's ram under short and long-term preservation was investigated.

Materials and Methods

In the present study, the effect of ether extract of propolis on the semen characteristics of Zel's ram under short and long-term preservation was investigated. The experimental groups comprised different concentrations of ether extract (0, 0.25, 0.5, and 1 mg/mL) and dimethyl sulfoxide (DMSO). The samples were evaluated at 0, 24, 48, and 72 hours after storage at 4 °C and following the freeze-thawing process. In this research, Sperms were collected from Four mature Zel's ram and after checking and confirming the quality, the sperms were mixed together. All ejaculates were diluted with a Tris-based cryoprotective extender. One week after freezing, four straws of each ram were thawed and evaluated and sperm quality traits motility, viability, membrane integrity, mitochondrial activity, malondialdehyde concentration (MDA), and morphology under short and long-term preservation was investigated.

Results and discussion

During the cold storage, sperm quality traits motility, viability, membrane integrity, mitochondrial activity, malondialdehyde concentration (MDA), and morphology increased significantly ($P<0.05$) at concentrations of 0.25 and 0.5 mg/mL ether extract in comparison with the control group. Our results revealed that the total motility, viability, and membrane integrity in the concentration of 0.5 mg/mL ether extract were higher than the control group ($P<0.05$) at 4 °C. Also, motility, viability and malondialdehyde concentration (MDA) were higher in concentrations of 0.25 mg/mL ether extract than in the control group in the freeze-thawing process. Mitochondrial activity and morphology of spermatozoid at 0.25 and 0.5 mg/mL ether extract were higher than the control group ($P<0.05$) in storage at 4 °C and freeze-thawing process. Addition of oleic acid to Tris-based extender improved the quality of ram semen post-thawing (Soltani, 2023). 2-Propen-1-one (Chalcones) has several properties including antioxidant.Chalcones improved the sperm quality and belong to the flavonoid class (Jasim *et al*., 2021). Oleic acid increased superoxide dismutase activities, the total antioxidant capacity levels, decreased the amounts of malondialdehyde and enhanced the motility of ram

spermatozoa during liquid storage (Hashem *et al*., 2017). For maintaining motility, sperm requires ATP production and the mitochondrial - oxidation metabolic pathway works. Addition of Oleic acid and palmitic acid as the energy substrates for ATP production to the extender would increase sperm quality during the liquid storage (Zhu *et al*., 2020).

Conclusion

The results of this research indicated that adding ether extract at the concentrations of 0.25 and 0.5 mg/mL to the semen extender improved the quality of spermatozoid in the Zel breed sheep.

ویراستاری نشده