



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

Azin Vahdat¹, Hamid Deldar^{2✉}, Zarbakh Ansari Pirsaraie³, Bahram Shohreh³, Essa Dirandeh³

1. Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Email: Azin.vahdat96@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran. Email: hamiddeldar@guilan.ac.ir
3. Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Email: zarbakht_ansari@yahoo.com
4. Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Email: bahramshohreh@yahoo.com
5. Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Email: dirandeh@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	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..
Article history: Received: 3 December 2024 Received in revised form: 3 January 2025 Accepted: 18 January 2025 Published online: Autumn 2025	
Keywords: <i>Ether extract,</i> <i>Propolis,</i> <i>Cryopreservation,</i> <i>Ram sperm.</i>	
Cite this article: Vahdat, A., Deldar, H., Ansari Pirsaraie, Z., Shohreh, B., Dirandeh, E. (2025). Effect of different concentrations of ether extract of propolis on the sperm characteristics of Zel ram. <i>Iranian Journal of Animal Science</i> , 56 (3), 565-583. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2025.386238.654048	
© The Author(s). DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2025.386238.654048	Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

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 about 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.

Author Contributions

Azin Vahdat: Software, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft.

Hamid Deldar: Conceptualization, Validation, Methodology, Supervision, Writing - Review & Editing, Project administration.

Zarbakht Ansari Pirsaraie: Validation, Advisor, Writing and Critical Review

Bahram Shohreh: Validation, Advisor, Writing and Critical Review

Essa Dirandeh: Validation, Advisor, Writing and Critical Review

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data Availability Statement

The data supporting reported results are collected and used from published articles, to them we have referred in the manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank all participants of the present study.

Ethical considerations

The study was approved by the Ethics Committee of the Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (Ethical code: 23123914). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره اتری بره موم، بر ویژگی‌های اسپرم قوچ زل

آذین وحدت^۱ | حمید دلدار^۲ | زربخت انصاری پیرسرائی^۳ | بهرام شهره^۴ | عیسی دیرنده^۵

۱. گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: Azin.vahdat96@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: hamiddeldar@guilan.ac.ir
۳. گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: zarbakht_ansari@yahoo.com
۴. گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: bahramshohreh@yahoo.com
۵. گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: dirandeh@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر 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 میلی گرم در میلی لیتر) و رقیق کننده بدون عصاره به عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. عصاره اتری در محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO) 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 میلی گرم در میلی لیتر عصاره اتری تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشتند ($p < 0.05$). نتایج نشان دادند که در حالت مایع، تیمار ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر بر جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمای اسپرم و پس از یخ‌گشایی، تیمار ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بر جنبایی، زنده‌مانی و غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی، اثر افزایشی معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به سایر تیمارها داشتند. همچنین تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر هم در حالت مایع و هم پس از یخ‌گشایی، اثر معنی‌داری ($p < 0.05$) بر ریخت‌شناسی و افزایش فعالیت میتوکندری اسپرم داشتند. بنابراین پژوهش حاضر نشان داد، افزودن غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره اتری منجر به افزایش کیفیت اسپرم (جنبایی، زنده‌مانی، ریخت‌شناسی، یکپارچگی غشای پلاسمای، فعالیت میتوکندری و غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی) در حالت مایع و پس از یخ‌گشایی شد.

استناد: وحدت، آذین؛ دلدار، حمید؛ انصاری پیرسرائی؛ شهره، بهرام و دیرنده، عیسی (۱۴۰۴). تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره اتری بره موم، بر ویژگی‌های اسپرم قوچ زل. نشریه علوم دامی ایران، ۵۶ (۳)، ۵۶۵-۵۸۳. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2025.386238.654048>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2025.386238.654048>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

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 فناوری های جدید برای تولیدمثل گونه های 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 گونه های پستانداران است و موجب افزایش بازده تولیدمثلی و تامین پروتئین حیوانی می شود (Iv'an Y'anez-Ortiz et al., 2022). در واقع، انجماد اسپرم امکان ذخیره سازی طولانی مدت، پراکندگی ژن حیوانات برتر ژنتیکی از نسلی به نسل دیگر و انتقال مایع منی برای مدت طولانی و به دورترین مکان ها را فراهم می کند (Veerkamp & Beerda, 2007). با این حال، مشکلات زیادی در رابطه با انجماد وجود دارد زیرا اسپرم ها به تغییرات دما بسیار حساس هستند و پس از یخ گشایی، زنده ماندن آنها به خطر می افتد که در نهایت باعث کاهش باروری اسپرم می شود (Nijis et al., 2009). این امر منجر به پژوهش در مورد کیفیت اسپرم پس از یخ گشایی (به عنوان مثال تحرک، زنده ماندن، یکپارچگی غشای پلازما، آکروزوم و DNA و تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) و...) شده است (Baghshahi et al., 2014). تنش اکسیداتیو و تولید بیش از حد ROS منجر به آسیب های برگشت ناپذیر DNA و پروتئین ها، پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش آپاپتوزیس و کاهش کیفیت و باروری اسپرم خواهد شد (Chatterjee et al., 2001). به منظور ویژگی های اسپرم مایع، منجمد، جلوگیری از تنش اکسیداتیو و حذف رادیکال های آزاد فعال، از آنتی اکسیدان ها در محیط های اسپرم مایع و منجمد استفاده می شود (Malo et al., 2010). از آنجایی که آنتی اکسیدان های مصنوعی می توانند عوارض جانبی داشته باشند، امروزه بیشتر از آنتی اکسیدان های طبیعی استفاده می شود (Lin et al., 2011). بره موم از منابع گیاهی توسط زنبورهای عسل جمع آوری می شود و مهم ترین اجزای آن اسیدهای فنولی، فلاوونوئیدها، مواد موم-چربی و بسیاری اجزای دیگر مانند ویتامین ها، پروتئین ها، آمینو اسیدها و قندها هستند. بره موم دارای خاصیت درمانی (بیولوژیکی/دارویی) مانند خاصیت ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، تعدیل کننده ایمنی، ضد تومور، ضد سرطان، ضد زخم، محافظت از کبد و محافظت از قلب است (Farooqui & A. Farooqui., 2010). چربی های موجود در غشاء اسپرم با تحرک و زنده ماندن اسپرم پس از یخ گشایی ارتباط مستقیم دارند. چربی ها، تنش اکسیداتیو و تولید ROS، فرآیندهای التهابی را تعدیل می کنند و به عنوان یک جزء از غشاء، نقش مهمی در نفوذپذیری غشاء دارند به طوری که نفوذپذیری و کشش غشاء را به شدت تحت تأثیر قرار می دهند (Collodel et al., 2020). افزودن چربی ها به محیط رقیق کننده، انجمادپذیری، قدرت باروری و تحرک اسپرم قوچ در شرایط برون تنی را بهبود می بخشد (Badr et al., 2004). بنابراین با توجه به اینکه افزایش اکسیدان ها و کاهش تحرک اسپرم از عوامل اصلی ناباروری هستند و افزودن ترکیبات بره موم در محیط های اسپرم مایع و منجمد، می تواند از اسپرم در برابر آسیب های یخ گشایی محافظت کرده و منجر به افزایش زنده ماندن و تحرک اسپرم می شوند. 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 لانه گزینی رخ می دهد (Iv'an Y'anez-Ortiz et al., 2022). در نتیجه، اسپرم با کیفیت لازمه 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 محیط های رقیق کننده اسپرم مایع و منجمد می پردازد.

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

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 به طوری که نفوذپذیری و کشش 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 منجر به 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 (O_2) 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 (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 (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، منجر به افزایش تحرک، ریخت شناسی، یکپارچگی غشاء، یکپارچگی آکروزوم، فعالیت میتوکندری و کیفیت اسپرم گراز در طول ذخیره‌سازی مایع می‌شود در حالی که آپاتوزیس 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 مراحل که منجر به باروری می‌شوند مانند تحرک، قابلیت زنده‌مانی و بلوغ نیز دخالت دارند که ساختارهای فیزیولوژیکی غشاء دولا به 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). 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 (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 منجر به کاهش غلظت مالون دی آلدئید اسپرم قوچ، افزایش سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی 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 تأثیر عصاره اتری بره موم، بر ویژگی‌های اسپرم قوچ زل بررسی شد. تیمارهای آزمایشی شامل، غلظت‌های مختلف عصاره اتری: (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ میلی گرم در میلی لیتر) (et al., 1964) و رقیق کننده بدون عصاره به عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. عصاره اتری در محلول دی متیل سولفو کساید^۱ (DMSO) حل و به رقیق کننده اضافه شد. به همین دلیل اثر DMSO نیز به عنوان گروه شاهد بررسی شد.

1. Dimethyl sulfoxide

نمونه گیری، فرآوری منی مایع

به منظور انجام این آزمایش ۴ رأس قوچ نژاد زل (۲ الی ۳ ساله با میانگین وزن 45 ± 2 کیلوگرم) برای منی گیری به کمک واژن مصنوعی استفاده شد. نمونه های جمع آوری شده بلافاصله با فلاسک آب ۳۷ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه منتقل و در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از ارزیابی اولیه، نمونه های با جنبایی بیش از ۷۰ درصد و حجم بیش از ۰/۵ میلی لیتر، را با یکدیگر مخلوط شدند تا اثرات فردی هر دام از بین رود. رقیق سازی نمونه ها به نسبت ۱ حجم منی و ۲۰ حجم رقیق کننده انجام و ارزیابی فراسنجه های کمی اسپرم برای زمان های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت انجام شدند (Linford et al., 1976).

رقیق سازی، فرآیند یخ کشایی منی

منی مخلوط شده با رقیق کننده بر پایه تریس - زرده تخم مرغ، رقیق سازی شد (Vahedi., 2020). منی رقیق شده به داخل پایوت های ۰/۵ میلی لیتر کشیده و برای مدت ۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای رسیدن به دمای تعادل قرار گرفت. سپس پایوت ها بلافاصله در فاصله ۷ سانتی متری بخار نیتروژن مایع به مدت ۱۲ دقیقه قرار گرفت تا منجمد شوند و به داخل نیتروژن مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی گراد غوطه ور و تا زمان ذوب در این دما نگهداری شدند. بعد از ده روز ذخیره سازی، پایوت ها در حمام آب گرم ۳۷ درجه به مدت ۳۰ ثانیه ذوب شدند. منی مخلوط شده با رقیق کننده بر پایه تریس - زرده تخم مرغ، رقیق و در دمای ۴ درجه سانتی گراد ذخیره و ارزیابی فراسنجه های کمی اسپرم پیش و پس از انجماد انجام شد. pH رقیق کننده پایه روی ۷ تنظیم، سپس درون بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و در همان روز مورد استفاده قرار گرفت (Vahedi., 2020).

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

مقدار	مواد
۲۰ درصد	زرده تخم مرغ
۱/۴ گرم	اسید سیتریک
۲/۷۰ گرم	تریس
۱ گرم	فروکتور
۶/۵ درصد	گلیسرول
۱۰۰ میلی لیتر	آب دوبار تقطیر

روش جداسازی عصاره اتری از بره موم

مقدار ۵۰ گرم بره موم در ۲۰۰ سی سی 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 فالكون بچسبید. نمونه باقی مانده را با فریز درایر خشک شد (Momennejad., 2019).

ارزیابی تحرک (جنبایی) اسپرماتوزوئید

به منظور بررسی ویژگی های تحرک اسپرماتوزوئید پس از یخ کشایی در گروه های مختلف آزمایشی با میکروسکوپ معکوس فاز کنتراست (Nikon Eclipse TE 300) با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر با روش چشمی ارزیابی شدند. چهار پایوت از هر گروه آزمایشی یخ کشایی شده و به داخل لوله های 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

اسپرمتوزوئید، هشت میدان دید به صورت تصادفی گزینش و با استفاده از شیوه ارزیابی چشمی تحرک کل اسپرمتوزوئید ارزیابی شد (Bucak et al., 2009).

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرمتوزوئید

به منظور ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرمتوزوئید، از آزمون یکپارچگی غشاء^۱ (HOST) استفاده شد. آزمون یکپارچگی غشاء بر اساس اسمولاریته محیطی که اسپرمتوزوئید در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. اسپرمتوزوئید با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریته کمتر، به سرعت واکنش داد و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. بدیهی است که تنها اسپرمتوزوئیدهای با غشای پلاسمایی سالم قادر بودند به این نوع تغییر واکنش دهند و اسپرمتوزوئید که غشای پلاسمایی آن‌ها آسیب دید بودند هیچ واکنشی نشان ندادند. در واقع پس از انجام این ارزیابی، اسپرمتوزوئید با دم گره خورده (غشای سالم) و اسپرمتوزوئید که دم آن‌ها صاف است به عنوان اسپرمتوزوئید با غشای آسیب دیده در نظر گرفته شد. برای این منظور ۳۰ میکرولیتر از منی به ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هاپو اسموتیک هاست که حاوی ۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سترات سدیم، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس ۳۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد، ارزیابی و شمارش اسپرمتوزوئید با استفاده از میکروسکوپ نوری فاز کنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرمتوزوئید شمارش و درصد اسپرمتوزوئیدهای با دم گره خورده (غشای سالم) نسبت به گره نخورده (غشای آسیب دیده) محاسبه شد (Revell and Morde, 1994).

ارزیابی ناهنجاری‌های ریخت شناسی اسپرمتوزوئید

برای بررسی ریخت‌شناسی اسپرمتوزوئید از محلول هانکوک استفاده شد (Hancock., 1956). برای ارزیابی ناهنجاری‌های ریخت شناسی اسپرمتوزوئید، ۱۰ میکرولیتر 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 اسپرمتوزوئید با استفاده از میکروسکوپ نوری فاز کنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرمتوزوئید شمارش و به صورت درصد کل اسپرمتوزوئید سالم به کل اسپرمتوزوئید شمارش شده، گزارش شد (Hancock., 1956).

ارزیابی درصد زنده مانای اسپرمتوزوئید

نمونه‌های منی از نظر درصد اسپرمتوزوئید زنده و مرده با رنگ آمیزی ائوزین - نگرزین مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمون به وسیله روش رنگ آمیزی ائوزین - نگرزین 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 دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. تعداد ۲۰۰ اسپرمتوزوئید به وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر ارزیابی شد. اسپرمتوزوئیدهایی که به طور کلی یا جزئی رنگ قرمز مایل به بنفش به خود بگیرند، مرده و اسپرمتوزوئیدهایی 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 میلی گرم/میلی لیتر آب مقطر) به ۵۰۰ میکرولیتر نمونه‌ی رقیق مایع منی (۱۰۶*۵۰ اسپرمتوزوئید/میلی لیتر) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در تاریکی انکوبه شدند. سپس به مدت سه دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و پلت اسپرمتوزوئید با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات به حالت معلق درآمد. سپس با ۵ میکرو لیتر نمونه لام تهیه شد. اسپرمتوزوئید با رنگ سبز زیر میکروسکوپ فلورسنت به عنوان اسپرمتوزوئید 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، یک میلی‌لیتر BHT^۲ و دو میلی‌لیتر TCA^۳ با هم مخلوط و به داخل لوله‌های آزمایش (فالکون) ریخته و با دور ۱۲۰۰ برای مدت ۱۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول بالای لوله‌های آزمایش با یک میلی‌لیتر TBA^۴ در میکروتیوب، مخلوط شد و برای مدت ۲۰ دقیقه درون آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد 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 کاملاً تصادفی انجام شد.

مدل آماری شامل طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار :

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

➤ Y_{ij} : مقدار عددی هر مشاهده

➤ μ : میانگین مشاهده

➤ X_i : اثر تیمار i ام

➤ e_{ij} : 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.

جدول ۲. تاثیر عصاره اتری بر جنبایی (درصد) اسپرم قوچ در حالت مایع

زمان (ساعت)	شاهد	۰/۲۵ mg/mL	۰/۵ mg/mL	۱mg/mL	DMSO
۵	۷۶/۶۲ ± ۰/۹۶ ^a	۸۴/۳۹ ± ۰/۹۴ ^a	۸۳/۹۵ ± ۱/۷۹ ^a	۷۹/۱۹ ± ۳/۰۶ ^a	۸۲/۸۴ ± ۲/۶۵ ^a
۲۴	۵۴/۹۶ ± ۱/۱۶ ^b	۶۸/۵۷ ± ۳/۶۰ ^a	۶۵/۹۵ ± ۲/۸۵ ^{ab}	۵۴/۸۸ ± ۳/۷۳ ^b	۵۴/۶۱ ± ۱/۶۶ ^b
۴۸	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)

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

تحرك (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 ($p < 0.05$). درحالی که جنبایی اسپرم در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت در تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر اثر معنی‌داری ($p < 0.05$) 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 میلی گرم در میلی لیتر نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. همچنین در حالت پس از یخ‌گشایی، جنبایی اسپرم در تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر اثر معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به تیمار شاهد داشتند (جدول ۸). نتایج نشان دادند که در حالت مایع، تیمار ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر بر جنبایی اسپرم و در حالت پس از یخ‌گشایی، تیمار ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بر جنبایی اسپرم اثر افزایشی معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به سایر تیمارها داشتند.

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 ($p < 0.05$) درحالی که در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت در تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر اثر معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. نتایج نشان دادند که در زمان ۷۲ ساعت تیمار ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر بر یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم اثر افزایشی معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به سایر تیمارها داشت. همچنین در حالت پس از یخ‌گشایی، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر اثر معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به تیمار شاهد داشتند (جدول ۸).

جدول ۳. تاثیر عصاره اتری بر یکپارچگی (درصد) اسپرم قوچ در حالت مایع

غلظت تیمارها				زمان	
DMSO	۱mg/mL	۰/۵ mg/mL	۰/۲۵ mg/mL	شاهد	(ساعت)
۹۳/۲۵ ± ۱/۷۵ ^a	۹۱/۷۵ ± ۱/۹۳ ^a	۹۳/۲۵ ± ۲/۸۶ ^a	۹۲/۵ ± ۱/۷۰ ^a	۹۳/۷۵ ± ۱/۱۰ ^a	۵
۷۵ ± ۱/۷۷ ^a	۸۲ ± ۲/۱۶ ^a	۷۹/۵ ± ۱/۵۵ ^a	۷۹/۵ ± ۱/۷۰ ^a	۷۵ ± ۱/۴۷ ^a	۲۴
۴۳/۵ ± ۲/۲۱ ^b	۷۱/۷۵ ± ۱/۴۹ ^a	۷۲/۷۵ ± ۱/۴۹ ^a	۶۴/۷۵ ± ۲/۸۶ ^a	۴۵ ± ۲/۱۶ ^b	۴۸
۴۰/۲۵ ± ۱/۷۵ ^c	۶۰/۷۵ ± ۱/۷۰ ^b	۷۰/۷۵ ± ۱/۱۰ ^a	۵۹/۵ ± ۱/۸۴ ^b	۳۹/۳۷ ± ۱/۲۵ ^c	۷۲

a-b: حروف نامشابه در هر ردیف به منزله تفاوت معنی دار بین تیمارها است ($P < 0.05$). DMSO (دی متیل سولفوکساید)

ناهنجاری‌های ریخت شناسی اسپرم

باتوجه به جدول ۴، نتایج ارزیابی ناهنجاری‌های ریخت شناسی اسپرم نشان دادند که در حالت مایع، با افزودن غلظت‌های مختلف عصاره اتری در زمان پنج و ۲۴ ساعت نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p < 0.05$). درحالی که در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشتند ($p < 0.05$). در حالت پس از یخ‌گشایی، باتوجه به نتایج ریخت‌شناسی، غلظت‌های مختلف عصاره اتری نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) داشتند (جدول ۸).

جدول ۴. تاثیر عصاره اتری بر ریخت‌شناسی (درصد) 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 ± ۱/۵۸ ^a	۹۴/۲۵ ± ۱/۹۳ ^a	۹۴/۲۵ ± ۱/۷۵ ^a	۹۴ ± ۱/۲۵ ^a
۲۴	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
۴۸	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)

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 میلی گرم در میلی لیتر 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 میلی گرم در میلی لیتر اثر معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) نسبت به تیمار شاهد داشتند (جدول ۸). نتایج نشان دادند که در حالت مایع، تیمار ۰/۵ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر بر زنده‌مانی اسپرم و در حالت پس از یخ‌گشایی، تیمار ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بر زنده‌مانی اسپرم اثر افزایشی معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) نسبت به سایر تیمارها داشتند.

جدول ۵. تاثیر عصاره اتری بر زنده‌مانی (درصد) 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
۲۴	۷۰/۷۵ ± ۰/۸۵ ^b	۸۲/۲۵ ± ۲/۶۵ ^a	۷۴ ± ۲/۶۱ ^{ab}	۷۱ ± ۲/۱۶ ^b	۷۰/۲۵ ± ۰/۸۵ ^b
۴۸	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)

درصد میتوکندری‌های فعال اسپرم

باتوجه به جدول ۶، نتایج نشان دادند که درصد میتوکندری‌های فعال 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 درصد میتوکندری‌های فعال اسپرم در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر اثر معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) نسبت

به تیمار شاهد نشان دادند. همچنین مشخص شد که پس از یخ‌گشایی، تمام غلظت‌های مختلف عصاره اتری نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی داری نشان دادند ($p < 0.05$) (جدول ۸).

جدول ۶. تاثیر عصاره اتری بر فعالیت میتوکندری (درصد) اسپرم قوچ در حالت مایع

زمان (ساعت)	شاهد	۰/۲۵ mg/mL	۰/۵ mg/mL	۱mg/mL	DMSO
۵	$73/75 \pm 1/75^a$	$69/25 \pm 1/49^a$	$72/25 \pm 1/25^a$	$76/75 \pm 2/62^a$	$72 \pm 1/29^a$
۲۴	$19/25 \pm 0/85^b$	$69 \pm 3/10^a$	$71 \pm 2/08^a$	$74/5 \pm 3/40^a$	$21 \pm 1/29^b$
۴۸	$18/75 \pm 1/49^c$	$67/5 \pm 2/21^{ab}$	$61/5 \pm 2/95^b$	$71/75 \pm 2/59^a$	$20/75 \pm 1/10^c$
۷۲	$14/75 \pm 1/25^b$	$49/5 \pm 3/32^a$	$57/25 \pm 4/71^a$	$50/75 \pm 2/28^a$	$16/5 \pm 1/55^b$

a-b: حروف نامشابه در هر ردیف به منزله تفاوت معنی دار بین تیمارها است ($P < 0.05$). DMSO (دی متیل سولفوکساید)

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 ($p < 0.05$) درحالی که غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشتند ($p < 0.05$). 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 میلی گرم در میلی لیتر نسبت به تیمار شاهد اثر معنی‌داری داشتند ($p < 0.05$). همچنین در حالت پس از یخ‌گشایی، تیمار ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بر غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی، اثر افزایشی معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به سایر تیمارها داشتند.

جدول ۷. تاثیر عصاره اتری بر غلظت مالون دی آلدئید (nmol/dL) نمونه منی قوچ در حالت مایع

زمان (ساعت)	شاهد	۰/۲۵ mg/mL	۰/۵ mg/mL	۱mg/mL	DMSO
۵	$5/90 \pm 0/53^a$	$4/96 \pm 0/53^a$	$4/13 \pm 0/50^a$	$5/88 \pm 0/52^a$	$5/73 \pm 0/35^a$
۲۴	$9/12 \pm 0/24^a$	$6/03 \pm 0/70^b$	$4/90 \pm 0/55^b$	$7/13 \pm 0/57^{ab}$	$8/69 \pm 0/36^a$
۴۸	$10/75 \pm 0/36^{ab}$	$6/23 \pm 0/67^c$	$5/80 \pm 0/66^c$	$7/95 \pm 0/58^{bc}$	$9/78 \pm 0/20^{ab}$
۷۲	$11/66 \pm 0/31^a$	$7/91 \pm 0/72^b$	$7/09 \pm 0/80^b$	$9/06 \pm 0/78^{ab}$	$11/29 \pm 0/28^a$

a-b: حروف نامشابه در هر ردیف به منزله تفاوت معنی دار بین تیمارها است ($P < 0.05$). DMSO (دی متیل سولفوکساید)

جدول ۸. تاثیر عصاره اتری بر فراسنجه‌های اسپرم قوچ پس از یخ‌گشایی

فراسنجه‌های اسپرم	شاهد	۰/۲۵ mg/mL	۰/۵ mg/mL	۱mg/mL	DMSO
جنابایی (%)	$11/70 \pm 0/62^c$	$38/98 \pm 1/97^a$	$21/36 \pm 1/08^b$	$17/58 \pm 0/16^b$	$11/68 \pm 0/57^c$
یکپارچگی غشا (%)	$22 \pm 2/21^c$	$38/75 \pm 1/27^a$	$32/5 \pm 1/70^a$	$31 \pm 2/19^{ab}$	$22 \pm 2/48^c$
ریخت شناسی (%)	$52 \pm 2/16^b$	$73 \pm 1/77^a$	$69 \pm 1/47^a$	$68/25 \pm 1/37^a$	$52/5 \pm 2/39^b$
زنده مانی (%)	$23/75 \pm 1/75^c$	$46/5 \pm 1/70^a$	$34/25 \pm 1/93^b$	$29 \pm 1/29^{cb}$	$23/5 \pm 1/70^c$
فعالیت میتوکندری (%)	$18/75 \pm 1/49^b$	$31 \pm 1/29^a$	$30/5 \pm 1/70^a$	$27/5 \pm 1/55^a$	$18 \pm 1/82^b$
غلظت مالون دی آلدئید (nmol/dL)	$73/73 \pm 1/90^a$	$28/74 \pm 1/54^d$	$47/61 \pm 1/22^c$	$58/87 \pm 1/56^b$	$76/08 \pm 2/54^a$

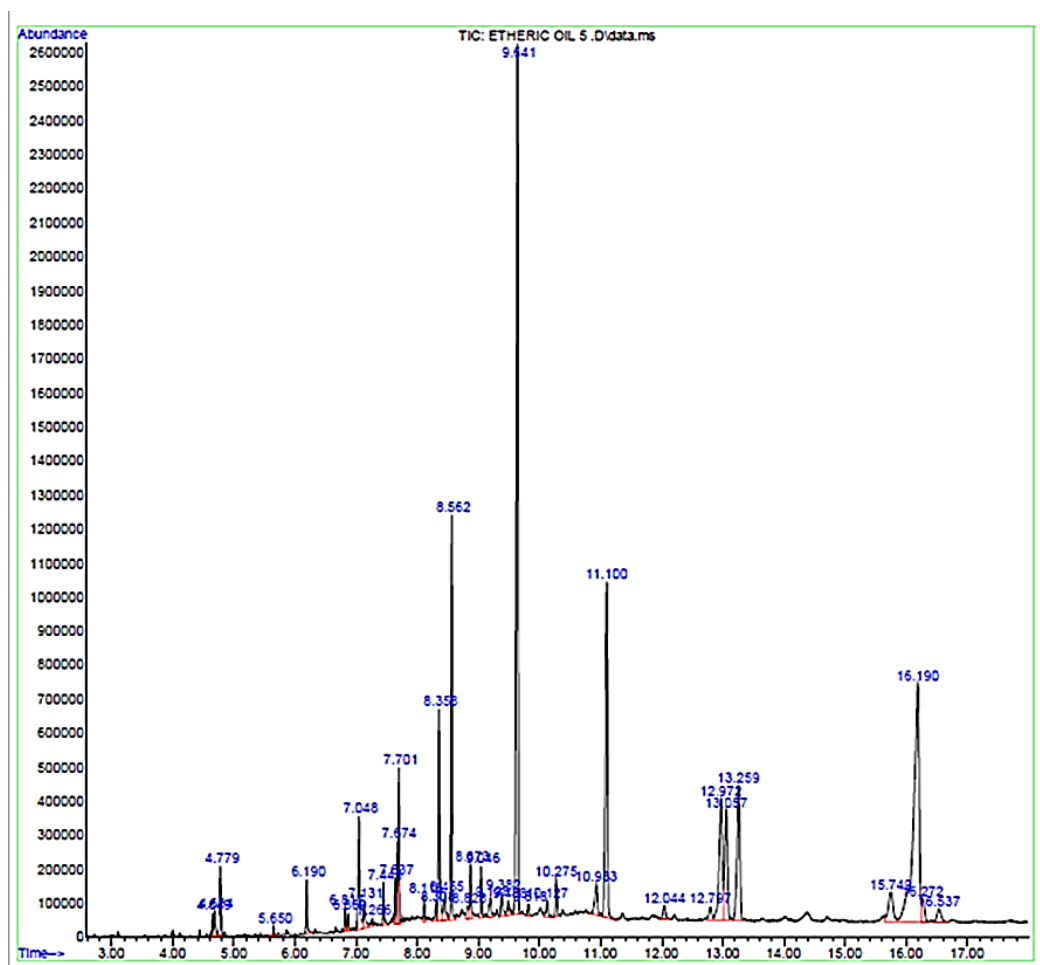
a-b: حروف نامشابه در هر ردیف به منزله تفاوت معنی دار بین تیمارها است ($P < 0.05$). DMSO (دی متیل سولفوکساید)

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 شامل ۳۴ ترکیب بود (جدول ۹).

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

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



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 *Palmitic acid*, *Oleic Acid*, *Heptacosane*, *(Z)-9-Tricosene*, *β-Eudesmol*, *2-Propen-1-one*, *4H-1-Benzopyran-4-one* بود (جدول ۹).

تاثیر عصاره اتری بره موم بر نگهداری کوتاه مدت اسپرم

نتایج این پژوهش نشان داد که در حالت مایع، تیمار ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر بر جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمای اسپرم اثر افزایشی معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به تیمار شاهد داشتند. تاثیر مثبت تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر بر ریخت‌شناسی و افزایش فعالیت میتوکندری اسپرم نیز نشان داده شد.

نتایج این پژوهش نشان دادند که، در حالت مایع تیمار ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره اتری بر جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای اسپرم اثر افزایشی معنی‌داری ($p < 0.05$) 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 چربی‌ها، تنش اکسیداتیو و تولید ROS، فرایندهای التهابی را

تعدیل می کنند و به عنوان یک جزء از غشاء، نقش مهمی در نفوذپذیری غشاء دارند به طوری که نفوذپذیری و کشش غشاء را به شدت تحت تاثیر قرار می دهند (Collodel *et al.*, 2020). ترکیبات گلیکولیپیدی در غشاء با جذب و مصرف اسیدهای چرب از رقیق کننده موجب افزایش سیالیت غشاء می شوند. همچنین منجر به افزایش انعطاف پذیری دم اسپرم که لازمه تحرک اسپرم است، می شوند. همچنین نشان داده شده است که یکی از دلایل کاهش زندهمانی اسپرم به دنبال ذخیره مایع منی، تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) است که از متابولیسم اکسیژن (O_2) تولید می شوند. اسپرم پستانداران، یک سلول فعال است که به طور خود به خود ROS تولید می کند. ROS بیش از حد که در طول ذخیره مایع منی تولید می شود، واکنش های اکسیداتیو را آغاز می کند که در نهایت منجر به مرگ سلول های اسپرم می شود. افزودن اسید اولئیک می تواند تحرک اسپرم قوچ، درصد زندهمانی اسپرم قوچ، درصد اسپرم با غشای پلاسمایی سالم، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را در شرایط ذخیره سازی مایع، افزایش دهد (Badr *et al.*, 2004) که با یافته های پژوهش کنونی هم خوانی دارد. پژوهش های پیشین نشان دادند که با افزودن دوزهای پایین اسید اولئیک، سطح آنتی اکسیدان 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، سلول های بتای پانکراس انسان، سلول های 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 شناساسی شد و نام دیگر آن β -Eudesmol می باشد، دارای فعالیت های آنتی اکسیدانی است و سلول را از آسیب های ناشی از رادیکال های آزاد حفظ می کند. این ترکیب می تواند 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 می توان وجود اسید اولئیک و β -Eudesmol دانست. یافته های ما تاثیر مثبت تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر بر ریخت شناسی 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، منجر به افزایش تحرک، ریخت شناسی، یکپارچگی غشاء، یکپارچگی آکروزوم، فعالیت میتوکندری و کیفیت اسپرم گراز در طول ذخیره سازی مایع می شود در حالی که آپاپتوزیس را کاهش می دهد (Zhu *et al.*, 2020). پژوهش های پیشین نشان دادند که چربی ها بخش عمده سلول های جانوری را در بر می گیرند و در اسپرم نه تنها منبع انرژی محسوب می شوند بلکه در تمام مراحل که منجر به باروری می شوند 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 می کند (Aksoyet *et al.*, 2006) که با نتایج پژوهش کنونی هم خوانی دارد.

تاثیر عصاره اتری بره موم بر انجماد اسپرم

باتوجه به ارزیابی فراسنجه های اسپرم پس از یخ گشایی مشخص شد که تیمار ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر نسبت به تیمار شاهد، تاثیر معنی داری ($p < 0/05$) بر جنبایی و زندهمانی اسپرم داشت. همچنین یافته ها نشان دادند که تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر اثر معنی داری ($p < 0/05$) در ریخت شناسی و افزایش فعالیت میتوکندری اسپرم داشتند. یافته های این پژوهش نشان دادند که تیمار ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر نسبت به تیمار شاهد، تاثیر معنی داری ($p < 0/05$) بر جنبایی و زندهمانی اسپرم داشت. علاوه بر اینکه اسید اولئیک منجر به بهتر شدن ویژگی های اسپرم می شود (Meizel & Turner, 1983). نشان داده شده است که اسیدهای چرب، مانند اسید اولئیک، منجر به انجام واکنش آکروزومی در اسپرم همستر در شرایط آزمایشگاهی می شود (Hossain *et al.*, 2007). اهمیت چربی ها، در غشای پلاسمایی و پلاسمای مایع منی برای عملکرد اسپرم از مدت ها قبل شناخته شده است. چربی های موجود در غشاء اسپرم با تحرک و زندهمانی اسپرم پس از یخ گشایی ارتباط مستقیم دارند. اسیدهای چرب غیراشباع در غشای سلول اسپرماتوزوئید موجب افزایش انعطاف پذیری دم اسپرماتوزوئید

شده و از پارگی غشاء و مرگ سلولی در اثر تشکیل بلورهای یخ جلوگیری می‌کند (Badr et al., 2004). افزودن چربی‌ها به محیط رقیق‌کننده، انجمادپذیری، قدرت باروری و تحرک اسپرم قوچ در شرایط برون‌تنی را بهبود می‌بخشد (Badr et al., 2004). افزودن اسید اولئیک به منی گاو، با افزایش نرخ آبستنی در گاو همراه است (Pickett et al., 1976). 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. پژوهش‌های پیشین نشان دادند که افزودن اسید اولئیک منجر به کاهش (ROS) و افزایش کیفیت منی قوچ پس از یخ‌گشایی می‌شود (Soltani, 2023). همچنین β -Eudesmol و 2-Propen-1-one نیز دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی اند که سلول را از آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد حفظ و منجر به افزایش درصد جنبایی و زنده‌مانی در اسپرم می‌شوند (Jasim et al., 2021 ; Azevedo, 2018). بنابراین تاثیر عصاره 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 میلی گرم در میلی لیتر اثر معنی داری ($p < 0/05$) در ریخت‌شناسی و افزایش فعالیت میتوکندری اسپرم داشتند. اسیدهای چرب به‌وسیله اکسیداسیون میتوکندری در قسمت میانی اسپرم، متابولیز می‌شوند. افزودن اسید اولئیک و اسید پالمیتیک منجر به افزایش میزان گلوکز اسپرم، فعالیت میتوکندریایی و همچنین تولید ATP می‌شوند. در نتیجه از اسید اولئیک و اسید پالمیتیک برای تولید ATP از راه اکسیداسیون در میتوکندری استفاده که منجر به 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 حفظ ساختار میتوکندریایی منجر به حفظ جنبایی اسپرم قوچ می‌شود. همچنین پس از یخ‌گشایی منجر به حفظ یکپارچگی DNA و افزایش زنده‌مانی 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 ($p < 0/05$) و در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین تاثیر و تیمار ۱ میلی گرم در میلی لیتر 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 میلی گرم در میلی لیتر نسبت به تیمار شاهد اثر معنی‌داری نداشتند ($p < 0/05$) و تیمار ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بر غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی، اثر افزایشی معنی‌داری ($p < 0/05$) نسبت به سایر تیمارها داشت. در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و در حالت مایع، تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین اثر و تیمار ۱ میلی گرم در میلی لیتر کمترین اثر در غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی را نسبت به تیمار شاهد داشتند. یافته‌های پژوهش‌های پیشین نشان دادند که اسید اولئیک منجر به کاهش غلظت مالون دی آلدئید اسپرم قوچ، افزایش سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی 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 منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) و افزایش آنتی‌اکسیدان در پلاسما 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 میلی گرم در میلی لیتر نسبت به تیمار شاهد اثر معنی‌داری نداشتند ($p < 0/05$) و تیمار ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بر غلظت مالون دی آلدئید نمونه منی، اثر افزایشی معنی‌داری ($p < 0/05$) نسبت به سایر تیمارها داشت. یافته‌های پیشین نشان دادند که افزودن اسید اولئیک به رقیق‌کننده منی منجر به 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، می‌توان 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 منجر به 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). 9-Tricosene (Z) از جمله 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 گروه‌های استوکسی یا ترپن‌ها مشتق شده اند و دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می‌باشند (Wicker-Thomas, 2007). 2-Propen-1-one (Chalcones) ترکیبات آغازگر بیوستز 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، منجر به 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. احتمالاً علت روند کاهشی غلظت زیاد عصاره اتری بره موم (۱ میلی گرم در میلی لیتر) را می‌توان به مقدار زیاد اسیدهای چرب و ترکیبات آنتی اکسیدانی نسبت داد که خود منجر به تولید اکسیدان‌ها می‌شوند.

نتیجه‌گیری

بنابراین نتایج پژوهش حاضر نشان داد، افزودن عصاره اتری منجر به افزایش جنمایی، 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

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

واحدی، وحید. (۱۳۹۹). بررسی اثرات عصاره گیاه شاه اسپرم بر برخی از فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ مغانی پس از انجماد و یخ‌گشایی. *پژوهشهای علوم دامی (دانش کشاورزی)*، ۳۰ (۴)، ۷۱-۸۲.

REFERENCES

- Azevedo, D. C. (2018). Eudesmol and its derivatives as potent antioxidants: a combined experimental and theoretical study. *Journal of Molecular Structure*, 1164: 449-456.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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).
- 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.
- 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.
- 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.
- Evans, G., & Maxwell, W. C. (1987). Salamons' artificial insemination of sheep and goats (No. Ed. 2), *Butterworths*.
- 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.
- 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.
- Hancock, J. (1956). The morphology of boar spermatozoa. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 76: 84-97.
- 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.
- 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.
- 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.
- Johnson LV, M.L. & Walsh, L.B. Chen. (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:990.
- 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.
- 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*.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Martínez, F., Cano, R., Blas, I. de & Espinosa, E. (2010). Antioxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*, 61: 142-147.
- 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.
- 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 .

(inPersian)

- 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.
- 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.
- Revell, S.G. & Mrode, R.A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36: 77–86.
- Soltani, L. (2023). Role of Oleic Acid and Trehalose on Frozen-Thawed Ram Semen. *Cryoletters*, 44(6): 343-351.
- 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.
- Veerkamp, R.F. & Beerda, B. (2007). Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology*, 68: 266–273.
- 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.
- 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)
- Wicker-Thomas, C. (2007). Pheromonal communication involved in courtship behavior in Diptera. *Journal of Insect Physiology*, 53(11): 1089-1100.
- 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.
- 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.