The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http:// ijas.ut.ac.ir/

Impact of Methanolic Bee Pollen Extract on Ram Sperm Quality in Short- and Long-Term Storage

Hedie Parsamehr[1], Hamid Deldar[2]✉, Zarbakht Ansari Pirsaraie[3] and Essa Dirandeh[4]

1. Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Email: Parsahedie37@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran. 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: dirandeh@gmail.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 10 May 2025

Received in revised form:

26 August 2025

Accepted: 10 September 2025

Published online: Spring 2026

Keywords:

Bee pollen, Cryopreservation, Flavonoids, Oxidative stress, Ram sperm.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of supplementing a Tris–egg yolk-based extender with methanolic bee pollen extract on the sperm quality of Zel rams during short-term storage and after cryopreservation. Semen was collected twice a week from four mature Zel rams using an artificial vagina. After initial evaluation, qualified ejaculates were pooled to eliminate individual variation. Samples were diluted with extenders containing 0 (control), 5, 10, and 15 mg/mL of methanolic bee pollen extract. Additionally, 0.1 mM vitamin E was used as a positive control, and 5 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added as the solvent for the extract, whose effect was also evaluated. Short-term storage was carried out at 4°C for 5, 24, 48, and 72 hours. Cryopreserved samples were assessed 14 days after storage in liquid nitrogen. Sperm parameters were evaluated, including motility, viability, plasma membrane integrity, mitochondrial activity, morphological abnormalities, and lipid peroxidation (MDA levels). Results showed that supplementation with bee pollen extract significantly ($P<0.05$) improved all evaluated parameters compared to the control. The 5 mg/mL treatment yielded the best outcomes during short-term storage, while 15 mg/mL was most effective after thawing. Moreover, the 5 mg/mL concentration was superior in reducing oxidative stress by lowering MDA levels. These findings suggest that adding 5 mg/mL methanolic bee pollen extract to the extender improves ram sperm quality and may be an effective strategy for semen preservation.

Cite this article: Parsamehr, H., Deldar, H., Ansari irsaraie, Z. & Dirandeh, E. (2026). Impact of Methanolic Bee Pollen Extract on Ram Sperm Quality in Short- and Long-Term Storage. *Iranian Journal of Animal Science*, 57 **(1),** 59-77. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2025.394211.654072

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2025.394211.654072

Extended Abstract

Introduction

Honey bees play an important role in meeting the needs of human societies. Their primary role is pollination, and their products, such as honey, pollen, royal jelly and wax, are also important. However, the evolution of human societies, the destruction of natural habitats, and some management problems have caused the population of this insect to decrease. One of these management issues is an increase in homozygosity of sexual alleles, which has led to a reduction in the number of sexual alleles and an increase in homozygosity, as well as its associated effects and consequences, including reduced adaptation power, decreased fertility and reduced production. The purpose of this study is therefore to investigate the level of homozygosity in bee colonies in areas with a high density of beekeepers in Sistan and Baluchistan province, and its impact on honey production.

Materials and methods

The study was conducted at the level of apiaries in the cities with the highest concentration of honey bee breeding in the Sistan and Baluchistan provinces (Delgan, Khash, Taftan and Iran-shahr) during the spring and summer of 2024. Two hundred hives from four cities (Delgan, Khash, Taftan and Iran-shahr), five apiaries from each region, ten hives from each apiary and three hives from each hive were randomly selected and subjected to field studies. For this purpose, brown-colored healthy pomace was given to each of the studied colonies. Three days later, the state of queen spawning was evaluated, and the desired queens were coded once it was confirmed that the queen had spawned. Twelve days after the queen hatched, the combs in question were removed from the hive. Evaluation of the empty cells was performed using a template in six areas of each comb (three from each side), and the number of empty cells was counted and recorded. 300 cells from each side were examined, making a total of 600 cells from each comb and 1,800 cells from each hive. The homozygosity of sex alleles was calculated using Ruttner's (1988) and Page and Laidlow's (1985) instructions. To count the empty cells in each hive, three frames containing closed-headed babies (pupae) were removed and the number of empty cells among the full cells was counted by placing a template in the pupal area. The average number of empty cells indicates the average homozygosity of each sex allele. The ratio 100/s-100 was used to estimate the number of homozygous sex alleles, where s is the average percentage of vitality of babies due to the action of the homozygosity of sex alleles. During the next stage of the honey harvesting season, the weight of the harvested honey was calculated and recorded based on the difference in weight of each hive before and after honey extraction. Finally, after taking the measurements, the data were analyzed using a nested design in SAS software version 9.4. To check the effect of the homozygosity coefficient on honey yield, regression analysis was used. In this model, honey production was considered the dependent variable and the homozygosity percentage the auxiliary variable.

Results

In apiaries across the province, the average homozygosity and number of homozygous alleles were 3.46% and 32.81, respectively, while honey production was 10.75 kg. While the percentage of homozygosity in different cities within the province did not differ significantly ($P>0.05$), significant differences were observed within each city's departments ($P<0.05$). The range of changes in the homozygosity coefficient in different cities was between 3.31% and 3.57%, indicating a low homozygosity percentage. The average honey production per hive in the cities of the province was between 9.56 and 12.07 kg, showing a statistically significant difference ($P < 0.05$). Due to the low homozygosity percentage, it is expected that the number of sexual alleles will be high. The average number of alleles in different cities was between 31.32 and 35.8, with the highest number belonging to Taftan city, which showed the lowest homozygosity coefficient. The variation in the coefficient of hemozygosity in different parts of each city was greater, ranging from 2.06% to 5.08%. Average honey production ranged from 6.13 to 18.79 kg, indicating a wide variation in production across the province. The variation in the number of alleles was also significant, ranging from 20.39 to 50.2. The highest number of alleles was found in different parts of Taftan city, which had the lowest coefficient of homozygosity and the highest average honey production. Correlation analysis showed no significant correlation between honey production performance and percentage of homozygosity ($P<0.05$).

Conclusions

In the present study, the correlation between the percentage of homozygosity and the honey production trait was insignificant. Therefore, the adverse effects of homozygosity on honey bee performance and reduction in colony population size were not observed, thus indicating the favorable state of beekeeping and high diversity in honey bee colonies in the Sistan and Baluchistan province, and enabling breeding programs by selecting for the production of queens with high performance and other desirable traits.

Key words: Complementary Sex Determiner gene, Honey production, Honey bee, Homozygosity of sexual alleles, Sistan and Baluchistan

Author Contributions

Methodology, Z. M., G. R. D. and K. S.; software, G. R. D. and Z. M.; formal analysis, G. R. D. and Z. M.; writing—original draft preparation, Z. M., G. R. D., K. S. and M. R.; writing—review and editing, Z. M., G. R. D., K. S. and M. R.; supervision, G. R. D., K. S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

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

Ethical consideration

The study was approved by the Ethics Committee of the University of Zabol (Ethical cod: IR-UOZ-4398). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

انتشارات دانشگاه تهران

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۷، شماره ۱

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

تأثیر عصاره متانولی گرده زنبورعسل بر کیفیت اسپرم قوچ طی نگهداری کوتاه‌مدت و بلندمدت

هدیه پارسامهر [۱] | حمید دلدار [۲]✉ | زربخت انصاری پیرسرائی [۳] | عیسی دیرنده [۴]

۱. گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: Parsahedie37@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران وگروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، 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: dirandeh@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۶/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۱۹

تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۵

کلیدواژه‌ها:

اسپرم قوچ، انجماد، تنش اکسیداتیو، فلاونوئیدها، گرده زنبورعسل.

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی اثر افزودن عصاره متانولی گرده زنبورعسل به رقیق‌کننده تریس–زرده تخم‌مرغ بر کیفیت اسپرم قوچ‌های نژاد زل در شرایط نگهداری کوتاه‌مدت و پس از انجماد انجام شد. اسپرم‌گیری دو بار در هفته از چهار قوچ بالغ نژاد زل با استفاده از واژن مصنوعی صورت گرفت. پس از ارزیابی اولیه، انزال‌های واجد شرایط برای حذف تأثیرات فردی با هم مخلوط شدند. نمونه‌ها با رقیق‌کننده‌هایی حاوی صفر (گروه شاهد)، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی گرده زنبورعسل رقیق شدند. همچنین، ویتامین E با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار به‌عنوان کنترل مثبت و ۵ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان حلال عصاره استفاده شد که اثر آن نیز به‌صورت جداگانه بررسی گردید. نگهداری کوتاه‌مدت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. نمونه‌های منجمد شده نیز ۱۴ روز پس از نگهداری در ازت مایع مورد ارزیابی قرار گرفتند. فراسنجه‌های جنبایی، زنده‌مانی، فعالیت غشای پلاسمایی، فعالیت میتوکندری، ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی و پراکسیداسیون لیپیدی غلظت (MDA) اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که افزودن عصاره گرده زنبورعسل به‌طور معناداری ($P<0/05$) شاخص‌های ارزیابی‌شده را نسبت به گروه شاهد بهبود بخشید. تیمار ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بهترین نتایج را در نگهداری کوتاه‌مدت و تیمار ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین تأثیر را پس از یخ‌گشایی نشان داد. همچنین، غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در کاهش تنش اکسیداتیو از طریق کاهش سطح MDA مؤثرتر بود. بر اساس نتایج، استفاده از ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی گرده زنبورعسل در رقیق‌کننده منی به‌عنوان راهکاری مؤثر برای بهبود کیفیت اسپرم قوچ پیشنهاد می‌شود.

استناد: پارسامهر، هدیه؛ دلدار، حمید، دلدار؛ انصاری پیرسرائی، زربخت و دیرنده، عیسی (۱۴۰۵). تأثیر عصاره متانولی گرده زنبورعسل بر کیفیت اسپرم قوچ طی نگهداری کوتاه‌مدت و بلندمدت. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۷ (۱)، ۷۷-۵۹. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2025.394211.654072

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2025.394211.654072

مقدمه

دسترسی به اسپرم بارور، یکی از عوامل تعیین‌کننده در ارتقاء کارایی و موفقیت تلقیح مصنوعی به‌شمار می‌رود (Watson, 2000). مهم‌ترین چالش در فرایند ذخیره‌سازی اسپرم، مهار فعالیت متابولیکی آن است که این هدف از طریق کاهش تدریجی دما در دو مرحله‌ی سردسازی و انجماد محقق می‌شود (Salamon & Maxwell, 1995). اسپرم قوچ به‌دلیل ویژگی‌های خاص ساختاری غشای پلاسمایی خود، که حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع (PUFA[1]) و نسبت پایینی از کلسترول به فسفولیپید است، در مقایسه با اسپرم سایر گونه‌ها، حساسیت بیشتری نسبت به کاهش دما نشان می‌دهد و مستعد آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو می‌باشد (Salamon & Maxwell, 1995). شوک سرمایی با ایجاد تغییرات ساختاری در غشای پلاسمایی، آکروزوم و میتوکندری اسپرم، می‌تواند منجر به کاهش طول عمر و قابلیت باروری آن گردد (Watson, 1995). اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در مایع منی طی دوره‌ی نگهداری دچار اکسیداسیون می‌شوند و با تسریع فرایند پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب‌های اکسیداتیو را افزایش می‌دهند (Sinha *et al*., 1996). علی‌رغم وجود مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های اسپرم، شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (Henkel, 2011)، به‌دلیل ساختار ویژه این سلول‌ها و همچنین فرایندهای بلوغ، رقیق‌سازی و نگهداری، ذخایر آنتی‌اکسیدانی موجود در پلاسمای منی کاهش می‌یابد و توان محافظت کامل از سلول اسپرم را از دست می‌دهد (Amidi *et al*., 2016). آسیب‌های ناشی از شوک سرمایی تا حدودی از طریق استفاده از مواد محافظ سرما و افزودنی‌های دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی در رقیق‌کننده‌های منی کاهش می‌یابد (Allai *et al*., 2018). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که مکمل‌سازی محیط انجمادی با آنتی‌اکسیدان‌های خارجی می‌تواند به بهینه‌سازی فرایند انجماد و افزایش بقای اسپرم کمک کند (Agarwal *et al*., 2014).

در این راستا، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌ویژه منابع گیاهی، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است (Yanishlieva & Marinova, 1996). گرده زنبورعسل یکی از مواد طبیعی بسیار مغذی است که دارای ترکیب‌های زیستی ارزشمندی از جمله فنل‌ها و فلاونوئیدها است (Haydak, 1970). خواص ضدمیکروبی، ضدقارچی، ضدجهش‌زایی، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی گرده زنبورعسل در مطالعات متعددی مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است (Rodríguez-Pólit et al., 2023). همچنین، فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی آن به محتوای بالای ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدی نسبت داده شده است (Leja *et al*., 2007; Xu *et al*., 2009). ازاین‌رو، به نظر می‌رسد که ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدهای موجود در گرده زنبورعسل می‌تواند در بهبود کیفیت اسپرم قوچ در طی دوره‌های مختلف نگهداری مؤثر باشد.

هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل در محیط رقیق‌کننده اسپرم بر حفظ فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ زل طی ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت (در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) و پس از انجماد–یخ‌گشایی (در دمای ۱۹۶– درجه سانتی‌گراد در نیتروژن مایع) است.

پیشینه پژوهش

سلول اسپرم، همانند دیگر سلول‌هایی که در شرایط هوازی زیست می‌کنند، برای زنده‌مانی و ادامه فعالیت خود به اکسیژن نیاز دارد. با این‌حال، فراورده‌های حاصل از مصرف اکسیژن، به‌ویژه گونه‌های فعال اکسیژن، می‌توانند برای سلول زیان‌آور باشند. بنابراین، این ترکیب‌های ناپایدار باید به‌صورت پیوسته و مؤثر توسط سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی خنثی شوند تا تنها مقدار اندکی از آن‌ها که برای کارکرد طبیعی سلول ضروری است، در محیط باقی بماند (Fry & Peterson, 2001). افزایش بیش‌ازحد گونه‌های فعال اکسیژن در اسپرم، به‌ویژه در زمان نگهداری در دمای پایین، می‌تواند به آسیب‌های جدی ساختاری و کارکردی منجر شود. از این‌رو، پژوهش‌هایی بر افزودن پآنتی‌اگسیدان‌ها به محلول‌های رقیق‌کننده منی متمرکز شده‌اند تا با کاهش انباشت گونه‌های فعال اکسیژن، بتوانند تحرک اسپرم و توانایی آن در لقاح را بهبود بخشند (Maxwell & Salamon, 1993). امروزه ترکیب‌های طبیعی آنتی‌اکسیدان به‌عنوان جایگزینی چندمنظوره برای ترکیب‌های شیمیایی و ساخته‌شده در آزمایشگاه در نظر گرفته می‌شوند (Wang *et al*., 2008). یکی از منابع طبیعی مهم در این زمینه، گرده زنبورعسل است که به‌دلیل دارا بودن انواع ترکیب‌های زیست‌فعال، از جمله فنول‌ها، فلاونوئیدها و اسیدهای چرب، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. برای نمونه،

1. Polyunsaturated fatty acids

در مطالعه‌ای روی پرندگان، افزودن ۲۰ و ۳۰ گرم گرده زنبورعسل به جیره غذایی بلدرچین‌های نر با تراکم ۲۱ قطعه در هر مترمربع، موجب افزایش سطح تستوسترون و بهبود شاخص‌های تولیدمثلی از جمله وزن بدن، زنده‌مانی اسپرم و کاهش آثار منفی تراکم بالا شد. این نتایج نشان‌دهنده تأثیر ترکیبات زیست‌فعال گرده بر عملکرد تولیدمثل در گونه‌های نر است (Yonis & Hassan, 2023).

ترکیب‌های فنولیک و فلاونوئیدها، از طریق گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل خود، با یون‌های فلزی ناپایدار مانند آهن و مس پیوند برقرار کرده و با تشکیل ساختارهای پایدار، از ادامه تولید گونه‌های فعال اکسیژن جلوگیری می‌کنند (Wojdyło *et al*., 2007). گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار فلاونوئیدها، قادرند به‌عنوان دهنده پیوند هیدروژنی عمل کرده و با مولکول‌های گوناگون پیوند برقرار کنند (Chen *et al*., 2012). افزون بر این، فلاونوئیدها با افزایش کارایی اندامک‌های تولیدکننده انرژی مانند میتوکندری، فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تحریک سنتز پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانی و ساختاری مؤثر بر پایداری غشای اسپرم، نقش مؤثری در بهبود کیفیت اسپرم ایفا می‌کنند (Mohammad *et al*., 2020). برخی از آن‌ها حتی در تنظیم غلظت یون‌های کلیدی مؤثر بر پایداری اسپرم در زمان نگهداری و یخ‌گشایی نقش دارند (Shahin *et al*., 2020).

در آنالیز GC-MS عصاره گرده زنبورعسل مورد استفاده در این مطالعه، حضور انواع اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، از جمله اسید پالمیتیک، تأیید شد. این ترکیبات به‌عنوان اجزای ساختاری غشای پلاسمایی اسپرم شناخته می‌شوند و در حفظ سیالیت غشا، پایداری ساختاری و تحمل اسپرم در برابر تنش‌های دمایی نقش دارند (Silva & Gadella, 2006). اسیدهای چرب همچنین با شرکت در فرایندهای زیستی تأمین انرژی، نقش کلیدی در تحرک و زنده‌مانی اسپرم دارند (Aksoy *et a*l., 2006, Rafeie et al., 2023). از میان این اسیدها، اسید پالمتیک به‌عنوان یکی از اسیدهای چرب اصلی در اسپرم، با شمار کل اسپرم رابطه‌ای مستقیم دارد (Lenzi *et al*., 2000).

از جمله اسیدهای چرب شناسایی‌شده در گرده، اسیدهای امگا–۳ نظیر آلفالینولنیک اسید هستند که پژوهش‌ها اثر آن‌ها را در بهبود ویژگی‌های غشایی اسپرم و افزایش مقاومت آن در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد نشان داده‌اند (Gholami *et al*., 2011). این ترکیبات با کاهش تنش اکسیداتیو و حفظ یکپارچگی غشا می‌توانند بخشی از اثر محافظتی عصاره گرده را در شرایط یخ‌زدایی توجیه کنند (Moallem *et al*., 2015;İstifli *et al*., 2019). اسید سینامیک و مشتقات آن نیز از ترکیبات فنولی موجود در گرده زنبورعسل هستند که نقش آنتی‌اکسیدانی آن‌ها گزارش شده است. این ترکیبات می‌توانند با مهار رادیکال‌های آزاد و تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محیط اسپرم، از آسیب‌های اکسیداتیو به غشا و DNA جلوگیری کرده و در حفظ کیفیت اسپرم مؤثر باشند (Das *et al*., 2019; Leja *et al*., 2007).

روش‌شناسی پژوهش

این پژوهش از مهر تا پایان بهمن سال 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 متانولی گرده زنبورعسل، بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ مورد ارزیابی قرار گرفت.

تهیه عصاره متانولی گرده زنبورعسل

گرده زنبورعسل از زنبورداری واقع در شهرستان آمل تهیه شد. مقدار ۱۰ گرم گرده زنبورعسل را در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ۱۰۰ درصد ریخته و به مدت ۴ روز روی شیکر قرار داده و پس از سانتریفیوژ و عبور ازکاغذ صافی، نمونه باقی‌مانده با فریز درایر خشک شد (Mohdaly *et al*., 2015).

اندازه‌گیری فلاونوئید کل عصاره متانولی گرده زنبورعسل

محتوای فلاونوئیدی کل با استفاده از کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شد. به نیم میلی‌لیتر از عصاره فریز درایر شده، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آلومینیوم کلراید۱۰درصد در اتانول، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب محلول نیم ساعت پس از نگهداری در تاریکی با دستگاه طیف‌سنج نوری در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل نمونه شاهد (بلانک) خوانده شد (Chang *et al*., 2002).

تهیه نمونه منی، فراوری منی و یخ‌گشایی

نمونه منی از ۴ رأس قوچ بالغ زل (۲ الی ۳ ساله با میانگین وزن ۲ ± ۴۵ کیلوگرم)، هفته‌ای دو بار به مدت هشت هفته و با استفاده از واژن مصنوعی در فصل تولیدمثلی جمع‌آوری شد. پس از ارزیابی اولیه (رنگ، بو، عدم آلودگی، غلظت بیش از نیم میلی‌لیتر و تحرک بیش از ۷۰ درصد)، نمونه‌های قابل‌قبول برای ازبین‌بردن آثار فردی هر دام با هم مخلوط شدند. برای نگهداری کوتاه‌مدت با نسبت ۱ حجم منی به ۱۹ حجم رقیق‌کننده، رقیق‌سازی انجام شد (Linford et al., 1976).

جهت رقیق‌سازی از یک محیط بافری حاوی ۲/۷۰ گرم تریس (Merck, 108382)، ۱/۴ گرم اسیدسیتریک (Sigma, 251275)، یک گرم فروکتوز (Sigma, F3510)، ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین و ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر (آب استریله) استفاده شد. برای آماده‌سازی رقیق‌کننده انجمادی، به محیط رقیق‌کننده پایه مورد استفاده در مرحله نگهداری مایع، ۶٫۵ میلی‌لیتر گلیسرول (Merck, Z7114691) افزوده شد تا غلظت نهایی آن به ۶٫۵ درصد حجمی برسد و pH محیط پایه در ۷/۲ تنظیم شد (Evans & Mawvell, 1987).

پس از رقیق‌سازی تیمارهای آزمایشی شامل غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل (صفر، ۵، ۱۰و ۱۵)، ۰/۱ میلی‌مولار ویتامین E به‌عنوان گروه کنترل مثبت و ۵ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان حلال عصاره متانولی نیز به رقیق‌کننده افزوده شد. نمونه‌های رقیق‌شده برای ارزیابی ۵، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در یخچال قرار گرفتند. به‌منظور انجماد، نمونه‌های مخلوط‌شده به ۶ قسمت مساوی تقسیم و سپس رقیق‌سازی شدند تا غلظت نهایی اسپرم در هر میلی‌لیتر برابر با $\times$ ۱۰۰ $۱۰^{۴}$به‌دست آید. برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. پایوت‌های انجمادی یک میلی‌لیتری حاوی نمونه‌های رقیق‌شده به مدت ۵ ساعت در ظرف آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یخچال قرار گرفتند. پس از سردسازی، پایوت‌ها به مدت ۷ دقیقه در فاصله ۵ سانتی‌متری از سطح ازت مایع بخار داده شدند تا فرایند انجماد به‌طور کامل انجام گیرد. در نهایت، پایوت‌ها در گوبلت‌های علامت‌گذاری‌شده به تانک ازت مایع با دمای ۱۹۶– درجه سانتی‌گراد منتقل و تا زمان ارزیابی در این دما نگهداری شدند. پس از خارج‌کردن پایوت‌ها از ازت مایع، در حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفتند تا فرایند یخ‌گشایی صورت گیرد. پایوت‌ها بعد از یخ‌گشایی با دستمال‌کاغذی خشک و سپس، انتهایی را که با خمیر هماتوکریت مسدود بود با قیچی بریده و بر اساس تیمارهای مشخص شده نمونه‌ها درون میکروتیوب‌های ۱/۵میلی‌لیتری تخلیه شدند (Nemati *et al.*, 2022). جهت تطابق‌پذیری و بازگشت آب درون‌سلولی به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد ماندند.

فراسنجه‌های مورد ارزیابی

جنبایی اسپرم

به‌منظور ارزیابی جنبایی اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی در گروه‌های مختلف آزمایشی، از میکروسکوپ معکوس فازکنتراست (Nikon Eclipse TE 300) با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر استفاده شد. بررسی جنبایی به‌صورت چشمی و در هشت میدان دید تصادفی انجام گرفت؛ این میدان‌ها از نواحی مختلف چمبر میکروسکوپی انتخاب شدند تا ارزیابی از نقاط پراکنده نمونه انجام شود (Bucak *et al.*, 2008).

زنده‌مانی اسپرم

برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده و مرده، از رنگ‌آمیزی ائوزین (E4009, Sigma) و نیگروزین (N4763, Sigma) استفاده شد. به‌منظور شمارش، ۲۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری در بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر بررسی شدند. اسپرم‌هایی که به‌صورت کامل یا جزئی رنگ قرمز مایل به بنفش داشتند مرده و اسپرم‌های بی‌رنگ، زنده در نظر گرفته شدند (Evans & Maxwell, 1987).

1. Dimethyl solfoxide

سلامت غشای پلاسمایی اسپرم

جهت ارزیابی سلامت غشای پلاسمایی، آزمون یکپارچگی غشاء (HOST) با استفاده از محلول هایپواسموتیک انجام شد. شمارش اسپرم‌ها با میکروسکوپ نوری فازکنتراست در بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر صورت گرفت. در هر لام، حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای دم پیچ‌خورده (نشانه غشای سالم) نسبت به سایر اسپرم‌ها محاسبه شد (Revell & Mrode, 1994).

ریخت‌شناسی اسپرم

برای ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم، از محلول هانکوک استفاده شد (Hancock, 1952). ارزیابی و شمارش اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و نسبت اسپرم غیرطبیعی (سر جدا شده، نقص‌های دم و بخش میانی) به کل اسپرم شمارش‌شده و به‌صورت درصد اسپرم سالم گزارش شد.

فعالیت میتوکندری اسپرم

ارزیابی فعالیت میتوکندری با استفاده از رنگ فلورسنت رودامین ۱۲۳ انجام شد. به ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه رقیق‌شده منی، ۱۰ میکرولیتر رودامین ۱۲۳ (۰،۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب مقطر) افزوده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه و سپس به‌مدت ۳ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پلت به‌دست‌آمده با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS[2]) مجدداً معلق شد. اسپرم‌هایی که زیر میکروسکوپ فلورسنت رنگ سبز ساطع می‌کردند، دارای میتوکندری فعال در نظر گرفته شدند (Johnson *et al*., 1980).

پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم

اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA[3]) با تیوباربیوتوریک اسید (TBA[4]) رایج‌ترین روش بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها در اسپرم است. بدین منظور در این تست یک میلی‌لیتر از هر نمونه منی ($۱۰^۴ \times ۱۰۰$ سلول اسپرم)، یک میلی‌لیتر EDTA، یک میلی‌لیتر BHT[5] و دو میلی‌لیتر TCA[6] با هم مخلوط شدند و با دور ۱۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس یک میلی‌لیتر از مایع رویی با یک میلی‌لیتر TBA ترکیب و به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از ۳۰ دقیقه خنک‌سازی، جذب نوری در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت MDA با استفاده از منحنی استاندارد و معادله رگرسیونی، به‌صورت نانومول در میلی‌لیتر محاسبه شد (Esterbauer & Cheeseman, 1990).

روش آماری

نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از طرح کامل تصادفی و از طریق رویه GLM در نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. میانگین‌ها به‌صورت میانگین حداقل مربعات (LSMeans) گزارش شدند و مقایسه آن‌ها با آزمون چنددامنه‌ای توکی انجام گرفت. سطح معنی‌داری آماری ۰،۰۵ ($P<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

برای داده هایی که اثر زمان اهمیت پیدا می کرد از مدل ریاضی زیر استفاده شد.

مدل آماری برای طرح کرت‌های (اندازه‌های) خرد شده در زمان در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + Ea_{ik} + B_j + AB_{ij} + EB_{ijk}$$

Y_{ijk} = مشاهده‌ی تیمار i اُم و زمان اندازه‌گیری j اُم در تکرار k اُم، μ = میانگین کُلی مشاهدات، A_i = اثر تیمار i اُم، Ea_{ik} = خطای اصلی، B_j = اثر زمان اندازه‌گیری j اُم، AB_{ij} = اثر متقابل تیمار i اُم و زمان اندازه‌گیری j اُم، EB_{ijk} = خطای فرعی

برای سایر داده ها از مدل ریاضی زیر استفاده شد.

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

1. Hypo-Osmotic Swelling Test
2. Phosphate buffered saline
3. Malondialdehyde
4. Thiobarbituric acid
5. Butylated Hydroxytoluene
6. Trichloroacetic Acid

Y_{ij}: مقدار عددی هر مشاهده، μ : میانگین مشاهده ، x_i :اثر تیمار i ام، e_{ij} : اثر عوامل باقی‌مانده

یافته‌های پژوهش

یافته‌های پژوهش در حالت مایع و پس از انجماد- یخ‌گشایی در جدول‌های ۱تا ۶ نشان داده شدند.

جنبایی اسپرم

نتایج اثر استفاده از غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل بر فراسنجه‌های اسپرم قوچ در جدول ۱ آمده است. در زمان ۵ ساعت، درصد زنده‌مانی در تیمارهای ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت (P<۰/۰۵). بیشترین درصد جنبایی بین تیمارهای عصاره متانولی گرده در زمان‌های ۵، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مربوط به تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. تیمار ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۲۴ درصد جنبایی کمتری نشان داد. تیمار ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، در زمان ۵، ۴۸ و ۷۲ ساعت کمترین درصد جنبایی را بین تیمارهای عصاره متانولی گرده داشت. غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی گرده زنبورعسل در زمان ۴۸ ساعت با ویتامین E تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). بین چهار زمان مختلف نگهداری منی در یخچال اختلاف آماری وجود داشت و همچنین اثر متقابل تیمار و زمان هم از نظر آماری اختلاف معنی دار داشت (P<۰/۰۰۱).

جدول ۱. اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل بر جنبایی اسپرم قوچ پس از سردسازی

زمان	غلظت تیمارها						
(ساعت)	شاهد	۵mg/ml	۱۰mg/ml	۱۵ mg/ml	ویتامین E	DMSO	P-value
۵	۸۰/۶۱A ± ۲/۰۱	۷۹/۶۸A ± ۰/۸۴	۷۹/۶۶A ± ۲/۵۰	۷۷/۳۷A ± ۲/۳۰	۸۳/۲۳A ± ۱/۷۶	۸۲/۸۴A ± ۲/۶۵	۰/۰۶۱۱
۲٤	۴۷/۲۷^{cB} ± ۱/۲۸	۶۵/۴^{bB} ± ۱/۹۷	۶۰/۰۶^{bB} ± ۱/۶۴	۶۱/۵۴^{bB} ± ۱/۹۳	۶۶/۷۶^{abB} ± ۱/۵۳	۵۲/۴۶^{cB} ± ۲/۴۲	<۰.۰۰۱
٤٨	۴۲/۹۳^{cC} ± ۰/۵۷	۵۹/۳۹^{abC} ± ۱/۹۸	۵۷/۸۶^{abC} ± ۱/۶۶	۵۵/۲۷^{bC} ± ۲/۰۶	۶۱/۳۸^{aC} ± ۲/۴۴^{a}	۴۷/۱۲^{cC} ± ۲/۷۷	<۰.۰۰۱
۷۲	۳۸/۱۸^{cD} ± ۱/۶۶	۵۷/۹۶^{aD} ± ۰/۲۸	۵۳/۴۰^{abD} ± ۱/۶۸	۵۲/۳۱^{abD} ± ۱/۶۵	۵۶/۰۵^{abD} ± ۲/۰۴	۴۰/۵۱^{cD} ± ۱/۲۱	<۰.۰۰۱

a..b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P< ۰/۰۵). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی‌مولار)
حروف بزرگ بالا نویسی شده (A-D) نشاندهنده تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

زنده‌مانی اسپرم

باتوجه‌به جدول ۲ در زمان ۵ ساعت، تفاوت معنی‌داری در درصد زنده‌مانی بین تیمارهای ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و تیمار شاهد مشاهده نشد (P<۰/۰۵)، اما تیمارهای ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری با ویتامین E داشتند (P<۰/۰۵). در ۲۴ ساعت، تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر زنده‌مانی بیشتری نسبت به شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). درحالی‌که تیمارهای ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوتی با شاهد نداشتند. تمامی غلظت‌ها در این زمان با ویتامین E تفاوت معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). در ۴۸ ساعت، هیچ تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل و شاهد دیده نشد، اما هر سه غلظت با ویتامین E تفاوت معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). در ۷۲ ساعت، تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان دادند (P<۰/۰۵)، درحالی‌که تیمار ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوتی با شاهد نداشت؛ اما با ویتامین E تفاوت معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین درصد زنده‌مانی اسپرم را در زمان‌های۵، ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد و کمترین درصد زنده‌مانی در زمان‌های ۵، ۴۸ و ۷۲ ساعت در تیمار ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. بین چهار زمان مختلف نگهداری منی در یخچال اختلاف آماری وجود داشت (P<۰/۰۰۱) به جر تیمار شاهد که بین زمان ۲۴ و ۴۸ اختلافی یافت نشد. در تیمار ۱۵ میلی‌گرم عصاره گرده بین زمان های ۲۴ و ۴۸ اختلاف معنی داری دیده نشد. اما اثر متقابل تیمار و زمان از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۰۱).

جدول ۲. اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل بر زنده‌مانی اسپرم قوچ پس از سردسازی

زمان	غلظت تیمارها						
(ساعت)	شاهد	۵mg/ml	۱۰mg/ml	۱۵ mg/ml	ویتامین E	DMSO	P-value
۵	۸۵/۷۵^{abcA} ± ۱/۷۵	۸۵^{abcA} ± ۰/۹۱	۸۴/۲۵^{bcA} ± ۰/۸۵	۸۲/۷۵ ^{cA} ± ۱/۱۰	۹۰^{aA} ± ۱/۲۹	۸۲/۲۵^{abcA} ± ۱/۲۵	<۰.۰۰۱
۲۴	۶۹/۷۵^{cB} ± ۱/۸۵	۷۶^{bB} ± ۱/۲۹	۷۴/۷۵^{bcB} ± ۱/۲۵	۷۲/۲۵^{bcB} ± ۱/۲۵	۸۷^{aB} ± ۱/۰۸	۷۰/۷۵^{cB} ± ۲/۱۷	<۰.۰۰۱
۴۸	۶۹^{bB} ± ۰/۹۱	۷۳/۷۵^{bC} ± ۱/۹۳	۷۲/۷۵^{bC} ± ۱/۳۷	۶۹/۵^{bBC} ± ۱/۸۴	۸۳/۵^{aC} ± ۱/۵۵	۶۷/۲۵^{abC} ± ۰/۸۵	<۰.۰۰۱
۷۲	۶۱/۵^{cC} ± ۱/۷۰	۶۹/۷۵^{abD} ± ۱/۷۰	۷۰/۷۵^{abD} ± ۱/۳۷	۶۷/۲۵^{bcC} ± ۱/۳۷	۷۴/۲۵^{aD} ± ۲/۳۲	۶۲^{cD} ± ۰/۹۱	۰/۰۰۰۲

a..b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P< ۰/۰۵). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی‌مولار).
حروف بزرگ بالا نویسی شده (A-D) نشاندهنده تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

سلامت غشای پلاسمایی اسپرم

بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در جدول ۳ نشان داد که در ۵ ساعت اول پس از نگهداری، تفاوت معنی‌داری میان تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل با تیمار شاهد وجود نداشت و تیمار ویتامین E نیز تفاوت معنی‌داری با این تیمارها نشان نداد (P<۰/۰۵). در زمان ۲۴ ساعت، تیمار ۵ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی گرده، با تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار نشان دادند(P<۰/۰۵). تیمار ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری سلامت غشای پلاسمایی کمتری نسبت به تیمار ویتامین E داشتند (P<۰/۰۵). در زمان ۴۸ ساعت، افزایش درصد سلامت غشای پلاسمایی به طور معنی‌داری در تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به تیمار شاهد دیده شد (P<۰/۰۵). هیچ یک از غلظت‌های عصاره متانولی گرده با ویتامین E تفاوت معنی‌داری نداشت (P<۰/۰۵). در زمان ۷۲ ساعت، تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده با تیمار شاهد و تیمار ویتامین E دیده شد (P<۰/۰۵). تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی گرده، بیشترین درصد سلامت غشای پلاسمایی در زمان‌های ۵، ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به غلظت‌های دیگر تیمارهای عصاره متانولی گرده نشان داد. بین چهار زمان مختلف نگهداری منی در یخچال اختلاف آماری وجود داشت (P<۰/۰۰۱) به جر تیمار شاهد که بین زمان ۲۴ و ۴۸ اختلافی یافت نشد. در تیمار ۵ میلی‌گرم عصاره گرده بین زمان های ۲۴ و ۴۸ اختلاف معنی داری دیده نشد. اما اثر متقابل تیمار و زمان از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۰۱).

جدول ۳. اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل بر سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ پس از سردسازی

زمان	غلظت تیمارها						
(ساعت)	شاهد	۵mg/ml	۱۰mg/ml	۱۵ mg/ml	ویتامین E	DMSO	P-value
۵	۸۷/۵۰^{aA} ± ۲/۵۹	۸۶/۵۰^{abA} ± ۰/۶۴	۸۴^{bA} ± ۰/۹۱	۸۷/۵۲^{bA} ± ۱/۱۰	۸۴/۲۵^{bA} ± ۲/۰۱	۸۶/۲۵^{abA} ± ۱/۷۵	<۰.۰۰۱
۲۴	۶۸/۷۵^{dB} ± ۱/۳۷	۷۷/۲۵^{bcB} ± ۱/۷۵	۷۴/۷۵^{dcB} ± ۰/۸۵	۷۹/۷۵^{abcB} ± ۱/۷۹	۸۳/۷۵^{aA} ± ۲/۷۵	۷۰^{dB} ± ۱/۴۷	<۰.۰۰۱
۴۸	۶۸/۲۵^{B} ± ۰/۸۵^{c}	۷۶/۲۵^{abB} ± ۲/۵۲	۷۲/۲۵^{bcC} ± ۱/۲۵	۷۳/۷۵^{abcC} ± ۱/۸۸	۷۹^{abB} ± ۱/۶۸	۶۶/۲۵^{cC} ± ۱/۲۹	۰/۰۰۰۹
۷۲	۵۸/۵^{dC} ± ۱/۱۹	۶۹/۵۰^{bC} ± ۱/۲۷	۶۸/۵۰^{bcD} ± ۱/۱۹	۶۶/۷۵^{bcD} ± ۱/۱۰	۷۷/۷۵^{aB} ± ۲/۴۲	۶۲/۷۵^{cdD} ± ۱/۴۹	<۰.۰۰۱

a..b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P< ۰/۰۵). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی‌مولار).
حروف بزرگ بالا نویسی شده (A-D) نشاندهنده تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

ریخت‌شناسی اسپرم

باتوجه‌به جدول ۴، در زمان ۵ ساعت، تفاوت معنی بین تیمارها دیده نشد (P<۰/۰۵). همچنین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده با ویتامین E تفاوت معنی‌داری نداشتند (P<۰/۰۵). در زمان ۲۴ ساعت، به طور معنی‌داری افزایش درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی طبیعی در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به تیمار شاهد دیده شد (P<۰/۰۵). درحالی‌که با تیمار ویتامین E تفاوت معنی‌داری نداشت (P<۰/۰۵). تیمارهای ۵ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و ویتامین E نشان ندادند (P<۰/۰۵). در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت هر سه غلظت عصاره متانولی گرده، با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). تیمار ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری درصد اسپرم طبیعی کمتری نسبت به ویتامین E داشت (P<۰/۰۵). تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین درصد اسپرم با ریخت‌شناسی طبیعی در زمان ۵ و ۴۸ ساعت را نشان داد. در زمان ۲۴ و ۷۲ تیمار

۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر درصد اسپرم با ریخت‌شناسی طبیعی بیشتری داشت. کمترین درصد اسپرم با ریخت‌شناسی طبیعی در زمان‌های مختلف نیز مربوط به تیمار ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. بین چهار زمان مختلف نگهداری منی در یخچال اختلاف آماری وجود داشت (P<۰/۰۰۱). در تیمار ۵ میلی‌گرم عصاره گرده بین زمان های ۲۴ و ۴۸ اختلاف معنی داری دیده نشد. اما اثر متقابل تیمار و زمان از نظر آماری اختلاف معنی دار داشتند (P<۰/۰۰۱).

جدول ٤. اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل بر ریخت‌شناسی اسپرم قوچ پس از سردسازی

زمان	غلظت تیمارها						
(ساعت)	شاهد	۵mg/ml	۱۰mg/ml	۱۵ mg/ml	ویتامین E	DMSO	P-value
۵	۹۲/۷۵^{A} ± ۱/۷۵	۹۵/۵^{A} ± ۰/۶۴	۹۵^{A} ± ۰/۹۱	۹۴/۵^{A} ± ۱/۰۴	۹۳/۷۵^{A} ± ۱/۱۰	۹۴^{A} ± ۱/۲۹	۰/۰۵۱۹
۲٤	۸۶/۲۵^{bB} ± ۰/۸۵	۹۱/۷۵^{abB} ± ۱/۳۷	۹۲/۵^{aB} ± ۱/۵۵	۹۰/۵^{abB} ± ۱/۰۴	۹۱/۷۵^{abB} ± ۱/۳۷	۸۵/۵^{bB} ± ۱/۸۴	۰/۰۲۴۴
٤۸	۷۸^{bC} ± ۰/۹۱	۸۹/۷۵^{aB} ± ۱/۴۹	۸۷/۷۵^{aC} ± ۱/۱۰	۸۷/۲۵^{aC} ± ۱/۲۵	۹۱/۲۵^{aB} ± ۱/۳۷	۸۰^{bC} ± ۱/۲۹	<۰۰۰۱
۷۲	۷۳^{dD} ± ۱/۲۹	۸۲^{bcC} ± ۱/۹۵	۸۵/۵^{abcD} ± ۱/۳۲	۸۱^{cD} ± ۱/۲۹	۸۹/۵^{abC} ± ۱/۴۴	۷۱^{adD} ± ۱/۵۸	<۰۰۰۱

a..b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P< ۰/۰۵). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی‌مولار).
حروف بزرگ بالا نویسی شده (A-D) نشاندهنده تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

فعالیت میتوکندری اسپرم

باتوجه به جدول ۵، در زمان ۵ ساعت، تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی با تیمار کنترل دیده نشد (P<۰/۰۵). در زمان ۲۴ ساعت تیمار۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان ندادند (P<۰/۰۵). تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های ۵ و ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی با تیمار ویتامین E دیده نشد (P<۰/۰۵). در زمان ۴۸ ساعت، تیمار ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل نشان دادند (P<۰/۰۵). اما بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی با ویتامین E تفاوت معنی‌داری دیده نشد. در زمان ۷۲ ساعت، فعالیت میتوکندری در تیمارهای ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل افزایش یافت (P<۰/۰۵). تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۵ و ۲۴ ساعت، تیمار ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۴۸ ساعت و تیمار ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۷۲ ساعت درصد فعالیت میتوکندری بیشتری نسبت‌به غلظت‌های دیگر عصاره متانولی نشان دادند. بین چهار زمان مختلف نگهداری منی در یخچال اختلاف آماری وجود داشت (P<۰/۰۰۱). در تیمار ۱۵ میلی‌گرم عصاره گرده بین زمان های ۵ و ۲۴ ساعت و زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری دیده نشد. اما اثر متقابل تیمار و زمان از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۰۱).

جدول ۵. اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل بر فعالیت میتوکندری اسپرم قوچ پس از سردسازی

زمان	غلظت تیمارها						
(ساعت)	شاهد	۵mg/ml	۱۰mg/ml	۱۵ mg/ml	ویتامین E	DMSO	P-value
۵	۶۴^{abA} ± ۱/۷۷	۶۵/۷۵^{abA} ± ۱/۲۵	۶۰^{abA} ± ۱/۲۹	۵۸/۲۵^{bA} ± ۲/۲۱	۶۶/۲۵^{aA} ± ۱/۱۰	۶۲/۵^{abA} ± ۲/۱۰	۰/۰۱۴۲
۲٤	۵۶/۷۵^{abB} ± ۱/۶۵	۵۹/۵۰^{aB} ± ۱/۱۹	۵۷^{abB} ± ۱/۰۸	۵۶^{abAB} ± ۲/۳۸	۵۵/۵^{abB} ± ۲/۳۲	۵۰/۷۵^{bB} ± ۰/۸۵	۰/۰۴۲۴
٤۸	۴۵/۲۵^{bC} ± ۲/۴۲	۴۰/۲۵^{abC} ± ۰/۸۵	۵۳/۵^{aC} ± ۱/۵۵	۵۴/۲۵^{aB} ± ۱/۵۲	۵۴/۲۵^{aB} ± ۱/۱۰	۴۶/۲۵^{bC} ± ۱/۴۹	۰/۰۰۰۷
۷۲	۳۰/۵^{bD} ± ۱/۰۴	۴۴/۲۵^{aD} ± ۱/۱۰	۴۵/۵^{aD} ± ۱/۷۵	۴۴/۲۵^{aC} ± ۲/۰۹	۴۸/۲۵^{aC} ± ۱/۲۵	۳۶/۵^{bD} ± ۱/۵۵	<۰۰۰۱

a..b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P< ۰/۰۵). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی‌مولار).
حروف بزرگ بالا نویسی شده (A-D) نشاندهنده تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

غلظت مالون‌دی‌آلدئید اسپرم

با توجه به جدول ۶، در زمان ۵ ساعت، تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی با تیمار کنترل دیده نشد (P<۰/۰۵). در ساعت ۲۴ غلظت مالون‌دی‌آلدئید در تیمار ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل کاهش یافت (P<۰/۰۵). در زمان ۲۴ ساعت، تفاوت معنی‌دار بین تیمار ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ویتامین E دیده شد (P<۰/۰۵). در ساعت ۴۸، غلظت‌های مختلف عصاره متانولی به طور معنی‌داری غلظت مالون‌دی‌آلدئید کمتری نسبت به تیمار

کنترل نشان دادند (P<۰/۰۵). تیمار ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ویتامین E تفاوت معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). اما تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ویتامین E تفاوت معنی‌دار نشان نداد. در زمان ۷۲ ساعت، غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری غلظت مالون‌دی‌آلدئید کمتری نسبت به تیمار کنترل نشان دادند (P<۰/۰۵). تیمار ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ویتامین E تفاوت معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). از طرفی تفاوت معنی‌داری بین تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ویتامین E دیده نشد. کمترین و بیشترین درصد غلظت مالون‌دی‌آلدئید بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی در زمان ۵، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب مربوط به تیمار ۵ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود .. بین چهار زمان مختلف نگهداری منی در یخچال اختلاف آماری وجود داشت (P<۰/۰۰۱). در تیمار ۵ میلی‌گرم عصاره گرده بین زمان های ۵ و ۲۴ ساعت و زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی داری دیده نشد. اثر متقابل تیمار و زمان از نظر آماری اختلاف معنی دار داشتند (P<۰/۰۰۱).

جدول ٦. اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل بر غلظت مالون دی آلدئید اسپرم قوچ ($۱۰^{٤} \times ۱۰۰$سلول اسپرم در هر میلی لیتر)

زمان	غلظت تیمارها						
(ساعت)	شاهد	۵mg/ml	۱۰mg/ml	۱۵ mg/ml	ویتامین E	DMSO	P-value
۵	۵/۱۹^{aA} ± ۰/۵۳	۴/۴۱^{A} ± ۰/۳۱	۵/۱۲^{A} ± ۰/۲۶	۵/۲۹^{A} ± ۰/۴۶	۴/۳۵^{A} ± ۰/۳۶	۵/۴۳^{A} ± ۰/۳۴	۰/۰۸۳۷
۲٤	۹/۱۲^{aB} ± ۰/۲۴	۵/۰۸^{cAB} ± ۰/۴۲	۶/۷۰^{bB} ± ۰/۳۱	۷/۸۵^{abB} ± ۰/۴۱	۴/۷۱^{cA} ± ۰/۲۶	۸/۷۰^{aB} ± ۰/۳۶	<۰۰۰۱
٤۸	۱۰/۷۵^{aC} ± ۰/۳۶	۵/۵۶^{dB} ± ۰/۲۰	۷/۳۷^{cC} ± ۰/۵۵	۸/۸۲^{bcC} ± ۰/۳۳	۵/۶۸^{dB} ± ۰/۳۱	۹/۷۹^{abC} ± ۰/۲۰	<۰۰۰۱
۷۲	۱۱/۶۶^{aD} ± ۰/۳۱	۶/۲۸^{cC} ± ۰/۳۶	۸/۴۰^{bD} ± ۰/۲۵	۹/۶۲^{bD} ± ۰/۳۷	۶/۴۰^{cC} ± ۰/۲۶	۱۱/۳۰^{aD} ± ۰/۲۸	<۰۰۰۱

a..b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P< ۰/۰۵). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی‌مولار).
حروف بزرگ بالا نویسی شده (A-D) نشاندهنده تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

ارزیابی فراسنجه های اسپرم پس از انجماد و یخ گشایی

با توجه‌به جدول ۷ اسپرم پس از یخ‌گشایی به طور معنی‌داری در تیمار ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵). تیمار ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین درصد جنبایی اسپرم پس از یخ‌گشایی را نشان داد (P<۰/۰۵). تیمار ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌دار با تیمار ویتامین E نشان دادند (P<۰/۰۵). پس از یخ‌گشایی درصد زنده‌مانی در تیمار ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵) و تیمار ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌دار با ویتامینE نشان دادند (P<۰/۰۵). درحالی‌که تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ویتامین E تفاوت معنی‌داری نداشت. سلامت غشای اسپرم پس از انجماد و یخ گشایی در تیمار ۱۵ میلی‌گرم عصاره گرده بیشترین و تیمارهای شاهد و DMSO کمترین درصد را نشان دادند. بهترین درصد ریخت شناسی اسپرم پس از یخ گشایی در تیمار ۱۵ میلی‌گرم عصاره گرده دیده شد. در حالی که تیمار شاهد با تیمار DMSO هیچ گونه اختلاف معنی داری نداشتند. فعالیت میتوکندری در تمامی تیمار ها نسبت به شاهد اختلاف معنی داری داشت (P<۰/۰۰۱). تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گرده توانست پس از یخ‌گشایی کمترین مقدار مالون دی آلدئید را تولید کند و بیشترین مقدار مالون دی آلدئید مربوط به تیمار های شاهد و DMSO بود (P<۰/۰۰۱).

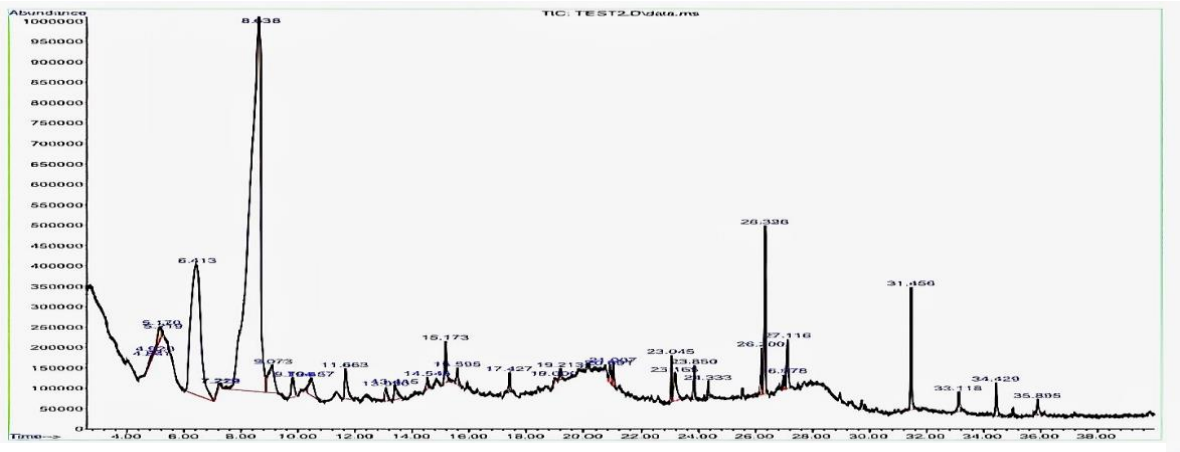
جدول ۷. اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل بر فراسنجه‌های اسپرم قوچ پس از انجماد-یخ‌گشایی

صفات (٪)	تیمارها						
	شاهد	۵ mg/ml	۱۰mg/ml	۱۵ mg/ml	ویتامینE	DMSO	P-value
زنده‌مانی	۳۱^{d} ± ۱/۲۹	۶۰/۵^{b} ± ۲/۱۰	۴۵/۲۵^{c} ± ۰/۸۵	۶۸/۷۵^{a} ± ۱/۳۷	۶۰/۷۵^{b} ± ۰/۸۵	۳۲/۷۵^{d} ± ۱/۴۹	<۰۰۰۱
ریخت‌شناسی	۶۷^{d} ± ۲/۰۸	۷۸^{ab} ± ۲/۵۴	۷۴/۷۵^{bc} ± ۱/۲۵	۸۳/۲۵^{a} ± ۱/۱۰	۷۹/۵^{ab} ± ۱/۰۴	۶۸/۵^{cd} ± ۱/۵۵	<۰۰۰۱
سلامت غشا	۳۱^{c} ± ۱/۲۹	۵۰/۷۵^{ab} ± ۰/۸۵	۴۳^{bc} ± ۱/۵۸	۶۳^{a} ± ۱/۶۸	۵۵^{abc} ± ۲/۰۴	۳۲/۲۵^{c} ± ۱/۴۹	<۰۰۰۱
جنبایی	۱۶/۳۳^{d} ± ۱/۱۵	۳۶/۴۳^{b} ± ۱/۷۳	۲۴/۶۶^{c} ± ۰/۵۳	۴۹/۵۲^{a} ± ۱/۶۵	۴۰/۳۷^{b} ± ۰/۳۸	۱۹/۹۱^{cd} ± ۰/۶۳	<۰۰۰۱
فعالیت میتوکندری	۱۹/۲۵^{b} ± ۰/۸۵	۳۳/۲۵^{a} ± ۱/۴۹	۳۰/۲۵^{a} ± ۱/۴۹	۳۰^{a} ± ۱/۵۸	۲۷^{a} ± ۲/۴۲	۱۸/۲۵^{b} ± ۱/۱۰	<۰۰۰۱
غلظت مالون دی آلدئید (nmol/mL)	۷۳/۷۳^{a} ± ۱/۹۰	۴۷/۷۱^{c} ± ۱/۰۶	۶۱/۵۷^{b} ± ۲/۲۲	۶۳/۶۵^{b} ± ۰/۶۷	۴۸/۶۷^{c} ± ۰/۸۵	۷۶/۰۹^{a} ± ۲/۵۴	<۰۰۰۱

a..b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P< ۰/۰۵). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی‌مولار).

تحلیل عصاره متانولی گرده زنبورعسل با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی–طیف‌سنجی جرمی (GC-MS)

ترکیبات شناسایی شده در عصاره متانولی گرده زنبورعسل با روش GC-MS در جدول ۷ ارائه شده است.



نگاره ۱. کروماتوگرام GC_MS عصاره متانولی گرده زنبورعسل

جدول ۸. ترکیبات شناسایی‌شده در عصاره متاتولی گرده زنیورعسل به روش GC-MS

تعداد ترکیبات	مواد شناسایی شده	سطح زیر منحنی(٪)	Retention time (min)
۱	3-Thiophenemethanol	۰/۲۶	۴/۸۴۴
۲	3-Methylpiperazine-2,5-dion	۰/۱۶	۴/۹۲۲
۳	4,6-Dihydroxy-2-methyl pyrimidine	۱/۵۳	۵/۱۷۱
۴	6-Methoxy-2-cyclohexen-1-one	۰/۱۲	۵/۲۱۷
۵	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	۱۸/۳۱	۶/۴۱۱
۶	5-Hydroxymaltol	۰/۱۴	۷/۲۱
۷	Methyl 3-hydroxydecanoate	۵/۷۹	۹/۰۷۲
۸	2-Methoxy-4-vinyl phenol	۱/۹۹	۹/۷۹۴
۹	4-Phenylbut-3-ynylaminc	۲/۹	۱۰/۴۵۸
۱۰	5-Acetyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizin	۲/۹	۱۱/۶۶۲
۱۱	1,3,5-Trimethyl-2-octadecyclohexane	۱/۱۷	۱۳/۰۸۹
۱۲	2,1,3-Benzothiadiazole	۱/۶۳	۱۳/۴۱۵
۱۳	3-Acetylphenoxazoline	۰/۸۴	۱۴/۴۵۷
۱۴	N-(4-fluorophenyl)cyclohexane carboxamide	۲/۴	۱۵/۱۷۴
۱۵	Lauric acid	۳,۷۴۱	۱۵/۵۹۵
۱۶	Thiazolo[3,2-a]pyridinium, 8-hydroxy-2,5-dimethyl-, hydroxide, inner salt	۱/۰۵	۱۷/۴۲۶
۱۷	Trans-4-methoxy cinnamic acid	۲/۵۹۱	۱۸/۹۹۸
۱۸	2-Methoxyadamantane	۰/۶۲	۱۹/۲۱۱
۱۹	9-Methylenetricyclo[3.3.2]decan-2,6-dion	۱/۴۶	۲۰/۸۹۲
۲۰	Yomogi alcohol	۱/۴۶	۲۱/۰۰۶
۲۱	Methyl palmitate	۱/۹۹	۲۳/۰۴۶
۲۲	3,4-Dimethoxycinnamic acid	۵/۹۵۱	۲۳/۱۶۵
۲۳	Palmitic acid	۳/۳۱	۲۳/۸۵۰
۲۴	Cis-(Z)-alpha-Bisabolene epoxide	۱/۲۶۱	۲۴/۳۳۲
۲۵	Linoleic acid, methyl ester	۲/۶۵	۲۶/۲
۲۶	Methyl linolenate	۹/۷۳۱	۲۶/۳۲۵
۲۷	Allo-inositol	۳/۶۲۱	۲۶/۹۷۸
۲۸	α-Linolenic acid	۳/۲۴۱	۲۷/۱۱۹
۲۹	Pinostrobin chalcone	۱۰/۸۲	۳۱/۴۵۶
۳۰	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	۱/۲۹	۳۳/۱۱۷
۳۱	4H-1-Benzopyran-4-one, 5-hydroxy-7-methoxy-2-phenyl	۴/۵۸۱	۳۴/۴۲۹
۳۲	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-3-methylene	۰/۹۳	۳۵/۸۹۳

بحث

بر اساس تحلیل عصاره متانولی گرده با روش GC-MS، مشخص شد که ۵۷/۳۷۶ از عصاره متانولی گرده زنبورعسل شامل ترکیباتی چون اسیدهای چرب، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها است. این ترکیبات به واسطه خواص بیولوژیکی متنوع خود، می‌توانند نقشی موثری در بهبود کیفیت اسپرم ایفا کنند. میزان فلاونوئیدکل موجود در عصاره متانولی گرده حدود ۱/۶۵۹۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم اندازه‌گیری شد. به‌منظور مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره، از ویتامین E به‌عنوان آنتی‌اکسیدان مرجع استفاده گردید. ویتامین E قادر است انواع رادیکال‌های آزاد نظیر سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل را خنثی کرده و با جلوگیری از پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای اسپرم، از کاهش تحرک نهایی آن جلوگیری کند (Sinclair, 2000).

در میان ترکیبات شناسایی‌شده، DDMP به‌عنوان یکی از محصولات واکنش میلارد گلوکز، با ساختار خاص خود به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی مطرح است. مطالعات نشان داده‌اند که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد، از آغاز یا ادامه واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداتیو جلوگیری کرده و از این طریق تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند؛ فرایندی که منجر به حفاظت از غشای سلولی و حفظ کیفیت اسپرم می‌شود (Chen *et al*., 2021). از جمله ترکیبات شناسایی‌شده در عصاره، دو ترکیب Pinostrobin chalcone، 4H-1-Benzopyran-4-one و 5-hydroxy-7-methoxy-2-phenyl ، از دسته فلاونوئیدها و مشتقات چالکون‌ها بودند که در مجموع حدود ۱۵,۴۰۱ درصد از ترکیب عصاره را تشکیل دادند. پینوستروبین یک فلاوانول با آثار بیولوژیکی متعددی مانند خواص ضدویروسی، ضدباکتری و ضدقارچی است (Kanchanapiboon *et al*., 2020; Sopanaporn *et al*., 2020; Gurung *et al*., 2022) دارد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این ترکیب با کاهش آسیب ناشی از مواجهه با ریزپلاستیک‌های پلی‌استایرن، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تنظیم هورمون‌های مرتبط با تولیدمثل، همچنین کاهش آپوپتوز، کیفیت اسپرم را بهبود می‌بخشد (Ijaz *et al*., 2023). همچنین، اسید لوریک که یکی از اسیدهای چرب غالب موجود در عصاره و ترکیب عمده روغن نارگیل محسوب می‌شود، خاصیت ضدمیکروبی قوی در برابر باکتری‌های گرم مثبت، برخی قارچ‌ها و ویروس‌ها دارد (Dayrit, 2015). تجویز این اسید با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مدل‌های حیوانی، منجر به بهبود شاخص‌های تولیدمثل از جمله کیفیت اسپرم، کاهش تنش اکسیداتیو و تنظیم هورمون‌های باروری در موش‌های دیابتی شده است (Anur *et al*., 2023).

آلواینوزیتول (Allo-inositol) نیز که یکی از ایزومرهای اینوزیتول‌ها محسوب می‌شود، متعلق به گروه کربوهیدرات‌های الکلی است و به‌دلیل نقش‌های آنتی‌اکسیدانی و متابولیکی، در حفظ سلامت سلول‌های زایشی حائز اهمیت است. این ترکیب به‌عنوان پیام‌رسان ثانویه در مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی نقش داشته و در فرایندهای تنظیم کلسیم داخل‌سلولی و نیز در عملکرد تولیدمثلی مؤثر است (De Luca *et al*., 2021).

نتایج حاصل از آزمایش‌ها نشان داد که در شرایط نگهداری کوتاه‌مدت، غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین تأثیر مثبت را بر فراسنجه‌های اسپرم از جمله کاهش معنادار غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) داشت. این در حالی بود که تیمار با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، بیشترین نقش را در کاهش افت کیفیت اسپرم در ساعت ۷۲ ایفا کرد، به‌گونه‌ای که درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی طبیعی، زنده‌مانی و فعالیت میتوکندری در این گروه در بالاترین سطح نسبت به سایر تیمارها باقی ماند. همچنین، غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین اثر را در بهبود سلامت غشا در ساعت ۲۴ و افزایش فعالیت میتوکندری در ساعت ۴۸ نشان داد. در شرایط پس از انجماد نیز هر سه غلظت عصاره (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری موجب بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم شدند. در این میان، تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین اثر را در حفظ فعالیت میتوکندری و کاهش سطح MDA داشت. کاهش سطح MDA نشان‌دهنده کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و بهبود وضعیت اکسیداتیو سلول‌هاست که در حفظ انرژی و عملکرد اسپرم نقش دارد. به نظر می‌رسد این ترکیبات با جلوگیری از آسیب به ساختار غشا، حمایت از عملکرد میتوکندری و حفظ تولید ATP، موجب افزایش طول عمر و کیفیت اسپرم در طول دوره نگهداری می‌شوند. یکپارچگی غشای اسپرم، به‌عنوان یکی از شاخص‌های کلیدی در ارزیابی توان باروری، به‌شدت تحت‌تأثیر عوامل اکسیداتیو قرار دارد (Yousif *et al*., 2024). یافته‌های این مطالعه با نتایج پژوهش Al-Amery و Banana (2020) هم‌خوانی دارد؛ آن‌ها نیز افزایش تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم قوچ را در اثر افزودن عصاره‌های آبی و الکلی گرده زنبورعسل در دمای ۵

درجه سانتی‌گراد گزارش کردند. این هم‌راستایی، بیانگر اثربخشی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در گرده زنبورعسل، مستقل از نوع حلال استخراج، در بهبود پارامترهای اسپرم در شرایط سرد است. این ترکیبات با پایداری ساختارهای سلولی، حفظ ریخت‌شناسی و عملکرد طبیعی اسپرم، آثار مثبتی در مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو دارند (Agarwal et al., 2014). فعالیت میتوکندری، که مستقیماً با تولید انرژی و تحرک اسپرم مرتبط است، در تیمارهای حاوی عصاره بهتر حفظ شده و از کاهش ATP و آسیب‌های ساختاری ناشی از ROS پیشگیری شده است (Amaral *et al*., 2013). مکمل‌سازی جیره با گرده زنبورعسل در خروس‌های بالغ موجب بهبود قابل‌توجه در ویژگی‌های فیزیکی منی، از جمله حجم انزال، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی اسپرم، و کاهش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی گردید. به‌ویژه با وجود تفاوت‌هایی که در گونه‌های جانوری (مرغ در برابر قوچ)، روش مصرف (خوراکی در مقابل افزودن به رقیق‌کننده اسپرم)، و نوع عصاره مورد استفاده وجود دارد، در هر دو مطالعه‌ای که بررسی شد، آثار مثبت گرده زنبورعسل بر کیفیت اسپرم مشهود بود. این هم‌خوانی می‌تواند نشان‌دهنده آثار عمومی ترکیبات زیست‌فعال موجود در گرده زنبورعسل، به‌ویژه فلاونوئیدها و اسیدهای چرب، در کاهش تنش اکسیداتیو و ارتقاء شاخص‌های عملکرد تولیدمثلی در گونه‌های مختلف باشد (Abuoghaba *et al*., 2018).

در پژوهش حاضر، تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره متانولی گرده زنبورعسل باعث کاهش قابل‌توجه سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) شد که این کاهش نشان‌دهنده اثر محافظتی عصاره در برابر تنش اکسیداتیو است. این اثر محافظتی در طول دوره نگهداری و پس از انجماد مشهود بود و نشان می‌دهد که این تیمار توانسته است پایداری ساختار سلولی اسپرم را حفظ کند. به نظر می‌رسد این غلظت با فراهم کردن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مؤثر، بدون ایجاد دوز بالای سایر ترکیبات زیست‌فعال مانند اسیدهای چرب یا فنول‌ها، توانسته است تعادل سلولی را حفظ و از بروز آثار منفی احتمالی جلوگیری کند (Kothari & Seshadri, 2010).

غلظت پایین‌تر از عصاره به احتمال زیاد شرایط بهینه‌ای برای محافظت از اسپرم فراهم کرده است که می‌تواند دلیل اثربخشی بیشتر آن در کاهش سطح MDA باشد. همچنین در این غلظت پایین، به‌ویژه ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، میزان زنده‌مانی اسپرم نیز بهتر حفظ شد که این امر احتمالاً به دلیل کاهش آسیب‌های اکسیداتیو و فراهم آمدن شرایط مطلوب‌تر برای فرایندهای متابولیک سلولی است. فلاونوئیدهای موجود در عصاره با مهار اکسیداسیون لیپیدها و حفظ ساختار غشای سلولی، نقش مؤثری در افزایش یکپارچگی غشا و بهبود زنده‌مانی اسپرم‌ها ایفا می‌کنند (Chen *et al*., 2020).

در مورد آثار غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم، عدم تفاوت معنی‌دار میان تیمارها در شرایط مایع نشان می‌دهد که دامنه غلظت‌های به‌کار رفته در این مطالعه در محدوده‌ای قرار داشته که آثار مفید خود را بدون ایجاد سمیت سلولی اعمال کرده‌اند. این می‌تواند به ویژگی‌های خاص ترکیبات موجود در عصاره، مانند فلاونوئیدها، اسیدهای چرب و مشتقات آن‌ها مربوط باشد که در این دامنه دوز به‌طور مثبت بر تعادل سلولی تأثیر گذاشته و موجب ایجاد تداخل منفی نمی‌شوند. مطابق گزارش یلدیز و همکاران (Yıldız *et al*., 2013)، مصرف مکمل گرده زنبورعسل در شرایط تنش‌زا موجب کاهش شاخص‌های تنش اکسیداتیو و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی در حیوانات می‌شود. در پژوهش حاضر نیز افزودن عصاره متانولی گرده به رقیق‌کننده منی موجب بهبود قابل‌توجه کیفیت اسپرم پس از یخ‌گشایی شد. در این بین، تیمار ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آثار مطلوب‌تری بر جنبایی، زنده‌مانی، فعالیت غشای پلاسمایی و ریخت‌شناسی اسپرم نسبت به سایر تیمارها نشان داد. به‌نظر می‌رسد این تیمار، با توجه به غلظت بالاتر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، توانسته با کاهش تنش اکسیداتیو و محافظت از غشای اسپرم، از بروز ناهنجاری‌های ثانویه نظیر دم حلقه‌ای، جداشدگی سر از دم و خمیدگی قطعه میانی جلوگیری کند و ساختارهای سلولی را در برابر تنش ناشی از انجماد تقویت کند. بنابراین، اثر حفاظتی این غلظت در حفظ ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم آشکار شده است. در مقابل، تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین بهبود را در فعالیت میتوکندری و کاهش سطح MDA در شرایط پس از انجماد نشان داد. این یافته احتمالاً ناشی از تأثیر محافظتی آنتی‌اکسیدان‌ها در این غلظت است، بدون اینکه فشار متابولیکی اضافی ایجاد شود. کاهش کمتر سطح MDA در تیمارهای ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ممکن است به دلیل بروز تنش اکسیداتیو معکوس ناشی از تخریب لیپیدهای غشایی باشد.

عصاره مورد استفاده در این مطالعه حاوی ۳۹/۸۵ درصد اسیدهای چرب است که برخی از آن‌ها خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی دارند. اسیدهای چرب نقش حیاتی در ساختار و عملکرد اسپرم ایفا می‌کنند، از جمله در سیالیت غشا، واکنش آکروزومی،

تحرک و زنده‌مانی سلول. همچنین با کاهش تنش اکسیداتیو و تأمین انرژی، این اسیدها می‌توانند پایداری اسپرم را در شرایط نگهداری و انجماد افزایش دهند. ترکیباتی نظیر اسید سینامیک و مشتقات چالکون نیز با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی خود می‌توانند نقش محافظتی ایفا کنند (Díaz *et al*., 2016). مطالعات متعدد اثر مثبت اسیدهای چرب غیراشباع بر یکپارچگی DNA، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش سطح تنش اکسیداتیو اسپرم را نشان داده‌اند (Huang *et al*., 2016; Kiernan *et al*., 2013). رابطه میان افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش تحرک اسپرم توسط آیتکن و ساویر (Aitken & Sawyer, 2003) تأیید شده است؛ به‌گونه‌ای که تولید بیش‌ازحد پراکسید هیدروژن منجر به کاهش ATP و درنتیجه کاهش تحرک اسپرم می‌شود. چون میتوکندری نقش کلیدی در تولید انرژی دارد، حضور اسیدهای چرب غیراشباع مانند لینولنیک و آلفا لینولنیک اسید در غلظت‌های پایین‌تر می‌تواند باعث حفظ عملکرد بهینه این اندامک حیاتی بدون اعمال فشار متابولیکی اضافی شود. همچنین رابطه‌ای مستقیم بین یکپارچگی غشا و فعالیت میتوکندری وجود دارد؛ به‌گونه‌ای که بهبود یکپارچگی غشای سلول موجب افزایش عملکرد میتوکندری می‌شود (Partyka et al., 2012).

ترکیبات فنولیک، به‌ویژه فلاونوئیدها، می‌توانند با پوشش‌دهی لیپیدهای غشایی از آن‌ها محافظت کرده و از تولید بیش‌ازحد رادیکال‌های آزاد جلوگیری کنند، از این طریق روند پراکسیداسیون لیپیدها را مهار کرده و پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع را محدود سازند (Blokhina *et al*., 2003).

در نهایت، در تیمارهای حاوی عصاره، افزایش معنی‌دار جنبایی، تعداد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی طبیعی و کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید (به عنوان شاخص سنجش پراکسیداسیون لیپیدی) نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. این نتایج نشان‌دهنده رابطه معنادار بین پراکسیداسیون لیپیدی و ویژگی‌های ریخت‌شناسی و تحرک اسپرماتوزوئید است (MAIA & Bicudo, 2009). به نظر می‌رسد که فلاونوئیدها با مهار پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید، تأثیر مثبتی بر تحرک و ریخت‌شناسی اسپرماتوزوئید طی دوره نگهداری دارند (Lima & Abdalla, 2001). هر سه غلظت عصاره، با فراهم کردن سطوح متفاوتی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، به‌طور موفقیت‌آمیزی موجب بهبود کیفیت اسپرم در شرایط مختلف (سرما و انجماد) شدند؛ به‌ویژه اینکه هر غلظت، بسته به میزان و نوع ترکیبات موجود، تأثیرات متفاوتی بر فراسنجه‌های خاص سلولی داشته است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره متانولی گرده زنبورعسل با خواص آنتی‌اکسیدانی خود، تأثیر مثبتی بر کیفیت اسپرم قوچ در شرایط ذخیره‌سازی مایع و انجماد دارد. ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره، از جمله فلاونوئیدها، اسیدهای چرب و ترکیبات فنولی، بهبود قابل‌توجهی در فراسنجه‌های اسپرم مانند جنبایی، زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی، فعالیت میتوکندری و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی ایجاد کردند. در میان غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده، غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با حفظ آثار مثبت آنتی‌اکسیدانی و بدون ایجاد فشار متابولیکی اضافی، بهترین نتیجه را در حفظ کیفیت اسپرم نشان داد و بنابراین پیشنهاد می‌شود. با این حال، برای درک دقیق‌تر آثار آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها و سایر ترکیبات زیست‌فعال گرده زنبورعسل بر کیفیت اسپرم، به‌ویژه در شرایط فراوری منی، نیاز به مطالعات و تحقیقات بیشتری است.

REFERENCES

Agarwal, A., Durairajanayagam, D., & Du Plessis, S. S. (2014). Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *12*, 1-19. https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-112

Aitken, R. J., & Sawyer, D. (2003). The human spermatozoon—not waving but drowning. *Advances in male mediated developmental toxicity*, 85-98. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9190-4_8

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. https://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.05.002

Allai, L., Benmoula, A., da Silva, M. M., Nasser, B., & El Amiri, B. (2018). Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*, *192*, 6-17. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.014

Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani Nashtaei, M., Khodarahmian, M., & Nekoonam, S. (2016). The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and tissue banking*, *17*, 745-756. https://doi.org/10.1007/s10561-016-9566-5

Al-Amery, K. S., & Banana, H. J. (2020). Effect of adding aqueous and alcoholic extract of bee pollen on semen characteristics of Awassi ram semen stored at 5° C. *Biochemical & Cellular Archives*, *20*(1). . https://doi.org/10.35124/bca.2020.1.723

Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, *91*(2), 179-194. https://doi.org/10.1093/aob/mcf118

Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, *10*(3). https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748

Chen, S., Fang, L., Xi, H., Guan, L., Fang, J., Liu, Y., Wu, B., & Li, S. (2012). Simultaneous qualitative assessment and quantitative analysis of flavonoids in various tissues of lotus (Nelumbo nucifera) using high performance liquid chromatography coupled with triple quad mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *724*, 127-135. https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.02.047

Chen, Z., Xi, G., Fu, Y., Wang, Q., Cai, L., Zhao, Z., Liu, Q., Bai, B., & Ma, Y. (2021). Synthesis of 2, 3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one from maltol and its taste identification. *Food Chemistry*, *361*, 130052. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130052

Das, A. B., Goud, V. V., & Das, C. (2019). Phenolic compounds as functional ingredients in beverages. In *Value-added ingredients and enrichments of beverages* (pp. 285-323): Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816687-1.00009-6

Dayrit, F. M. (2015). The properties of lauric acid and their significance in coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *92*, 1-15. https://doi.org/10.1007/s11746-014-2562-7

De Luca, M. N., Colone, M., Gambioli, R., Stringaro, A., & Unfer, V. (2021). Oxidative stress and male fertility: role of antioxidants and inositols. *Antioxidants*, *10*(8), 1283. https://doi.org/10.3390/antiox10081283

Díaz, R., Torres, M., Bravo, S., Sanchez, R., & Sepúlveda, N. (2016). Determination of fatty acid profile in ram spermatozoa and seminal plasma. *Andrologia*, *48*(6), 723-726. https://doi.org/10.1111/and.12506

Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 407-421). Elsevier. https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H

Evans, G., & Maxwell, W. C. (1987). Salamons' artificial insemination of sheep and goats.

Fry, C. J., & Peterson, C. L. (2001). Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Current Biology*, *11*(5), R185-R197. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00090-2

Gholami, H., Chamani, M., Towhidi, A., & Fazeli, M. H. (2011). Improvement of semen quality in holstein bulls during heat stress by dietary supplementation of omega-3 fatty acids. *International journal of fertility & sterility*, *4*(4), 160.

Gurung, A. B., Ali, M. A., Al-Hemaid, F., El-Zaidy, M., & Lee, J. (2022). In silico analyses of major active constituents of fingerroot (Boesenbergia rotunda) unveils inhibitory activities against SARS-CoV-2 main protease enzyme. *Saudi journal of biological sciences*, *29*(1), 65-74. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.053

Hancock, J. (1952). The morphology of bull spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, *29*(3), 445-453. https://doi.org/10.1242/jeb.29.3.445

Haydak, M. H. (1970). Honey bee nutrition. *Annual review of entomology*, *15*(1), 143-156. https://doi.org/10.1146/annurev.en.15.010170.001043

Huang, A., Isobe, N., Obitsu, T., & Yoshimura, Y. (2016). Expression of lipases and lipid receptors in sperm storage tubules and possible role of fatty acids in sperm survival in the hen oviduct. *Theriogenology*, *85*(7), 1334-1342. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.020

Ijaz, M. U., Shahzadi, S., Hamza, A., Azmat, R., Anwar, H., Afsar, T., Shafique, H., Bhat, M. A., Naglah, A. M., & Al-Omar, M. A. (2023). Alleviative effects of pinostrobin against cadmium-induced renal toxicity in rats by reducing oxidative stress, apoptosis, inflammation, and mitochondrial dysfunction. *Frontiers in Nutrition*, *10*, 1175008. https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1175008

Johnson, L. V., Walsh, M. L., & Chen, L. B. (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *77*(2), 990-994. https://doi.org/10.1073/pnas.77.2.990

Kanchanapiboon, J., Kongsa, U., Pattamadilok, D., Kamponchaidet, S., Wachisunthon, D., Poonsatha, S., & Tuntoaw, S. (2020). Boesenbergia rotunda extract inhibits Candida albicans biofilm formation by pinostrobin and pinocembrin. *Journal of Ethnopharmacology*, *261*, 113193. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113193

Kiernan, M., Fahey, A., & Fair, S. (2013). The effect of the in vitro supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reproduction, Fertility and Development*, *25*(6), 947-954. https://doi.org/10.1071/RD12204

Leja, M., Mareczek, A., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J., & Czekońska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food chemistry*, *100*(1), 237-240. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.047

Lenzi, A., Gandini, L., Maresca, V., Rago, R., Sgro, P., Dondero, F., & Picardo, M. (2000). Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. *Molecular human reproduction*, *6*(3), 226-231. https://doi.org/10.1093/molehr/6.3.226

Lima, E., & Abdalla, D. S. P. (2001). Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci*, *37*(3), 293-303.

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. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0470283

MAIA, M. d. S., & Bicudo, S. (2009). Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão.

Maxwell, W., & Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, *5*(6), 613-638. https://doi.org/10.1071/RD9930613

Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N.-K., & Zawawi, N. (2020). Botanical origin and nutritional values of bee bread of stingless bee (Heterotrigona itama) from Malaysia. *Journal of Food Quality*, *2020*(1), 2845757. https://doi.org/10.1155/2020/2845757

Nemati, Z., Sattari, M., Karimi, A., Besharati, M., & Kamrani, N. (2022). Improving of frozen-thawed sperm quality in commercial broiler breeder roosters challenged with dexamethasone using diet vitamin E supplementation. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 14(1), 109-120. https://doi.org/10.22067/IJASR.2021.68725.1007

Partyka, A., Łukaszewicz, E., & Niżański, W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, *77*(8), 1497–1504. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.006

Raeeszadeh, M., Karimfar, B., Amiri, A. A., & Akbari, A. (2021). Protective Effect of Nano-Vitamin C on Infertility due to Oxidative Stress Induced by Lead and Arsenic in Male Rats. *Journal of Chemistry*, *2021*(1), 9589345. https://doi.org/10.1155/2021/9589345 (in persian)

Revell, S., & Mrode, R. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science, 36(1-2), 77-86.* https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)90055-8

Salamon, S., & Maxwell, W. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3-4),185-249 .

https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-i

Rafeie, F., Abdoli, R., Hossein-Zadeh, N.G. et al. (2023). Interaction networks and pathway analysis of genetic resistance to gastrointestinal nematodes in sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 55, 34. https://doi.org/10.1007/s11250-022-03448-5

Rodríguez-Pólit, C., Gonzalez-Pastor, R., Heredia-Moya, J., Carrera-Pacheco, S. E., Castillo-Solis, F., Vallejo-Imbaquingo, R., Barba-Ostria, C., & Guamán, L. P. (2023). Chemical properties and biological activity of bee pollen. *Molecules*, *28*(23), 7768. https://doi.org/10.3390/molecules28237768

Šarić, A., Balog, T., Sobočanec, S., Kušić, B., Šverko, V., Rusak, G., Likić, S., Bubalo, D., Pinto, B., & Reali, D. (2009). Antioxidant effects of flavonoid from Croatian Cystus incanus L. rich bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(3) ,547-557 . https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.12.007

Schuster, R., Holzer, W., Doerfler, H., Weckwerth, W., Viernstein, H., Okonogi, S., & Mueller, M. (2016). Cajanus cajan–a source of PPARγ activators leading to anti-inflammatory and cytotoxic effects. *Food & function*, *7*(9), 3798-3806. https://doi.org/10.1039/c6fo00689b

Shahin, M. A., Khalil, W. A., Saadeldin, I. M., Swelum, A. A.-A., & El-Harairy, M. A. (2020). Comparison between the effects of adding vitamins, trace elements, and nanoparticles to shotor extender on the cryopreservation of dromedary camel epididymal spermatozoa. *Animals*, *10*(1), 78. https://doi.org/10.3390/ani10010078

Silva, P., & Gadella, B. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, *65*(5), 958-978. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010

Sinclair, S. (2000). Male infertility: nutritional and environmental considerations. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, *5*(1), 28-38.

Sinha, M., Sinha, A., Singh, B., & Prasad, R. (1996). The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal Reproduction Science*, *41*(3-4), 237-243. https://doi.org/10.1016/0378-4320(95)01450-0

Sopanaporn, J., Suksawatamnuay, S., Sardikin, A. ,Lengwittaya, R., Chavasiri, W., Miyakawa, T., & Yompakdee, C. (2020). Pinostrobin suppresses the Ca2+-signal-dependent growth arrest in yeast by inhibiting the Swe1-mediated G2 cell-cycle regulation. *FEMS yeast research*, *20*(4), foaa026. https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa026

Wang, H., Gao, X. D., Zhou, G. C., Cai, L., & Yao, W. B. (2008). In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from Choerospondias axillaris fruit. *Food chemistry*, *106*(3), 888-895. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.068

Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, *60*, 481-492. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3

Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, *105*(3), 940-949. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038

Xu, X., Sun, L., Dong, J., & Zhang, H. (2009). Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon dioxide. *Innovative food science & emerging technologies*, *10*(1), 42-46 . https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.08.004

Yanishlieva, N. V., & Marinova, E. M. (1996). Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, *203*, 220-223. https://doi.org/10.1007/bf01192867

Yıldız, O., Can, Z., Saral, Ö., Yuluğ, E., Öztürk, F., Aliyazıcıoğlu, R., Canpolat, S., & Kolaylı, S. (2013). Hepatoprotective potential of chestnut bee pollen on carbon tetrachloride-induced hepatic damages in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*(1), 461478. https://doi.org/10.1155/2013/461478

Yonis, M., & Hassan, A. (2023). The Effect of adding bee pollen on the sexual efficiency of quail males. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, *8*(1), 32-37. https://doi.org/10.21608/javs.2022.164168.1180

Yousif, A. I., Abd-Elaziz, M. A. & Shehabeldin, A. M. (2024). Nano-oleic Acid in Tris-Extender: Effects on Bull Sperm Cryopreservation, Fertility, and Post-thaw Antioxidant Status. *Journal of Sustainable Agricultural and Environmental Sciences*,3(4): 9-18. https://doi.org/10.21608/jsaes.2024.299701.1091