The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

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

Effect of rosemary leaf powder on sperm motility parameters and acrosome integrity in rooster under heat stress condition

Leyla Seyfi[1], Saied Mohammadzadeh[2]✉, Mosayeb Amiri [3]

1. Stuff of Jahad Keshavarzi of Khoramabad, Iran. Email: l.seifi6083@gmail.com
2. Corresponding author, Department – School of Agriculture, Lorestan university, Khoramabad, Iran. Email: mohammadzadehsa@gmail.com
3. Department – School of Agriculture, Lorestan university, Khoramabad, Iran. Email: mosaiebamiri@yahoo.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 31 January 2023

Received in revised form: 1 March 2023

Accepted: 3 April 2023

Published online: 23 September 2023

Keywords:

Acrosome integrity,

Heat stress,

Rooster,

Rosemary leaf powder.

ABSTRACT

Oxidative stress plays a key role in sperm structure and function, semen quality and fertility. In poultry industries lipid peroxidation increases under chronic heat stress, particularly when the temperature exceeds 27 °C. In this situation, some practices are taken. One of important action is using pharmacological plant because of the lowest side effects. There is an increasing interest for applying natural antioxidants compare to synthetic because of the safety and low toxicity problems. The pharmacological plant generally used among foods. The use of natural antioxidant decreases sperm disorders and increases fertility. The rosemary has biological antioxidant mechanisms and belonging to thorny pharmacological plant, which is widely distributed in Europe and South-Eastern Asia. It has used in traditional medicine for its therapeutic properties. The Rosemarinus officinalis L. an evergreen perennial aromatic shrub belonging to the family Labiatae, commonly called rosemary. The rosemary is commonly used as a spice and flavoring agent in food processing. The rosemary contains some antioxidant phenolic that have been shown to provide a defense against oxidative stress from oxidizing agents and free radicals. The antioxidant capacity of rosemary is mainly related to the presence of components like carnosol, rosmanol, isorosmanol, epirosmanol, carnosic and rosmarinic acids. The antioxidant capacity of sperm is low, but enzymatic and non-enzymatic antioxidants in the seminal plasma protect sperm by scavenging the reactive oxygen species (ROS).

Cite this article: Seyfi, L., Mohammadzadeh, S., & Amiri, M. (2023). Effect of rosemary leaf powder on sperm motility parameters and acrosome integrity in rooster under heat stress condition. *Iranian Journal of Animal Science*, 54 (4), 419-432. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2023.354140.653930

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2023.354140.653930

Extended Abstract

Introduction

Oxidative stress plays a key role in sperm structure and function, semen quality and fertility. In poultry industries lipid peroxidation increases under chronic heat stress, particularly when the temperature exceeds 27 °C. In this situation, some practices are taken. One of important action is using pharmacological plant because of the lowest side effects. There is an increasing interest for applying natural antioxidants compare to synthetic because of the safety and low toxicity problems. The pharmacological plant generally used among foods. The use of natural antioxidant decreases sperm disorders and increases fertility. The rosemary has biological antioxidant mechanisms and belonging to thorny pharmacological plant, which is widely distributed in Europe and South-Eastern Asia. It has used in traditional medicine for its therapeutic properties. The Rosemarinus officinalis L. an evergreen perennial aromatic shrub belonging to the family Labiatae, commonly called rosemary. The rosemary is commonly used as a spice and flavoring agent in food processing. The rosemary contains some antioxidant phenolic that have been shown to provide a defense against oxidative stress from

oxidizing agents and free radicals. The antioxidant capacity of rosemary is mainly related to the presence of components like carnosol, rosmanol, isorosmanol, epirosmanol, carnosic and rosmarinic acids. The antioxidant capacity of sperm is low, but enzymatic and non-enzymatic antioxidants in the seminal plasma protect sperm by scavenging the reactive oxygen species (ROS).

Materials & Methods

This experiment was conducted to investigate semen characteristics of rooster semen through feeding with rosemary leaf powder under heat stress. In starting of experiment fresh rosemary leaves were collected, cleaned, sliced, dried and milled, then stored (22–25 °C) in plastic bags. The forty native healthy and fertile roosters aged (42 weeks) and weighted (2.3 ± 0.1 kg) were selected. The photometer and thermometer device were used for adjust the temperature and light automatically. The roosters were fed a basic diet pellet feed (120 g per animal) containing 2780 cal / kg of metabolizable energy and 12.5% protein. The rooster access to water. The animals were designed factorial with two factors and two levels including temperature (20-23 control and 28-30◦C) and rosemary leaf powder including (control (0) and rosemary 7.5 gr/kg of ration) in a randomized complete design with ten replication. The experimental and acclimatization period were 7 and 2 weeks respectively. To accustom the roosters to semen ejaculation, two back-abdominal rubs were performed every week. Semen samples transferred immediately after collection to the laboratory for semen analysis. Semen parameters were evaluated motility, viability (CASA parameters), abnormality and acrosome integrity. The data of experiment considered using SPSS statistical software analysis.

Results

The rosemary leaf powder increased motile sperm type C significantly. The heat stress significantly decreased sperm motility type A and viability but sperm abnormality was increased. In heat stress condition rosemary leaf powder (7.5 g/kg in basal ration) due to antioxidant compounds protected the acrosome and some motile parameters. The heat stress negatively affects in some semen parameters. In this study, we demonstrate that heat stress negatively affected fertility and acrosome integrity. The rosemary leaf powder alone showed promising relieving effects. Although heat stress reduced the effect of rosemary leaf powder on the motility, but using leaf powder in diet under optimal temperature conditions improved the motility rate (76.6%). The rearing roosters in optimal temperature conditions and using rosemary leaf powder increased the rate of rapid and progressive sperm movements (Type A). The addition of rosemary extract in the extender also had significant and positive effects, in this reason application of rosemary extract in the goat, ram, mouse and rabbit increased sperm motility and semen quality. The use of rosemary leaf powder containing antioxidants can somehow reduce ROS and lead the system towards balance. The use of rosemary essential oil in the diet of rooster broiler lines was able to increase semen parameters such as the sperm head movement, the speed of sperm in a straight line and the average speed in a straight line, membrane activity, the percentage of total motile sperm and viability. The rate of dead sperm was decreased also. Our study shows a decrease in the semen parameters of roosters exposed with heat stress. The feeding rosemary in heat stress condition can reduce the effects of lipid peroxidation and ROS.

Conclusion

The components in rosemary plant leaf powder are able to protect sperm motility and acrosome integrity. In this situation microscopic examination of testicular tissue with determination of androgen hormones are recommended.

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۴، شماره ۴

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

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

تأثیر پودر برگ رزماری روی فراسنجه‌های حرکتی منی و سلامت آکروزوم اسپرم خروس در شرائط تنش حرارتی

لیلا سیفی[۱] | سعید محمدزاده[۲]✉ | امیری، مسیب[۳]

۱. کارشناس جهاد کشاورزی خرم‌آباد ، ایران. رایانامه: l.seifi6083@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، خرم اباد، ایران. رایانامه: mohammadzadehsa@gmail.com

۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، خرم اباد، ایران. رایانامه: mosaiebamiri@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۱۴

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱

کلیدواژه‌ها:

پودر برگ رزماری، تنش گرمایی، خروس، سلامت آکروزم.

چکیده

استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌تواند آسیب‌های اسپرم را کاهش و باروری را افزایش دهد. این پژوهش به منظور بررسی فراسنجه‌های منی خروس با تغذیه پودر برگ رزماری در شرایط تنش گرمایی انجام شد. تعداد ۴۰ قطعه خروس بالغ بومی در سن ۴۲ هفتگی با وزن تقریبی ۰/۱±۲/۳ کیلوگرم، انتخاب و با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در قفس‌های انفرادی تقسیم‌بندی شـــدند. تأثیر درجه حرارت در دو سطح (C° 23-20 و تنش حرارتی (C° 30 -28) و استفاده از پودر برگ رزماری در جیره در دو سطح (صفر و ۷/۵ گرم در کیلوگرم جیره) در ده تکرار بررسی شد. طول مدت آزمایش هفت هفته بود. نمونه‌های منی از نظر فراسنجه های تحرک، زنده‌مانی، ناهنجاری اسپرم و سلامت آکروزوم مورد ارزیابی قرار گرفت. استفاده از پودر برگ رزماری بطور معنی‌داری درصد تحرک پیشرونده نوع A اسپرم‌ها را افزایش داد (P <۰/۰۵).تنش حرارتی در افزایش ناهنجاری اسپرم وکاهش نرخ زنده‌مانی تأثیر معنی‌داری داشت (P< ۰/۰۵). نرخ سلامت آکروزوم اسپرم در تیمار خروس‌های تغذیه شده با جیره حاوی پودر برگ رزماری و دمای C° 23-20 از مقدار بیشتری نسبت به تیمار شاهد برخوردار بود (P<۰/۰۵). بر اساس نتایج به دست آمده از این آزمایش؛ در شرایط تنش حرارتی، استفاده از ۷/۵ گرم پودر برگ رزماری در کیلوگرم جیره پایه به دلیل داشتن محتوای آنتی‌اکسیدانی از آکروزوم و برخی فراسنجه‌های تحرک اسپرم محافظت نمود. ترکیبات موجود در پودر برگ گیاه رزماری قادرند از اسپرم و ساختار مختلف آن از جمله غشاء پلاسمائی و آکروزوم محافظت کند. استفاده از این گیاه در تنش حرارتی می تواند اثرات پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش دهد. بررسی میکروسکوپی بافت بیضه به همراه سنجش هورمون های آندروژنی توصیه می‌شود.

استناد: سیفی، لیلا؛ محمدزاده، سعید؛ و امیری، مسیب (۱۴۰۲). تأثیر پودر برگ رزماری روی فراسنجه‌های حرکتی منی و سلامت آکروزوم اسپرم خروس در شرائط تنش حرارتی. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۴ (۴)، ۴۳۲-۴۱۹. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2023.354140.653930

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2023.354140.653930

مقدمه

تنش گرمایی باعث کاهش عملکرد و در بسیاری از موارد منجربه مرگ جوجه‌های گوشتی می‌گردد (Quinteiro-Filho *et al*., 2012). با افزایش دمای بدن جریان خون محیطی بدن افزایش در حالی‌که جریان خون احشایی بشدت کاهش و در نتیجه مصرف غذا، عملکرد و بازده تبدیل خوراک کاهش می‌یابد (Karami *et al*., 2018) به علاوه تنش گرمائی روی کیفیت منی خروس تأثیر منفی دارد (AS., 2013). به طور طبیعی در بیضه برای جلوگیری از تنش اکسیداتیو، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. آنتی‌اکسیدان‌ها در مایع منی شامل دو گروه آنزیمی و غیرآنزیمی هستند به طوری که فعالیت رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده و اسپرم را از اثرات زیان‌بار گونه‌های فعال اکسیژن[1]ROS محافظت می‌کنند (Ommati *et al*., 2013). تنش گرمایی مزمن و حاد می‌تواند سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی را مختل و در نتیجه تجمع رادیکال‌های آزاد در بدن تنش اکسیداتیو ایجاد نماید به همین دلیل گرمای بالا یکی از عوامل ناباروری است (Kumar *et al*., 2018). تنش گرمایی و به دنبال آن تنش اکسیداتیو تأثیر زیادی روی عملکرد، تحرک و باوری اسپرم ایجاد نمود (Attia *et al*., 2019). تنش گرمایی بر عملکرد بیضه تأثیر منفی داشت و منجر به آسیب DNA و کاهش کیفیت منی گردید (Ayo *et al*., 2011, Türk *et al*., 2016). به علاوه تنش گرمایی فرآیند اسپرماتوژنز را مختل و باعث تولید اسپرم‌های غیرطبیعی شد (McDaniel *et al*., 2004). از آنجائی که غشاء پلاسمائی اسپرم پرندگان غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع می‌باشد، نسبت به تاثیرات سوء ROS و پراکسیداسیون لیپیدی مستعد و حساس است و در نهایت می‌تواند حیوان را نابارور کند (Surai *et al*., 2017).

آکروزوم اسپرم حاوی آنزیم‌های هیدرولیتیک (آبکافتی) متعددی است که در لقاح و بارور کردن تخمک نقش مهمی دارند (Blesbois *et al*., 2005). از آنجائیکه این بخش از اسپرم حساس و می‌تواند تحت تاثیر تنش اکسیداتیو قرار گیرد، بنابراین شاخص سلامت ساختار آکروزوم به عنوان یکی از معیارهای سودمند در ارزیابی منی است.

با توجه به آلودگی و افزایش درجه حرارت کره زمین، در سال‌های اخیر توجه بیشتر محققین به کاهش اثرات زیانبار تنش گرمایی در صنعت مرغداری معطوف شده و سعی دارند تا با دستکاری جیره، از جمله استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، این اثرات را به حداقل برسانند بنابراین هدف از استفاده آنتی‌اکسیدان‌ها محدود کردن و کاهش فعالیت رادیکال‌های آزاد است (Khan, 2011). استفاده از مکمل‌های خوراکی به همراه آنتی‌اکسیدان‌های حاوی ویتامین E سلنیوم، ویتامین C و آنتی‌اکسیدان-های آنزیمی به طور معنی‌داری موجب سلامت و افزایش کیفیت اسپرم شد (Zarghi *et al*., 2015). کاربرد آنتی اکسیدان‌ها در تغذیه، منجر به حفاظت اسپرم علیه آسیب‌های القا شده با تنش اکسیداتیو شد (Gharagozloo *et al*., 2016, Surai *et al*., 2019) علاوه بر این، محققین جهت کاهش تنش گرمایی، در کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نسبت به صنعتی توجه و تمایل بیشتری دارند (Hu et al., 2019). درمیان گونه‌های گیاهان، گیاه رزماری یا اکلیل کوهی با نام علمی *Rosemarinus Officinalis* از خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) به عنوان گیاه دارویی و معطر با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی در صنایع غذایی و داروسازی استفاده می‌شود (Zarghi *et al*.,2015). استفاده از عصاره روغنی رزماری در رقیق‌کننده منی خروس، تأثیر مثبت روی فراسنجه‌های اسپرم در شرایط سرد (چهار درجه سانتی‌گراد) ایجاد نمود (Touazi *et al*., 2018). استفاده از رزماری بدلیل داشتن ترکیبات پلی‌فنل تأثیر مثبت روی منی منجمد خوک (Malo *et al*., 2010) سگ (González *et al*., 2010) و قوچ (Gil *et al*., 2010) ایجاد کرد. نرخ باروری تخم‌مرغ (انکوباسیون و توسعه بلاستودرم) در خروس‌هائی که ۵ و۷/۵ گرم در کیلوگرم جیره از پودر برگ رزماری تغذیه شدند به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار۲/۵و شاهد بود (Borghei-Rad *et al*., 2017).

تاکنون تحقیقی در خصوص بررسی استفاده از پودر برگ گیاه رزماری بهمراه تنش حرارتی در باروری خروس‌ها انجام نشده است. هدف از انجام پژوهش حاضر امکان افزودن پودر برگ گیاه رزماری به جیره غذایی خروس‌های بومی درتنش گرمایی و بررسی اثرات این گیاه روی برخی فراسنجه‌های اسپرم شامل درصد تحرک، ناهنجاری، زنده‌مانی و سلامت آکروزوم بود.

1. Reactive Oxygen Species

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تعداد ۴۰ قطعه خروس بومی هم سن (۴۲ هفتگی) با وزن (۰/۱ ± ۲/۳ کیلوگرم)، سالم و بارور از مرکز اصلاح نژاد و پرورش مرغ بومی استان اصفهان تهیه شد. خروس‌ها در آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور، فاکتور اول شامل درجه حرارت سالن پرورش; کنترل ۲۳–۲۰ درجه سانتیگراد و تنش حرارتی ۳۰ –۲۸ درجه سانتیگراد و فاکتور دوم شامل پودر برگ رزماری; کنترل بدون افزودن پودر برگ رزماری و ۷/۵ گرم در کیلوگرم جیره پایه در قالب آزمایش فاکتوریل طرح کامل تصادفی با ۱۰ تکرار بصورت انفرادی تقسیم‌بندی شدند. طول دوره آزمایش هفت هفته بود. دوره عادت پذیری دو هفته در نظر گرفته شد. خروس‌ها به صورت تصادفی در قفس‌های انفرادی توزیع و روزانه در دو نوبت صبح و عصر با جیره‌های آزمایشی (جدول ۱) تغذیه شدند. در طول دوره آزمایش، برنامه نوری ۱۴ ســاعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی به صورت خودکار برای خروس‌ها اعمال شد. برای عادت پذیری خروس‌ها به اسپرم‌دهی، هر هفته دو نوبت بخش پشتی–شکمی مالش داده شد. پس از عادت پذیری، در هفته هفتم، از طریق ماساژ ناحیه شکمی نمونه منی از تمام خروس‌ها جمع‌آوری شد. نمونه منی توسط سمپلر (میکروپیپت) از ناحیه کلواک جمع‌آوری و بلافاصله بداخل میکروتیوب ریخته شد سپس با فلاکس به آزمایشگاه منتقل و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بررسی نمونه‌ها به صورت زیر انجام گرفت.

جدول ۱. جیره خروس‌ها در تیمارهای مختلف آزمایشی.

اجزای تشکیل‌دهنده	مقدار (کیلوگرم)	ترکیب مواد مغذی	
ذرت	۶۵۰	انرژی متابولیسمی (کیلوگرم/کیلوکالری)	۲۷۸۰
گندم	۳۵	پروتئین خام (٪)	۱۲/۵
کنجاله سویا	۳۰	کلسیم (٪)	۰/۷
سبوس گندم	۱۴۵	فسفر قابل‌دسترس (٪)	۰/۳۵
کربنات کلسیم	۹	متیونین (٪)	۰/۳۵
دی کلسیم فسفات	۱۳	متیونین + سیستئین (٪)	۰/۶۰
نمک طعام	۲/۵	لیزین (٪)	۰/۵۵
جوش‌شیرین	۱/۵	ترئونین (٪)	۰/۴۶
مکمل ویتامینه ۱ ۰/۲۵ درصد	۲/۵	کولین (کیلوگرم/میلی‌گرم)	۱۳۰۰
مکمل معدنی ۲ ۰/۲۵ درصد	۲/۵	سدیم (٪)	۰/۱۵
دی ال متیونین	۱/۳	کلر (٪)	۰/۱۷
کولین کلراید ۶۰ درصد	۰/۷	پتاسیم (٪)	۰/۶۵
زئولیت	۶/۳		
توکسین بایندر	۰/۷		
مجموع	۱۰۰۰		

هر کیلوگرم حاوی ۹۰۰۰ IU ویتامین A، ۱/۸ میلی‌گرم ویتامین B_1، ۶/۶ میلی‌گرم ویتامین B_2، ۳۰ میلی‌گرم نیاســین، ۳ میلی‌گرم ویتامین B_6، ۰/۰۱۵ میلی‌گرم ویتامین B_{12}، ۰/۱ میلی‌گرم بیوتین، ۲۰۰۰ IU ویتامین D_3، ۱۸ IU ویتامین E، ۲ میلی‌گرم ویتامین،۲ میلی‌گرم ویتامین K_3، ۵۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید، ۱۰ میلی‌گرم کلسیم پانتوتنات، ۱ میلی‌گرم فولیک اسید تأمین می‌شود.۲– هر کیلوگرم جیره حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم منگنز (اکسید منگنز)، ۱۰۰ میلی‌گرم روی (اکسید روی)، ۱۰ میلی‌گرم مس (سولفات مس)، ۱ میلی‌گرم ید (کلسیم یدات)، ۰/۲ میلی‌گرم سلنیوم، ۵۰ میلی‌گرم آهن (فروس سولفات) تأمین می‌شود.

فراسنجه‌های منی

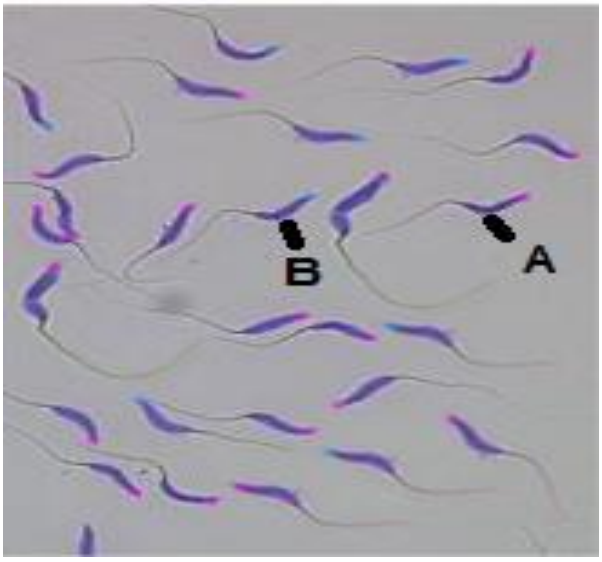
فراسنجه‌های مربوط به تحرک نمونه منی توسط میکروسکوپ نوری (مدل Pro.Way، کشور چین) مجهز به سیستم نرم افزاری CASA (شرکت هوشمند فن آور – تهران–ایران) انجام گرفت. مقدار پنج میکرولیتر از نمونه منی روی اسلاید مخصوص دستگاه قرار داده شد و در فیلدهای متفاوت دستگاه، فراسنجه‌ها تعیین شد. برای ارزیابی نرخ زنده‌مانی نمونه‌ها از محلول رنگ ائوزین –نیگروزین (WHO) استفاده شد. ابتدا یک حجم (۱۰ میکرولیتر) از نمونه منی با دو حجم (۲۰ میکرولیتر) از محلول

ائوزین–نیگروزین مخلوط و بمدت ۳۰ ثانیه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد، سپس از نمونه گسترش (اسمیر) تهیه شد. پس از خشک شدن نمونه گسترش، با استفاده از میکروسکوپ نوری اولمپوس (مدل CX21FS1، ژاپن) تعداد حداقل ۱۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم رنگ نشده به مجموع (نرخ زنده‌مانی) محاسبه گردید. در سلول‌های زنده امکان ورود رنگ ائوزین از غشای سلول زنده میسر نبوده و نیگروزین به عنوان رنگ تفریقی استفاده می‌شود (Borghei-Rad *et al*., 2017). با استفاده از لام‌های رنگ‌آمیزی شدن نرخ ناهنجاری اسپرم تعیین شد (شکل ۱).

شکل ۱. نرخ زنده‌مانی و ناهنجاری نمونه‌های اسپرم خروس بومی با استفاده از رنگ ائوزین و نیگروزین.
A: اسپرم زنده و طبیعی، B: اسپرم غیرزنده، C: اسپرم ناهنجار

سلامت آکروزوم

برای ارزیابی سلامت آکروزوم از رنگ‌آمیزی سه گانه (تریپان‌بلو، بیسمارک و رزبنگال) استفاده شد. پس از شستشوی نمونه‌ها با محلول PBS، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه منی هر تیمار داخل میکروتیوب ریخته و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول تریپان بلو ۱ درصد به آن اضافه شد. نمونه‌ها بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. بعد از خارج نمودن از انکوباتور، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر (۰/۵ میلی لیتر) از محیط کشت DMEM به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته و از رسوب داخل میکروتیوب گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن در مجاورت هوا، برای تثبیت نمونه‌ها از فرمالدئید ۳ درصد بمدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. اسلایدهای گسترش با محلول رنگ بیسمارک براون ۰/۲ درصد رنگ‌آمیزی و بمدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در مرحله بعد نمونه‌ها با آب مقطر شستشو و در مجاورت هوا خشک شدند سپس نمونه‌های گسترش یافته با محلول رنگی رزبنگال یک درصد رنگ آمیزی بمدت ۲۵ دقیقه، با آب مقطر شسته شدند این مرحله برای جلوگیری از زدودن رسوب رنگ اضافی روی لام‌ها انجام شد. نمونه‌ها در مجاورت هوا خشک شدند. سلامت اکروزوم اسپرم توسط میکروسکوپ فازکنتراست (مدل Olympus، ژاپن) با عدسی ۱۰۰ بررسی شد. اسپرم با آکروزوم صدمه دیده دارای سر آبی تیره رنگ، اسپرم با آکروزوم سالم دارای سر صورتی رنگ با هسته مشخص شمارش و نرخ سلامت آکروزوم تعیین شد (Peyravi *et al*., 2004) (شکل ۲).



شکل ۲. A: اسپرم با آکروزوم طبیعی، **B:** اسپرم با آکروزوم صدمه دیده

آنالیز آماری

آنالیز داده‌های آزمایش پس ازجمع‌آوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS Ver:16 (Univariate-GLM) انجام شد. میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال معنی‌داری ۰/۰۵ با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مقایسه شد.

مدل آماری مورد استفاده در آزمایش به شرح زیر می‌باشد:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + T_j + RT_{ij} + e_{ijk}$$

Yijk: هر مشاهده (داده) در آزمایش، µ: میانگین جامعه، Ri: اثر فاکتور پودر برگ رزماری، Tj: اثر فاکتور درجه حرارت اثرمتقابل پودر برگ رزماری و درجه حرارت، eijk: اثر خطای آزمایش.

نتایج

نتایج تأثیر تیمارهای آزمایشی تغذیه با پودر برگ رزماری و تأثیر درجه حرارت روی فراسنجه‌های نمونه منی در جدول ۲ و ۳ ارائه شده است، تنش گرمایی درصد جنبائی (M) نمونه منی خروس را به طور معنی‌داری کاهش داد (P< ۰/۰۵). اختلاف معنی‌داری در فراسنجه‌های حرکتی اسپرم شامل حرکات B، C و D مشاهده نشد ولی افزودن پودر برگ رزماری، فراسنجه‌های A، VCL، VAP، VSL، ALH و MAD به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۱: P<۰/۰۵).

جدول ۲. اثرات درجه حرارت و پودر برگ رزماری بهمراه اثر متقابل روی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم

Table 2. Effect of temperature and rosemary powder and interaction on motility sperm parameters

اثر/فراسنجه Parameters/Effect		A	B	C	D	LI	WOB	VCL	VAP	VSL	ALH	BCF	MAD
درجه حرارت (سلسیوس) Temperature ◦C													
۲۰–۲۳		۱۵/۵	۲۲/۱	۱۰/۲۴	۶۷/۸	۱۵/۸	۲۳/۷	۲۲/۳	۱۲/۶	۸/۵	۰/۶	۱/۱	۲۶/۵
۲۸–۳۰		۱۰/۶	۲۲/۱۲	۱۱/۴۰	۵۸/۲	۱۸/۳	۲۸/۳	۲۲/۴	۱۲/۵	۸/۹	۰/۶	۱	۲۱/۹
SEM		۲/۲۳	۴/۲	۲/۱۹	۶/۲۹	۳/۱۶	۴/۰۷	۳/۸۷	۲/۷۷	۲/۳۹	۰/۲	۰/۲۹	۲/۱۶
رزماری (گرم/کیلوگرم) Rosemary gr/Kg													
۰		۶/۴b	۲۱/۷	۱۰/۵۴	۶۴/۸	۱۴	۲۲/۱	۱۴/۲B	۷/۲b	۴/۸B	۰/۲	۰/۹	۱۶/۱b
۷/۵		۱۹/۷a	۲۲/۵۲	۱۱/۱۰	۶۱/۲۷	۲۰/۱	۲۹/۹	۳۰/۵a	۱۷/۹a	۱۲/۶A	۱a	۱/۲	۳۲/۳a
EM+S		۲/۲۳	۴/۲	۲/۱۹	۶/۲۹	۳/۱۶	۴/۰۷	۳/۸۷	۲/۲۷	۲/۳۹	۰/۲B	۰/۲۹	۵/۱۶
رزماری ×درجه حرارت Temperature*Rosemary													
۰	۲۰–۲۳	۱۵/۴B	۲۰/۵	۸/۶۱	۶۱/۲	۱۶	۲۹/۲	۱۲/۴	۶/۴	۴/۴	۰/۲	۱	۱۵/۶
۰	۲۸–۳۰	۷/۴c	۱۹/۲	۱۴/۲	۶۸/۴	۱۲	۱۶/۸	۱۶	۸	۵/۲	۰/۲	۰/۸	۱۶/۶
۷/۵	۲۰–۲۳	۲۵/۶a	۲۵	۶/۸۳	۵۵/۳۵	۲۰/۶	۳۰/۶	۳۲/۲	۱۸/۸	۱۲/۶	۱	۱/۲	۳۷/۴
۷/۵	۲۸–۳۰	۱۳/۸b	۲۴/۲	۱۳/۶	۶۷/۲	۱۹/۶	۲۷/۴	۲۸/۸	۱۷	۱۲/۶	۱	۱/۲	۲۷/۲
SEM		۳/۱۵	۶/۰۶	۳/۳۲	۸/۹۰	۴/۴۸	۵/۷۵	۵/۴۷	۳/۹۲	۳/۳۹	۰/۲۸	۰/۴۲	۷/۳

(A) درصد اسپرم‌های سریع و پیشرونده (حرکت مستقیم). %Straight Movement ، (B) درصد اسپرم‌های با حرکت موجی .%Wave shape ، (C) درصد اسپرم‌ها با حرکت درجا. % Move in place، (D) در صد اسپرم‌های غیر متحرک. %Immotile، Linear index (LI) درصد معیار خطی بودن حرکت (VSL/VCL)، (WOB) نرخ حرکات تند و زیگزاکی اسپرم حول مسیر میانگین Wobble، (VCL) سرعت واقعی اسپرم‌ها در مسیر واقعی (میکرومتر بر ثانیه) Velocity of curved line،µm/s، (VAP) میانگین سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر بر ثانیه)µm/s، (VSL) سرعت حرکت مستقیم اسپرم‌ها (میکرومتر بر ثانیه) Velocity of straight line µm/s ، (ALH) درصد دامنه نوسانات حرکت اسپرم‌ها amplitude of Lateral head، (BCF) فرکانس نوسانات اسپرم‌ها (تعداد nBeat Cross frequenc) ، (MAD) متوسط زاویه چرخش Mean angular displacement، SEM: میانگین خطای استاندارد Standard Error Mean.

حروف کوچک غیرمشابه در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌داربین تیمارهای آزمایشی می‌باشد (P<۰/۰۵).

Small letter in rows shows significant different between experimental treatment (P<0.05).

جدول ۳. اثرات درجه حرارت و افزودن پودر رزماری بهمراه اثر متقابل روی تحرک، سلامت آکروزوم، ناهنجاری و زنده‌مانی اسپرم

Table 3. Effect of temperature and rosemary powder and interaction on sperm motility, Acrosome integrity, Abnormality and Viability

اثر/فراسنجه Parameters/Effect	جنبائی Motility	سلامت آکروزوم Acrosome integrity	ناهنجاری Abnormality	زنده‌مانی Viability
درجه حرارت (سلسیوس) Temperature °C				
۲۰-۲۳	۵۶/۷a	۴۶/۳ a	۴۱/۵ b	۸۳/۹ a
۲۸-۳۰	۳۶b	۲۶/۸ b	۵۵/۴a	۷۳/۲ b
SEM	۴/۸	۲/۲۲	۲/۳	۲/۱۷
رزماری (گرم/کیلوگرم) Rosemary gr/Kg				
۰	۳۷/۳ b	b۲۹	۴۷/۷	۷۶/۸
۷/۵	۵۵/۴ a	۴۴/۱ a	۴۹/۲	۸۰/۸
SEM	۴/۸	۲/۲۲	۲/۳	۲/۱۷
رزماری ×درجه حرارت Temperature*Ro				
۲۰-۲۳ 0	۳۶/۸ b	۴۰/۲ b	۴۱/۸	۸۳
۲۸-۳۰ 0	۳۴/۲ b	۲۷/۸ c	SEM۲/۲	P-Value۷۰/۶ Parameter
۲۰-۲۳ ۷/۵	۷۶/۶ a	۵۲/۴ a	۴۱/۲	T1۸۴/۸ T2 R1 R2
۲۸-۳۰ ۷/۵	۳۷/۸b	۳۵/۸ b	۵۳/۶	۷۶/۸ در صد زنده‌مانی ٪Viability
SEM	۶/۸	۳/۱۵	۳/۲۶ 0.01	83.9a ۷۴.۸ 73.2b 76.8 80.8 2.17
				درصد سلامت اکروزومی ٪Acrosome integrity
				46.3a 26.8b 29b 44.1a 2.22 0.05
				درصد ناهنجاری ٪Abnormality
				41.5b 55.4a 47.7 49.2 2.3 0.01

حروف کوچک غیرمشابه در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی می‌باشد (P<۰/۰۵).
میانگین خطای استاندارد: Standard Error Mean (SEM)
Small letter in rows shows significant different between experimental treatment (P<0.05).

اثر متقابل بین تغذیه با پودر برگ رزماری و درجه‌حرارت روی فراسنجه‌های تحرک اسپرم در جداول۲ و ۳ ارائه شده است. با توجه به نتایج اثر متقابل بین کنترل درجه‌حرارت و افزودن پودر برگ رزماری، نرخ فراسنجه A (حرکت پیش‌رونده) و جنبائی (M) معنی‌دار و در مقایسه با سایر تیمارها حداکثر و بترتیب به ۲۵/۶ و ۷۶/۶ درصد رسید (P<۰/05). کمترین نرخ جنبانی مربوط به اثر متقابل بین تنش گرمایی و جیره فاقد پودر برگ رزماری بود. در برخی فراسنجه‌های حرکتی مانند B، C، و D، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

در جدول ۳ اثر متقابل درجه‌حرارت و پودر برگ رزماری در نرخ زنده‌مانی اسپرم، یکپارچگی آکروزوم و ناهنجاری اسپرم در خروس‌های بومی ارائه شده است. نرخ زنده‌مانی اسپرم در خروس‌های تحت تنش گرمایی به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). استفاده از پودر برگ رزماری در تغذیه خروس‌ها در نرخ زنده‌مانی اسپرم تأثیر معنی‌داری نداشت ولی افزودن پودر برگ رزماری به جیره، نرخ سلامت اکروزمی اسپرم را به طور معنی‌داری افزایش داد (P<۰/۰۵). تنش گرمایی، ناهنجاری اسپرم را به طور معنی‌داری افزایش وبه ۵۵/۴ درصد رساند (P<۰/۰۱) لیکن افزودن پودر برگ رزماری در زمان تنش حرارتی نرخ سلامت اکروزمی را تقریباً به دو برابر (۱۷/۸ در مقابل ۳۵/۸ درصد) افزایش داد. در جدول ۳، با بررسی اثر متقابل درجه حرارت و افزودن پودربرگ رزماری، اختلاف معنی‌داری در نرخ زنده‌مانی و ناهنجاری اسپرم مشاهده نشد.

بحث

در آزمایش حاضر گرما نرخ جنبائی اسپرم خروس را به طور معنی‌داری کاهش داد. مطابق با تحقیق حاضر تنش گرمایی باعث اختلال در روند اسپرماتوژنز، کاهش کیفیت اسپرم و پارامترهای حرکتی اسپرم شد. گرما سبب مرگ سلولی و کاهش وزن بیضه شد(Setchell *et al*., 2002). در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد درصد اسپرم‌های مرده افزایش و به دنبال آن کیفیت منی (باروری و زنده‌مانی) کاهش یافت (McDaniel *et al*., 2004). سلول‌های زایای جنسی به گرما حساس‌اند. در موش، گرما سبب تخریب میتوکندری، اتساع شبکه اندوپلاسمی، گسترش فضا در سلول‌های سرتولی و اسپرماتید شد (Kanter *et al*., 2013). در میمون گرما روی سلول‌های سرتولی تاثیر برگشت پذیر داشت بطوریکه موجب بازگشت سلول‌های سرتولی بالغ به نابالغ شد (Zhang *et al*., 2006). ساز و کار گرما به گونه‌ای است که در شرائط تنش گرمایی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید و فعالیت میتوکندری اسپرم‌ها مختل می‌شود؛ از آنجایی که میتوکندری با تولید انرژی رایج سلولی (ATP) در تحرک اسپرم نقش اساسی داشته، اختلال در میتوکندری منجر به کاهش تحرک اسپرم می‌گردد. به عبارت دیگر با افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون چربی غشاء میتوکندری، تولید ATP دچار اختلال می‌شود. دو عامل اختلال در میتوکندری و آسیب در آکسونوم اسپرم سبب کاهش تحرک اسپرم شدند (Sanocka and Kurpisz, 2004, Ashok *et al*., 2014). یکی از علل آپاپتوزیس در بافت بیضه عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها است (Paul *et al*., 2009) که نتیجه آن تخریب DNA و مرگ برنامه ریزی سلولی القا شد (Paul *et al*., 2008). رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) سبب القای پراکسیداسیون لیپیدی (Surai *et al*., 2001)، قطعه‌قطعه شدن DNA و اختلال در حرکت اسپرم می‌شوند. در این آزمایش علت کاهش تحرک اسپرم را می‌توان بدلیل بهم خوردن سیستم تعادلی بین رادیکال‌های آزاد و سیستم آنتی‌اکسیدانی بیضه عنوان نمود بدین‌گونه که با بهم خوردن تعادل در شرائط تنش حرارتی، گونه‌های فعال اکسیژن روی چربی‌غشاء میتوکندری تأثیر و تولید انرژی سلولی را برای جنبائی کاهش داد. همچنین احتمالاً با تاثیر گونه‌های فعال اکسیژن، اکسونوم اسپرم دچار آسیب و موجب کاهش جنبائی و افزایش ناهنجاری اسپرم شد (جدول ۳). تنش حرارتی می‌تواند از طریق آسیب به فرایند اسپرماتوژنز تأثیر جدی ایجاد نموده و بشدت موجب مهار تقسیم سلول‌های جنسی گردد (Rao *et al*., 2015). گرما روی سلول‌های زایا از طریق کمبود اکسیژن (هیپوکسی) موجب تنش اکسیداتیو و القای مرگ برنامه‌ریزی سلول (آپوپتوز) شد (Tavalaee *et al*., 2018). سلول اسپرم در مقایسه با سلول‌های پیکری (سماتیک) به ROS حساس‌ترند زیرا سیستم آنتی‌اکسیدانی محدودتری دارند. به نظر می‌رسد وجود

این حساسیت و گونه‌های فعال اکسیژن در بافت بیضه خروس‌های بهمراه تنش حرارتی، نرخ جنبائی و زنده‌مانی اسپرم کاهش و ناهنجاری افزایش یابد.

از مهمترین فاکتورهای مورد ارزیابی در کیفیت منی، سلامت آکروزوم اسپرم است. آکروزوم حاوی آنزیم‌های آبکافتی (هیدرولیتیک) است و مانند یک کلاهک، ناحیه قدامی هسته را می‌پوشاند، این آنزیم‌ها در لقاح و بارور ساختن تخمک نقش مهمی دارند (Blesbois *et al*., 2005). در طی فرایند متابولیسم، گونه‌های فعال اکسیژن شامل سوپرااکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و هیپوکلریت در بیضه تولید شده به نحوی که به ظرفیت‌گیری (کاپاسیتاسیون)، واکنش اکروزمی و اتصال اسپرم به تخمک کمک می‌کنند (Agarwal *et al*., 2012). با تنش حرارتی، سیستم آنتی‌اکسیدانی اسپرم نامتعادل، و غلظت گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد. نخستین تاثیر ROS کاهش سیالیت غشاء پلاسمائی اسپرم است، در نتیجه این تغییرات فعالیت آکروزوم و فرایند لقاح کاهش می‌یابد (Douard *et al*., 2004). از طرفی نرخ پراکسیداسیون لیپیدی بدلیل وجود مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در غشاء اسپرم طیور، بالا است. در این آزمایش با تنش حرارتی نرخ سلامت اکروزمی بطور بسیار معنی‌داری کاهش و تقریباً به نصف رسید (۴۶/۳ در مقابل ۲۶/۸ درصد) (جدول ۲). به نظر می‌رسد علت کاهش نرخ سلامت آکروزومی و زنده‌مانی، افزایش بیش از حد ROS و بهم خوردن سیستم آنتی‌اکسیدانی باشد که با افزایش احتمالی گونه‌های فعال اکسیژن، سیالیت غشاء کاهش و سبب شد تا براحتی غشاء اسپرم نفوذ پذیر و نرخ زنده‌مانی کاهش یابد.

استفاده از ترکیبات حاوی آنتی‌اکسیدانی به نحوی می‌تواند ROS را کاهش و سیستم را به سمت تعادل هدایت نماید. استفاده از اسانس رزماری در جیره خروس‌های گوشتی قادر بود فراسنجه‌های دامنه جابجایی سر اسپرم، سرعت اسپرم در مسیر مستقیم، میانگین سرعت در مسیر مستقیم، جنبائی، فعالیت غشاء، درصد کل اسپرم متحرک و زنده‌مانی را افزایش و نرخ اسپرم‌های مرده را کاهش دهد (Shokrani *et al*., 2017). استفاده از پودر برگ رزماری در جیره خروس‌های نژاد راس موجب افزایش تحرک اسپرم‌ها و کیفیت منی گردید (Shariatmadari *et al*., 2020) و استفاده از روغن رزماری در جیره بلدرچین‌های ژاپنی در شرایط تنش گرمایی موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی شد (Türk *et al*., 2016). در آزمایش حاضر، افزودن پودر برگ رزماری به جیره خروس‌های بومی نشان داد که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در پودر برگ رزماری می‌توانند تنش اکسیداتیو ناشی از حرارت را کاهش و از طریق محافظت غشاء اسپرم، جنبائی، برخی فراسنجه‌های آن مانند فراسنجه‌های حرکتی A، MAD، VCL, VAP, VSL, ALH و زنده‌مانی را به طورمعنی‌داری افزایش دهد (جدول ۲). علی‌رغم اینکه تنش گرمائی اثر پودر برگ گیاه رزماری را در نرخ جنبانی کمتر نمود لیکن افزودن پودر آن به جیره خروس‌ها در شرائط بهینه درجه حرارت، نرخ جنبائی (۷۶/۶ درصد) را بهبود داد (جدول ۳). پرورش خروس‌ها در شرائط بهینه درجه حرارت و افزودن پودر برگ گیاه رزماری، نرخ حرکات سریع و پیش‌رونده اسپرم (حرکت A) را افزایش داد (جدول ۲). نکته قابل توجه اینکه افزودن عصاره رزماری در رقیق کننده اسپرم اثرات مثبتی ایجاد کرد به طوری که استفاده آن در رقیق کننده منی بز (Zanganeh *et al*., 2013)، قوچ (Motlagh *et al*., 2014)، موش (Tousson *et al*., 2018)، خرگوش (Attia *et al*., 2017)، سبب افزایش تحرک اسپرم‌ها و کیفیت منی گردید. در این آزمایش علی رغم کاهش معنی‌دار سلامت آکروزم با تنش گرمائی، افزودن پودر برگ گیاه رزماری به جیره خروس‌ها، موجب شد تا از آکروزوم اسپرم حفاظت و نرخ سلامت آنرا افزایش دهد. با توجه به تأثیر معنی‌دار تنش حرارتی در افزایش ناهنجاری اسپرم و کاهش نرخ زنده‌مانی، افزودن پودر برگ رزماری تاثیری در نرخ این دو فراسنجه نداشت.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

ترکیبات موجود در پودر برگ گیاه رزماری قادرند از اسپرم و ساختار مختلف آن از جمله غشاء پلاسمائی و آکروزوم محافظت کنند. علی‌رغم اینکه بیشترین محافظت اکروزوم اسپرم مربوط به استفاده از پودر برگ رزماری در شرائط بدون تنش حرارتی

بود ولی استفاده از این گیاه می‌تواند اثرات زیان‌بار تنش حرارتی را کاهش دهد. برای بررسی تأثیرات بیشتر، مطالعات میکروسکوپی بافت بیضه به همراه سنجش هورمون‌های آندروژنی توصیه می‌شود.

منابع

پیروی، تهمینه؛ غفاری؛ نوین معرفت؛ سلیمانی راد، جعفر و فرزدی، لعیا (۱۳۸۳). بررسی اثر انجماد در فاز بخار بر آکروزوم اسپرم افراد بارور و نابارور. *نشریه باروری و ناباروری*، ۵ (۳): ۲۱۶-۲۰۸.

تولائی، مرضیه؛ صادقی، نیلوفر و نصر اصفهانی، محمد حسین (۱۳۹۷). تأثیر استرس گرمایی بر روند اسپرماتوژنز. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۲۰ (۵): ۱۲۷-۱۱۰.

زرقی، حیدر؛ گلیان، ابوالقاسم و کرمانشاهی، حسن (۱۳۹۴). تأثیر عصارهٔ هیدروالکلی رزماری بر عملکرد تولیدی و کیفیت تخم‌مرغ در مرغان تخم‌گذار .*علوم دامی ایران*. ۴۶ (۱): ۱-۸.

شکرانی، بهروز؛ مهری، مرتضی؛ فتاح، امیر؛ شرفی، محسن و شیرمحمد، فاطمه (۱۳۹۵). مطالعه تأثیر استفاده از اسانس رزماری در جیره، بر کیفیت منی خروس‌های مادر گوشتی .*تولیدات دامی*، ۱۸(۴): ۸۶۵-۸۵۳.

کرمی، معصومه؛ حلوانی، غلامحسین؛ زارع، سجاد؛ مهرپرور، امیر هوشنگ؛ دهقانی تفتی، عارفه؛ مظفری، عباس و همکاران (۱۳۹۷). بررسی تأثیر استرس گرمایی بر روی فاکتورهای حیاتی و عملکرد شناختی کارکنان کارخانه ذوب مس سرچشمه کرمان. *فصلنامه علمی تخصصی طب کار*، ۱۰ (۲): ۱۰-۲۱.

REFERENCES

Agarwal, A., A. Hamada, & Esteves, S. C. (2012). Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nature Reviews Urology* 9(12):678-690.

AS, M. 2013. Effect of heat shock exposure on the physiological responses and semen quality of male chickens under heat stress conditions. Egyptian Poultry Science Journal 33(1):143-161.

Ashok, A., V. Gurpriya, O. Chloe, & S. Stefan. (2014). Effect of oxidative stress on Male Reproduction. *The World Journal of Men' s Health* 32(1):1-17.

Attia, Y. A., A. S. El-Naggar, B. M. Abou-Shehema, & Abdella, A. A. (2019). Effect of supplementation with trimethylglycine (betaine) and/or vitamins on semen quality, fertility, antioxidant status, DNA repair and welfare of roosters exposed to chronic heat stress. *Animals* 9(8):547.

Attia, Y. A., R. S. Hamed, F. Bovera, A. E.-H. E. Abd El, M. A. Al-Harthi, & Shahba, H. A. (2017). Semen quality, antioxidant status and reproductive performance of rabbits bucks fed milk thistle seeds and rosemary leaves. *Animal reproduction science* 184:178-186.

Ayo, J., J. Obidi, & Rekwot, P. (2011). Effects of heat stress on the well-being, fertility, and hatchability of chickens in the northern Guinea savannah zone of Nigeria: *a review. International Scholarly Research Notices 2011*.

Blesbois, E., I. Grasseau & F. Seigneurin. (2005). Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction* 129(3):371-378.

Borghei-Rad, S. M., S. Zeinoaldini, M. Zhandi, H. Moravej and Ansari, M. (2017). Feeding rosemary leaves powder ameliorates rooster age-related subfertility. *Theriogenology* 101:35-43.

Douard, V., D. Hermier, M. Magistrini, C. Labbé, & Blesbois, E. (2004). Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. *Theriogenology* 61(1):1-13.

Gharagozloo, P., A. Gutiérrez-Adán, A. Champroux, A. Noblanc, A. Kocer, A. Calle, S. Pérez-Cerezales, E. Pericuesta, A. Polhemus, & Moazamian, A. (2016). A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. *Human Reproduction* 31(2):252-262.

Gil, L., F. Mascaró, P. Mur, I. Gale, A. Silva, N. González, C. Malo, & Cano, R. (2010). Freezing ram semen: The effect of combination of soya and rosemary essences as a freezing extender on

post-thaw sperm motility. *Reprod Domest Anim* 45:91.
González, N., L. Gil, F. Martinez, C. Malo, R. Cano, P. Mur, & Espinosa, E. (2010). Effect of natural antioxidant rosemary in canine soya freezing extender. *Reprod Domest Anim* 45:88.
Hu, R., Y. He, M. A. Arowolo, S. Wu, & He, J. 2019. Polyphenols as potential attenuators of heat stress in poultry production. Antioxidants 8(3):67.
Kanter, M., C. Aktas, & Erboga, M. (2013). Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Toxicology and Industrial Health* 29(2):99-113.
Karami, M., A. Mehrparvar, A. Dehghani Tafati, A. Mozaffari, & Sahranavard, Y. (2018). The relationship between heat stress on the vital factors and cognitive function Sarcheshmeh copper smelter workers in 2018. *Occupational Medicine Quarterly Journal* 10(2):10-21. (In Persian)
Khan, R. (2011). Antioxidants and poultry semen quality. *World's Poultry Science Journal* 67(2):297-308.
Kumar, S., E. Gupta, S. Kaushik, V. Kumar Srivastava, S. Mehta, & Jyoti, A. (2018). Evaluation of oxidative stress and antioxidant status: correlation with the severity of sepsis. *Scandinavian Journal of Immunology* 87(4):e12653.
Malo, C., L. Gil, N. Gonzalez, F. Martínez, R. Cano, I. De Blas, & Espinosa, E. (2010). Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (Rosmarinus officinalis). *Cryobiology* 61(1):142-147.
McDaniel, C., J. Hood, & Parker, H. (2004). An attempt at alleviating heat stress infertility in male broiler breeder chickens with dietary ascorbic acid. *Int. J. Poult. Sci* 3(9):593-602.
Motlagh, M. K., M. Sharafi, M. Zhandi, A. Mohammadi-Sangcheshmeh, M. Shakeri, M. Soleimani, & Zeinoaldini, S. (2014). Antioxidant effect of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze–thawing process of ram sperm. *Cryobiology* 69(2):217-222.
Ommati, M., M. Zamiri, A. Akhlaghi, H. Atashi, M. Jafarzadeh, M. Rezvani, & Saemi, F. (2013). Seminal characteristics, sperm fatty acids, and blood biochemical attributes in breeder roosters orally administered with sage (Salvia officinalis) extract. *Animal production science* 53(6):548-554.
Paul, C., A. A. Murray, N. Spears, & Saunders, P. T. (2008). A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction* 136(1):73.
Paul, C., S. Teng, & Saunders, P. T. (2009). A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biology of reproduction* 80(5):913-919.
Peyravi, T., M. Ghafari Novin, J. Soleymani Rad, & Farzadi, L. (2004). Study of freezing steam phase effect on acrosome sperm in fertile and infertile male human. *Journal of reproduction and infertility* 5(3):208-216. (In Persian)
Quinteiro-Filho, W., A. Gomes, M. Pinheiro, A. Ribeiro, V. Ferraz-de-Paula, C. Astolfi-Ferreira, A. Ferreira, & Palermo-Neto, J. (2012). Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with Salmonella Enteritidis. *Avian Pathology*, 41 (5):421-427.
Rao, M., X.-L. Zhao, J. Yang, S.-F. Hu, H. Lei, W. Xia, & Zhu, C. H. (2015). Effect of transient scrotal hyperthermia on sperm parameters, seminal plasma biochemical markers, and oxidative stress in men. *Asian journal of andrology* 17(4):668.
Sanocka, D. & Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2(1):1-7.
Setchell, B., L. Ploen, & Ritzen, E. (2002). Effect of local heating of rat testes after suppression of spermatogenesis by pretreatment with a GnRH agonist and an anti-androgen. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE*- 124(1):133-140.

Shokrani, B., M. Mehri, M. Sharafi, & Shirmohammad, F. (2017). Effects of dietary rosemary essential oil on semen quality of broiler breeder roosters. *Journal of animal productions* 18(5):853-865. (In Persian)

Surai, P. F., I. I. Kochish, V. I. Fisinin, & Kidd, M. T. (2019). Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: *An update*. *Antioxidants* 8(7):235.

Surai, P., I. Kochish, & Fisinin, V. (2017). Antioxidant systems in poultry biology: Nutritional modulation of vitagenes. *Eur. J. Poult. Sci* 81:1612-9199.

Surai, P., N. Fujihara, B. Speake, J. BrilIard, G. Wishart, & Sparks, N. (2001). Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen-Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 14(7):1024-1050.

Tavalaee, M., N. Sadeghi, & Nasr- Esfahani, M. H. (2018). Effect of heat stress on Spermatogenesis. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences* 20(5):110-127. (In persion)

Teymouri Zadeh Z, Shariatmadari F, Sharafi M, & Karimi Torshizi MA. (2020). Amelioration effects of n-3, n-6 sources of fatty acids and rosemary leaves powder on the semen parameters, reproductive hormones, and fatty acid analysis of sperm in aged Ross broiler breeder roosters. *Poult Sci*. 99(2):708-718.

Touazi, L., B. Aberkane, Y. Bellik, N. Moula, & Iguer-Ouada, M. (2018). Effect of the essential oil of Rosmarinus officinalis (L.) on rooster sperm motility during 4 C short-term storage. *Veterinary world* 11(5):590.

Tousson, E., M. F. Bayomy, & Ahmed, A. A. (2018). Rosemary extract modulates fertility potential, DNA fragmentation, injury, KI67 and P53 alterations induced by etoposide in rat testes. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 98:769-774.

Türk, G., A. O. Çeribaşı, Ü. G. Şimşek, S. Çeribaşı, M. Güvenç, Ş. Ö. Kaya, M. Çiftçi, M. Sönmez, A. Yüce, & Bayrakdar, A. (2016). Dietary rosemary oil alleviates heat stress-induced structural and functional damage through lipid peroxidation in the testes of growing Japanese quail. *Animal reproduction science* 164:133-143.

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

Zarghi, H., A. Golian, & Kermanshahi, H. (2015). The effect of rosemary hydro-alcoholic (Rosmarinus Officinalis L.) extract on performance and egg quality in laying hens. *Iranian Journal of Animal Science* 46(1):1-8. (In Persian)

Zhang, X.-S., Z.-H. Zhang, X. Jin, P. Wei, X.-Q. Hu, M. Chen, C.-L. Lu, Y.-H. Lue, Z.-Y. Hu, & Sinha Hikim A. P. (2006). Dedifferentiation of adult monkey Sertoli cells through activation of extracellularly regulated kinase 1/2 induced by heat treatment. *Endocrinology* 147(3):1237-1245.