DOI: 10.22092/vj.2017.109686.1276
شماره ۱۱۸ بهار ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

اثرات تغذیه‌ای عصاره گل سرخ بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس پس از انجماد – ذوب

• علی اصغر احمدیان
دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
• مرتضی مهری (نویسنده مسئول)
استادیار، گروه علوم دامی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۰۲-۱۲-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۲۱-۰۵-۱۳۹۶
Email: mortezamehri@gmail.com

چکیده

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثرات ناشی از افزودن عصاره گل سرخ به جیره خروس، بر کیفیت اسپرم پس از انجماد- یخ‌گشایی بود. شانزده خروس به چهار گروه برابر تقسیم و بطور روزانه صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره گل سرخ به هر کیلوگرم جیره آن‌ها افزوده شد. در روزهای صفر، ۱۴، ۲۸، ۴۲، ۵۶ و ۷۰ آزمایش، منی جمع‌آوری و خصوصیات حرکتی اسپرم شامل درصد کل اسپرم جنبا، درصد اسپرم‌های دارای جنبایی پیش‌رونده، درصد خطی بودن جنبایی، جنبایی عرضی سر اسپرم، سرعت اسپرم در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، میانگین سرعت در مسیر، و درصد اسپرم زنده، یکپارچگی اکروزوم و اکسیداسیون لیپید غشائی پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمارهای حاوی ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره گل سرخ در کیلوگرم خوراک به طور معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) درصد کل اسپرم جنبا، درصد اسپرم‌های زنده، جنبایی عرضی سر اسپرم، و سرعت اسپرم در مسیر مستقیم را بهبود بخشیده و موجب کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی گردید. همچنین بررسی اثرات متقابل زمان و عصاره گل سرخ نشان داد که صفات درصد کل اسپرم جنبا، درصد اسپرم‌های پیش‌رونده، درصد اسپرم‌های زنده، جنبایی عرضی سر اسپرم، و میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی متاثر از اثر متقابل، بهبود یافته‌اند ($p < ۰/۰۵$)، در حالی که بالاترین سطح عصاره در روز آخر آزمایش، سبب کاهش جنبایی پیش‌رونده اسپرم شد ($p < ۰/۰۵$). نتیجه آنکه مصرف ۱۰۰ یا ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره گل سرخ در کیلوگرم جیره به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی می‌تواند سبب بهبود موثر کیفیت اسپرم خروس پس از انجماد-یخ‌گشایی شده و تا حدی اثرات منفی انجماد روی اسپرم را کاهش دهد.

کلمات کلیدی: عصاره گل سرخ، انجماد، یخ‌گشایی، اسپرم، خروس

● Veterinary Researches & Biological Products No 118 pp: 144-152

Effects of Dietary Rose Extract on Qualititative Parameters of Frozen-Thawed Rooster Sperm

By: Ahmadian, A.A., M.Sc. Department of Animal Science, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Mehri, M., (Corresponding Author) Assistant professor, Department of Animal Science, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Email: mortezamehri@gmail.com

Received: 2017-02-20 **Accepted: 2017-08-12**

The objective of the present study was to investigate the effects of rose *(Rosa damascena)* extract on the quality of frozen-thawed rooster spermatozoa. Sixteen roosters divided into four aliquots and received a diet containing 0, 50, 100, 150 mg/kg of rose extract. On the 0, 14, 28, 42, 56 and 70th day of experiment, semen fluid were collected and sperm motility characteristics including total motility, progressive motility, linearity (LIN), straight line velocity (VSL), amplitude of lateral head displacement (ALH), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), and sperm viability, acrosome integrity and lipid peroxidation were evaluated after cooling-thawing procedure. The treatments with 100 and 150 mg of rose extract significantly improved post-thaw total motility, ALH, VSL, and sperm viability, and reduced lipid membrane peroxidation ($P<0.05$). The results showed that total motility, progressive motility, sperm viability, ALH, and lipid membrane peroxidation is affected by interaction between experimental diets × time, and improved ($P<0.05$). However, on the 70th day of experiment, highest level of rose extract significantly reduced progressive motility ($P<0.05$). In conclusion, 100 or 150 mg daily consumption of rose extract in the diet, as a natural antioxidant, can improve rooster sperm quality after frozen-thawed and reduce the adverse effects of freezing process during cryopreservation on the sperm.

Key words: Rose extract, freezing, thawing, sperm, rooster

مقدمه

از زمانی که تکنیك تلقیح مصنوعی در ۱۹۳۶ ابداع شد، پیشرفت‌های زیادی در ارتقاء عملکرد آن صورت گرفته است (۲۷). لازمه استفاده بهینه از تلقیح مصنوعی، امکان ذخیره‌سازی اسپرم بصورت مایع و منجمد می‌باشد؛ اما محدودیت‌های زمانی ذخیره‌سازی بصورت مایع، موجب گرایش بسوی انجماد اسپرم شده است (۲). نگهداری طولانی، حمل و نقل آسان، ایجاد بانك ژنوم برای نژادهای بومی برتر، عدم نیاز به نگهداری پرنده نر، و کاهش انتقال بیماری‌ها از اهداف اصلی انجماد اسپرم طیور می‌باشد (۱۳). از طرفی انجماد اسپرم طیور سبب کاهش توانایی باروری اسپرم می‌شود که مکانیسم آن هنوز به طور کامل شناخته نشده است. با این حال، نقش گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species) بر کاهش عملکرد اسپرم و توانایی باروری آن، پس از ذخیره‌سازی مایع و انجماد، در مطالعات زیادی مورد بررسی قرار گرفته است (۲۸). دلیل اصلی عملکرد غیرطبیعی اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی، پراکسیداسیون چربی‌ها و عدم تعادل آنتی‌اکسیدانی است که بعلت وقوع تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد (۹). فرآیند انجماد-یخ‌گشایی باعث افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال در منی می‌شود (۱۸). محل‌های اصلی شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن فعال، میتوکندری و غشای سلولی اسپرم است (۱) که به خصوص در برابر تغییرات ناگهانی دما آسیب‌پذیر هستند. دفاع آنتی‌اکسیدانی اسپرم نیز نسبتا ضعیف بوده و سلول‌های جنسی مستعد قرارگیری در معرض تنش اکسیداتیو هستند (۹). مکانیسم‌های متفاوتی برای مهار تنش اکسیداتیو و کاهش آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد وجود دارد که یکی از آن‌ها استفاده از آنتی‌اکسیدان در محیط است. برخی از گیاهان از جمله گل سرخ دارای میزان قابل توجهی آنتی‌اکسیدان طبیعی هستند (۱۷). فعالیت آنتی اکسیدانی در گیاهان از جمله گل سرخ به ترکیبات فنلی و فلاونوییدی آن‌ها وابسته است (۱۲). در پژوهشی اثر اسانس گل سرخ بر کیفیت اسپرم و بافت بیضه موش‌هایی که در معرض سمیت با مس قرار داشتند مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که افزودن اسانس گل سرخ به جیره این موش‌ها، به واسطه اثرات آنتی‌اکسیدانی آن، سبب رفع اثرات مضر مس بر اسپرم و بیضه می‌شود (۲۱). فلاونوییدها مواد فنلی جدا شده از طیف وسیعی از گیاهان بوده و به عنوان آنتی‌اکسیدان (به علت توانایی در کاهش رادیکال‌های آزاد) عمل می‌کنند (۲۰). بنابراین بنظر می‌رسد عصاره گل سرخ بتواند در جهت تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی خروس عمل نماید. به این

ترتیب هدف از این مطالعه بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گل سرخ افزوده شده به جیره خروس‌ها بر باروری و کیفیت اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۶ قطعه خروس گله مادر گوشتی با سن ۲۶ هفته در جایگاهی با شرایط محیطی استاندارد جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. خروس‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار و چهار تکرار در قفس‌های انفرادی توزیع شده و جیره‌ای مطابق با کاتالوگ راهنمای سویه راس ۳۰۸ (دارای ۲۶۵۰ کیلو کالری انرژی و ۱۲ درصد پروتئین) دریافت کردند. تیمارهای چهارگانه‌ی آزمایشی حاوی سطوح ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره الکلی گل سرخ در هر کیلوگرم خوراک بودند. عصاره از گلبرگ گل سرخ (*Rosa damascene* Mill.) و با استفاده از اتانول ۷۰ درصد، بعنوان حلال، تهیه شد. فرمول جیره پایه در جدول ۱ ارائه شده است.

نمونه‌گیری، انجماد و یخ‌گشایی اسپرم

از بدو ورود روزانه یک نوبت مالش شکمی روی خروس‌ها اجرا شد و بعد از ۲۰ روز همه خروس‌ها به اسپرم‌دهی عادت کردند. اسپرم‌گیری در روز اول افزودن ماده آزمایشی به جیره و سپس در فواصل دو هفته‌ای (۱۴، ۲۸، ۴۲، ۵۶ و ۷۰) انجام شده و نمونه اسپرم بوسیله سمپلر برداشته و داخل لوله فالکون ریخته و پنج برابر حجم اسپرم، اکستندر اضافه شد، سپس در ظرف عایق حاوی یخ قرار گرفته و به آزمایشگاه ارسال شد. برای جلوگیری از ایجاد شوک سرمایی به اسپرم‌ها، به مدت سه تا پنج دقیقه نمونه‌ها درون فلاسک عایق دارای آب ۳۷- ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس به ظرف حاوی یخ خشک منتقل شدند. در آزمایشگاه لوله منی در ظرف محتوی ۱۰۰ میلی لیتر آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و به صورت تدریجی در مدت ۹۰ دقیقه سرد شد. سپس بلافاصله بعد از سرد سازی، نمونه‌ها در داخل پایوت‌های انجماد ۰/۲۵ میلی لیتر کشیده شد. در مرحله بعد پایوت‌های حاوی منی به فاصله ۵ سانتی‌متری بالای سطح نیتروژن قرار گرفت و پس از گذشت هشت دقیقه با سرعت منی در داخل نیتروژن مایع ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور شده و در داخل پایوت‌های مربوط به هر گروه تیماری در داخل گابلت‌های مخصوص قرار داده شد. نمونه‌ها سپس به داخل تانک مخصوص نیتروژن انتقال داده شده و پس از انتقال کامل گابلت‌ها به داخل تانک مخصوص ازت، تمام اطلاعات مربوط به گروه‌ها در تانک ثبت شد (۲۲). جهت ذوب منی

جدول ۱- ترکیبات مواد خوراکی و تجزیه شیمیایی جیره

اقلام خوراکی جیره	مقدار به درصد	آنالیز جیره	مقدار
ذرت	۲۹/۸	انرژی قابل متابولیسم (kcal/kg)	۲۶۵۰
گندم	۲۰/۴	پروتئین خام (درصد)	۱۲
جو	۲۰	لایزین (درصد)	۰/۵۱
سبوس گندم	۱۹/۳	متیونین (درصد)	۰/۳۵
کنجاله سویا (۴۴ درصد)	۵/۳	متیونین + سیستین	۰/۵۱
روغن سویا	۰/۶	ترئونین (درصد)	۰/۴
سنگ آهک	۲/۵	کلسیم (درصد)	۰/۷
مونو کلسیم فسفات	۰/۹	فسفر قابل دسترس (درصد)	۰/۳۵
مکمل معدنی و ویتامینی†	۰/۵		
نمک	۰/۲۵		
جوش شیرین	۰/۱۵		
ویتامین AD_3E	۰/۳		

† مکمل معدنی به ازاء هر کیلوگرم جیره حاوی ۱۰۰۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۶۰۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم مس، ۶۰۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۲۰۰۰ میلی‌گرم ید، ۲۰۰ میلی‌گرم سلنیوم و مکمل ویتامینه دارای ۱۲ میلیون واحد بین‌المللی ویتامین A، سه میلیون واحد بین‌المللی ویتامین D۳، صدهزار واحد بین‌المللی ویتامین E، ۳۰۰۰ میلی‌گرم تیامین، ۱۲۰۰۰ میلی‌گرم B۲، ۱۵۰۰۰ میلی‌گرم B۳، ۵۵۰۰۰ میلی‌گرم B۵، ۴۰۰۰ میلی‌گرم B۶، ۴۰ میلی‌گرم B۱۲، ۵۰۰۰ میلی‌گرم K۳، ۲۵۰ میلی‌گرم بیوتین و یک کیلوگرم کولین کلراید

پس از خارج کردن پایوت‌های انجمادی منی از نیتروژن مایع، به مدت سه دقیقه در وان آب ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۲۲).

ارزیابی‌های اسپرم

خصوصیات حرکتی اسپرم شامل جنبایی کل (درصد اسپرم‌های دارای جنبش)، جنبایی پیش‌رونده (درصد اسپرم‌های دارای جنبایی رو به جلو)، درصد خطی بودن جنبایی، جنبایی عرضی سر، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، و میانگین سرعت در مسیر نیز با استفاده از نرم افزار کاسا (نسخه ۵/۲، میکرو اپتیک، بارسلونا، اسپانیا) آنالیز شد. به این منظور با استفاده از سمپلر هشت تا ۱۰ میکرولیتر از اسپرم روی لام ریخته و یک لامل تمیز روی آن گذاشته و سپس با استفاده از میکروسکوپ کاسا (Computer Assisted Sperm Analysis) بررسی و داده‌های مربوطه ثبت شد.

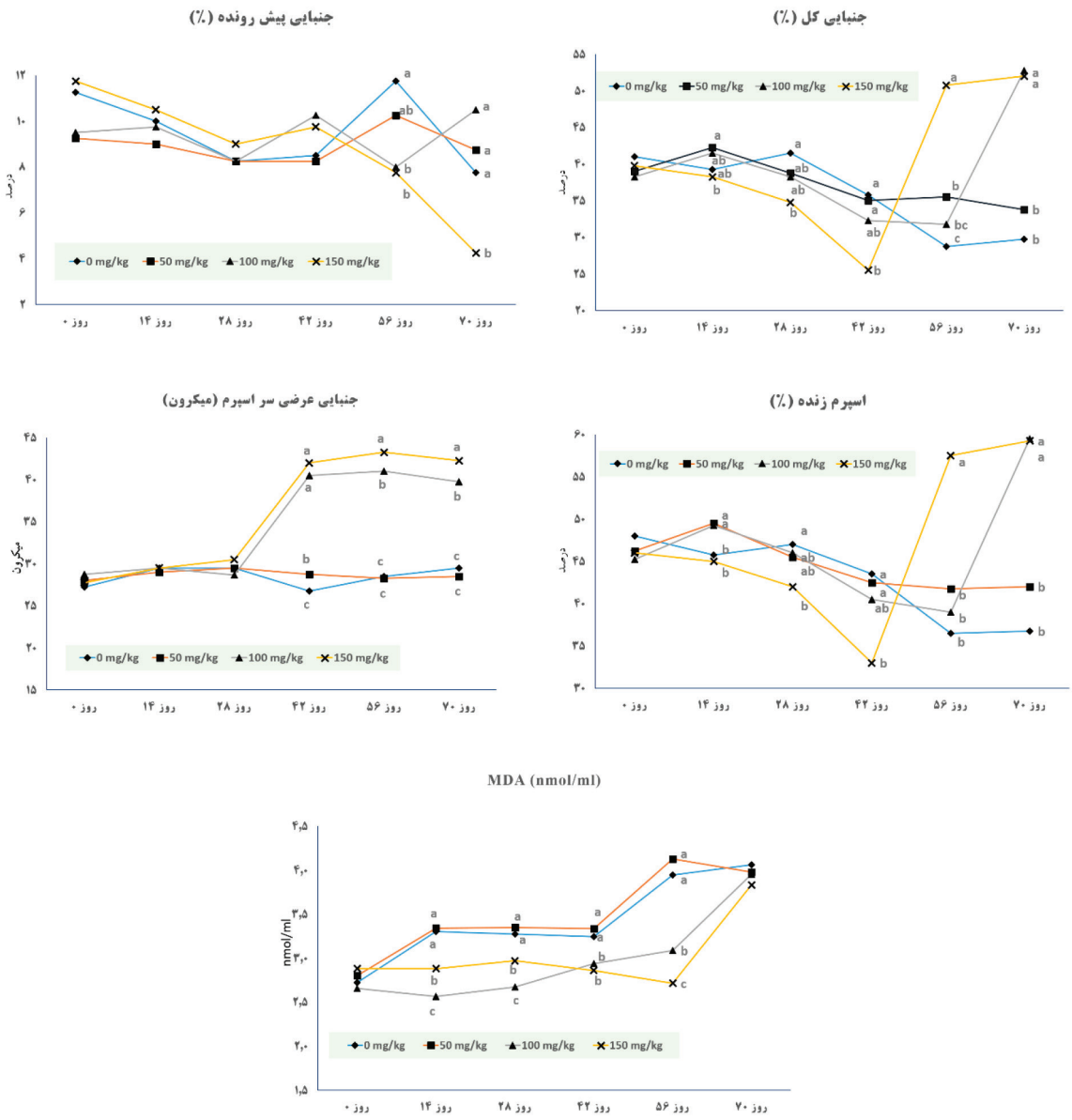
میزان مالون‌دی‌آلدهید بعنوان شاخصی از میزان اکسیداسیون لیپید غشایی توسط آزمون "مواد واکنش دهنده با اسید تیوباربیتوریک" مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. بدین ترتیب که ابتدا یک میلی‌لیتر از نمونه اسپرم درون لوله فالکون ریخته شد، سپس به ترتیب یک میلی‌لیتر هیدروکسی تولوئن بوتیله، یک میلی‌لیتر اتیلن‌دی‌آمین ترا استیک‌اسید و دو میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید به نمونه اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. یک میلی‌لیتر از مایع رویی که فاقد هرگونه مواد درشت بود، به اپندورف منتقل و یک میلی‌لیتر تری‌باربیتوریک اسید به آن افزوده و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه درون حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. سپس به مدت پنج تا ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری و سرد شده و یک میلی‌لیتر از نمونه حاصل به درون کووت منتقل و در دستگاه اسپکتروفوتومتر مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد.

جدول ۲- اثر سطوح مختلف عصاره گل سرخ تغذیه شده در جیره‌های خروس بر میانگین فراسنجه‌های کیفی اسپرم

صفت	عصاره گل سرخ				مقدار P		
	۰ mg/kg	۵۰ mg/kg	۱۰۰ mg/kg	۱۵۰ mg/kg	عصاره گل سرخ	زمان	عصاره گل سرخ × زمان
درصد کل اسپرم جنبا	۳۶/۰۰±۱/۲۵۴ c	۳۷/۳۷±۰/۹۱۶ bc	۳۹/۱۲±۱/۵۹۹ ab	۴۰/۱۶±۲/۰۰۳ a	۰/۰۰۸۵	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
درصد اسپرم‌های پیش رونده	۹/۵۸±۰/۴۵۸	۸/۹۵±۰/۳۹۷	۹/۳۷±۰/۴۴۲	۸/۸۳±۰/۶۱۹	NS	۰/۰۰۵۷	۰/۰۰۳۹
درصد اسپرم‌های زنده	۴۲/۹۱±۱/۱۹۸ c	۴۴/۵۹±۰/۹۱۳ bc	۴۶/۵۸±۱/۵۸۶ ab	۴۷/۱۲±۱/۹۷۴ a	۰/۰۱۲	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
VCL* (میکرون بر ثانیه)	۱۹/۸۳±۰/۶۳۳	۱۹/۱۶±۰/۸۰۹	۲۱/۴۵±۰/۸۰۱	۲۰/۰۴±۰/۶۶۱	NS	NS	NS
VSL* (میکرون بر ثانیه)	۹/۵۰±۰/۶۴۵ b	۹/۵۴±۰/۳۹۹ b	۹/۹۵±۰/۵۳۷ b	۱۱/۷۹±۰/۴۸۱ a	۰/۰۰۷۹	NS	NS
VAP* (میکرون بر ثانیه)	۱۸/۵۴±۰/۲۸۹ ab	۱۸/۳۷±۰/۵۹۲ b	۱۸/۷۵±۰/۵۷۵ ab	۱۹/۸۳±۰/۵۳۰ a	۰/۰۳۸۹	NS	NS
LIN* (درصد)	۴۴/۵۴±۱/۵۱۶	۴۰/۲۵±۰/۶۵۷	۴۰/۳۳±۰/۹۷۷	۳۹/۹۱±۰/۷۶۴	NS	NS	NS
ALH* (میکرون)	۲۸/۵۰±۰/۳۴۶ c	۲۸/۶۶±۰/۲۹۹ c	۳۴/۶۹±۱/۲۲۱ b	۳۵/۸۷±۱/۴۰۸ a	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
اکسیداسیون لیپید غشایی (nmol/ml)	۳/۴۳±۰/۱۰۱ a	۳/۴۹±۰/۰۹۹ a	۲/۹۸±۰/۱۰۳ b	۳/۰۲±۰/۰۸۲ b	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
سلامت اکروزوم (درصد)	۷۲/۷۹±۰/۷۱۸	۷۲/۰۴±۱/۱۱۴	۷۱/۲۵±۱/۳۷۲	۶۹/۷۹±۱/۳۸۴	NS	NS	NS

حروف متفاوت بین سطوح مختلف تیماری در هر صفت، نشانه معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها است ($p < ۰/۰۵$).

* VCL، سرعت در مسیر منحنی؛ VSL، سرعت در مسیر مستقیم؛ VAP، میانگین سرعت در مسیر؛ LIN، خطی بودن جنبایی؛ ALH، جنبایی عرضی سر اسپرم



شکل ۱- اثر سطوح مختلف عصاره گل سرخ بر صفت درصد کل اسپرم‌های جنبا، اسپرم‌های پیش‌رونده، اسپرم‌های زنده، اکسیداسیون لیپیدهای غشایی و جنبایی عرضی سر اسپرم در روزهای مختلف آزمایش

به منظور ارزیابی یکپارچگی آکروزم (Acrosome Integrity) پس از شستشو و سانتریفیوژ، اسپرم‌ها با استفاده از رنگ پی‌اس‌ای (Pisumsativum Agglutinin) رنگ‌آمیزی شده سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شده و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت میزان اسپرم‌های با آکروزم سالم شمارش شدند. اسپرم‌هایی با سر سبز به عنوان آکروزوم سالم و اسپرم با کمربند سبز به عنوان اکروزوم تخریب‌شده در نظر گرفته شد (۱۹).

جهت ارزیابی زنده‌مانی اسپرم از روش رنگ‌آمیزی ائوزین نگروزین (Eosin Nigrosin Staining Technique) استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم روی یک لام تمیز با ۲۰ میکرولیتر از محلول ائوزین حل شده و پس از گذشت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه، ۲۰ میکرولیتر از محلول رنگی نگروزین به آن اضافه شد؛ پس از تهیه اسمیر از محلول مورد نظر و خشک شدن لام‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی ۴۰، درصد اسپرم‌های زنده (بی‌رنگ) و مرده (رنگ شده) مورد بررسی قرار گرفت (۷).

تمام ارزیابی‌های انجام شده روی اسپرم به صورت انفرادی بوده و داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱)، رویه MIXED برای اندازه‌گیری‌های تکرار شده بر اساس مدل ۱ تجزیه و میانگین‌ها به کمک آزمون توکی-کرامر مقایسه شدند. بررسی نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگراف ـ اسمیرنوف صورت گرفت.

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_{ij} + \beta_1(t_k) + \beta_{2i}(\tau * t)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$
$$i = 1,...,a;\ j = 1,...,b;\ k = 1,...,n$$

که، Y_{ijk}، ijk اُمین مشاهده؛ μ، میانگین کل؛ τ_i، اثر iاُمین تیمار؛ δ_{ij} اشتباه تصادفی با میانگین صفر و واریانس σ^2_δ، β_1 ، ضریب رگرسیون مشاهدات از دوره‌های اندازه‌گیری؛ β_{2i} ، ضریب رگرسیون مشاهدات از اثر متقابل تیمار× دوره‌های اندازه‌گیری $(\tau * t)_{ik}$؛ ε_{ijk}، اشتباه تصادفی با میانگین صفر و واریانس σ^2 ، واریانس بین اندازه‌گیری‌ها درون خروس‌ها می‌باشد. همچنین، a، تعداد تیمارها؛ b، تعداد خروس مورد آزمایش؛ n، تعداد دوره‌های اندازه‌گیری می‌باشد.

نتایج

اثر سطوح مختلف عصاره گل سرخ (شاهد، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم خوراک) بر برخی فراسنجه‌های اسپرم در جدول ۲ ارائه شده است.

در مورد صفات درصد اسپرم‌های پیش‌رونده، سرعت اسپرم در مسیر منحنی، درصد خطی بودن جنبایی اسپرم، و نیز درصد سلامت اکروزوم، داده‌های جدول ۲ نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف عصاره گل سرخ وجود ندارد ($p > ۰/۰۵$). اما صفات درصد کل اسپرم جنبا، درصد اسپرم زنده، دامنه جابجایی سر اسپرم، سرعت اسپرم در مسیر مستقیم، میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر، و میزان اکسیداسیون لیپیدهای غشایی تحت تاثیر سطوح مختلف عصاره گل سرخ قرار گرفت ($p < ۰/۰۵$). نتایج نشان می‌دهد که عصاره گل سرخ سبب افزایش درصد اسپرم جنبا شده است به نحوی که تیمارهای سوم و چهارم از این نظر با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری دارند ($p < ۰/۰۵$). بررسی داده نشان می‌دهد با افزایش سطح عصاره گل سرخ در جیره، درصد اسپرم‌های زنده افزایش یافته است و تیمارهای سوم و چهارم تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد دارند ($p < ۰/۰۵$). از طرفی سطوح دوم و سوم عصاره نتوانست سرعت اسپرم در مسیر مستقیم را متاثر سازد، اما مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره گل سرخ در هر کیلوگرم خوراک به طور معنی‌داری این صفت را افزایش داد ($p < ۰/۰۵$). در خصوص صفت دامنه جابجایی سر اسپرم تفاوت‌ها به گونه‌ای است که تیمارهای سوم و چهارم به نحو معنی‌داری از تیمار اول و دوم بالاترند ($p < ۰/۰۵$)، به این معنی که سطح ۵۰ میلی‌گرم عصاره گل سرخ، برخلاف دو سطح دیگر، نتوانست افزایش معنی‌داری را در این رابطه با گروه شاهد ایجاد نماید ($p > ۰/۰۵$) (جدول ۲).

میزان اکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم نیز با افزایش سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره گل سرخ به هر کیلوگرم خوراک، کاهش معنی‌داری را تجربه کرد ($p < ۰/۰۵$).

از طرفی داده‌های جدول ۲ نشان می‌دهد که صفات درصد کل اسپرم جنبا، درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده، درصد اسپرم زنده، دامنه جابجایی سر اسپرم، و میزان اکسیداسیون لیپیدهای غشایی تحت تاثیر اثر متقابل عصاره گل سرخ و زمان قرار گرفته‌اند (شکل‌های ۱ تا ۵). شکل ۱ نشان می‌دهد که در مورد صفات درصد کل اسپرم‌های جنبا و درصد اسپرم‌های زنده، تفاوت معنی‌دار بین سطوح مختلف، در تمام روزها به جز روز صفر وجود دارد و البته روند تغییرات به گونه‌ای است که سطح سوم عصاره، در روز پایانی آزمایش، و سطح چهارم از روز ۴۲ آزمایش، تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد ایجاد کرد ($p < ۰/۰۵$)، این در حالی است که در روز پایانی آزمایش درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده در تیمار چهارم به نحو معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($p < ۰/۰۵$) (شکل ۱).

در مورد صفت حرکت عرضی سر اسپرم، میزان ۵۰ میلی‌گرم عصاره گل سرخ در تمام دوره‌ی آزمایش هیچ تاثیری نشان نداد اما از روز ۴۲ آزمایش سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد ایجاد کردند و سبب افزایش جنبایی عرضی سر اسپرم شدند ($p < ۰/۰۵$). در ارتباط با میزان اکسیداسیون لیپیدهای غشاء نیز همین روند طی شد با این تفاوت که تیمارهای سوم و چهارم از روز ۱۴ آزمایش تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشته ($p < ۰/۰۵$) و البته در روز آخر آزمایش تفاوتی بین تیمارهای چهارگانه وجود نداشت.

بحث

در طول ذخیره‌سازی اسپرم به صورت انجمادی، افزایش تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن در منی منجر به پراکسیداسیون چربی‌ها و عدم تعادل آنتی‌اکسیدانی بعلت وقوع تنش اکسیداتیو می‌شود و تاثیر منفی بر عملکرد اسپرم و توانایی باروری آن می‌گذارد (۲). گزارش شده است که غشاء پلاسمایی اسپرم از پروتئین، کلسترول و فسفولیپیدها تشکیل شده است که مجموعه آنها با تشکیل یک غشاء دولایه از ساختمان اسپرم محافظت می‌کنند (۱۱). نکته بسیار مهم در ارتباط با حفظ انجمادی (Cryopreservation) در اسپرم خروس، از دست رفتن

توانایی باروری آن بر اثر انجماد-یخ‌گشایی بوده که دلیل آن ایجاد شکاف در دیواره سلولی بر اثر پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشایی می‌باشد (۲). از طرفی فسفولیپیدهای غشایی بالاترین میزان اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه را دارا بوده و به دلیل سیرنشده بودن احتمال پراکسیداسیون آنها بالا است (۲۴).

در این زمینه پژوهش‌های فراوانی جهت بررسی تاثیر آنتی‌اکسیدان‌های گوناگون بر تولیدمثل پستانداران انجام شده است که در میان آنها، ویتامین E و سلنیوم نقشی مهمی را در حفاظت اسپرم در برابر پراکسیداسیون بر عهده دارد (۸). پژوهش‌های بیشتر نشان داد که خوراندن ویتامین E به پرنده در مقایسه با افزودن آن به منی تاثیر بیشتری بر کاهش پراکسیداسیون غشای اسپرم دارد (۲۴).

نتایج آزمایش حاضر روی مولفه‌های حرکتی اسپرم پس از یخ گشایی نشان داد که تیمارهای حاوی مقادیر بالای عصاره گل سرخ صفات درصد اسپرم‌های جنبا، دامنه جابجایی سر اسپرم، سرعت در مسیر مستقیم و میانگین سرعت اسپرم در مسیر را به طور معنی‌داری بهبود داده‌اند ($p < ۰/۰۵$). به نظر می‌رسد ترکیبات عصاره گل سرخ از طریق حذف رادیکال‌های آزاد تاثیر قابل توجهی بر توانایی حرکت اسپرم گذاشته است. شاید علت کاهش تحرک اسپرم، افزایش تولید پراکسید هیدروژن توسط اسپرماتوزوا تحت فشار بالای اکسیژن باشد (۶)؛ گزارش شده است که مقادیر اندک رادیکال آزاد در تنظیم فعالیت‌های فیزیولوژیک اسپرم نقش دارد و افزایش تولید رادیکال آزاد باعث القاء پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم و کاهش تحرک آن می‌شود (۴، ۲۵). مشخص شده است که گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن بر انقباض پذیری دم اسپرم اثر گذاشته و با تاثیرگذاری بر غشاء میتوکندری اسپرم، در نهایت سبب مرگ اسپرم می‌شوند (۹).

حرکت اسپرم به شدت تحت تاثیر تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد و همبستگی منفی بین ویژگی‌های حرکتی اسپرم و میزان رادیکال‌های آزاد در محیط وجود دارد (۹). گزارش شده است که این اثرات منفی بدلیل تاثیر آنها بر غشاء میتوکندری و میزان غلظت ATP نبوده بلکه به علت تاثیر مالون دی آلدئید است که از جمله ترکیبات حاصل از پراکسیداسیون چربی‌ها بوده و شاخص میزان پراکسیداسیون لیپید می‌باشد (۲) و افزایش آن در منی باعث کاهش جنبایی اسپرم و باروری می‌شود (۵). بررسی اثرات عصاره گل سرخ بر میزان اکسیداسیون لیپیدهای غشاء نشان داد میزان اکسیداسیون در سطوح اول (گروه شاهد) و دوم نسبت به سطوح سوم و چهارم با اختلاف معنی‌داری بیشتر بوده است ($p < ۰/۰۵$). افزایش میزان MDA در نمونه‌های منی خروس، پس از انجماد و یخ‌گشایی، نسبت به نمونه منی تازه گزارش شده است (۲). به دلیل وجود مقادیر بالای اسیدهای چرب سیرنشده در غشای اسپرم، وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی برای خنثی سازی اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن در رقیق کننده‌ها الزامی است (۸). گزارش شده است مصرف رزماری میزان مالون‌دی‌آلدهید تولیدی در محیط اسپرم را شدیداً کاهش می‌دهد (۱۴). همچنین افزودن کاتالاز به محیط حاوی اسپرم خروس، سطح MDA را به طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد کاهش می‌دهد (۵). شکل ۱ نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف عصاره در روز پایانی آزمایش وجود ندارد. در این زمینه نشان داده شده است که مصرف طولانی مدت مقادیر بیش از حد ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجب افزایش شدید سیالیت غشا (بیش از حد مطلوب) شده و اسپرم را مستعد آسیب می‌کند (۲۳).

گزارش شده است که یکی از اولین محل‌های آسیب ناشی از انجام عمل انجماد، غشاء سلولی و اکروزوم می‌باشد و این آسیب ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها است (۱۶). نتایج برخی پژوهش‌های دیگر نیز اثر عمل انجماد-یخ‌گشایی در کاهش یکپارچگی غشاء اسپرم خروس، و نیز اثر مثبت افزودن آنتی‌اکسیدان به محیط اسپرم در از بین بردن این اثر منفی را تایید کرده‌اند (۲، ۲۱). هرچند عدم تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر یکپارچگی اکروزوم اسپرم گربه پس از انجام فرآیند انجماد-یخ‌گشایی نیز گزارش شده است (۲۶).

در مورد درصد اسپرم‌های زنده مطابق با جدول ۲ تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف عصاره گل سرخ مشاهده می‌شود به طوری که بیشترین اسپرم زنده مربوط به تیماری می‌باشد که ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره گل سرخ دریافت کرده بود. رادیکال‌های آزاد اثرات مخربی بر روندهای متابولیکی اسپرم می‌گذارند و می‌توانند باعث شروع پراکسیداسیون لیپید و تخریب ساختار DNA اسپرم و در نهایت منجر به مرگ سلول شوند (۳). لذا افزایش اسپرم‌های زنده در این مطالعه می‌تواند به دلیل حذف این رادیکال‌های آزاد باشد. پژوهش دیگری نشان داد که اسپرم در محیط اطراف خود جهت تولید ATP در درجه حرارت پایین به اکسیژن زیادی نیاز دارد، اکسیژن بیش از حد ممکن است منجر به تولید رادیکال‌های آزاد و تخریب اسپرم گردد. این موضوع می‌تواند بر غیرنرمال بودن و مرگ و میر اسپرم‌ها بخصوص در طی فرآیند انجماد یخ گشایی تاثیرگذار باشد (۲۶). مشخص شده است که ویتامین E با جلوگیری از اکسیداسیون اسیدهای چرب سیرنشده اسپرم، موجب کاهش تراوایی غشاء و افزایش زنده‌مانی اسپرم خروس می‌شود (۱۵). نتایج این پژوهش قابل تعمیم به مطالعه حاضر می‌باشد زیرا سطوح سوم و چهارم عصاره گل سرخ به طور معنی‌داری میزان زنده‌مانی اسپرم را پس از طی دوره اسپرماتوژنز و انجام فرآیند انجماد-یخ گشایی افزایش داد.

تغییرات ایجاد شده در شاخص‌های کیفی اسپرم پس از فرآیند انجماد-ذوب در این پژوهش نشان می‌دهد اگرچه از نظر این شاخص‌ها، در ابتدای آزمایش هیچ تفاوت معنی‌داری بین خروس‌ها وجود ندارد، اما بکارگیری سطوح بالای عصاره گل سرخ در جیره سبب بهبود قابل ملاحظه‌ای در برخی از این شاخص‌ها گردید. این بهبود حدودا از زمانی شروع می‌شود که انتظار می‌رود زمان مورد نیاز برای انجام یک سیکل اسپرماتوژنز در خروس باشد (۴، ۱۰). فرضیه این تحقیق نیز بر این اساس استوار بود که آنتی‌اکسیدان‌های گل سرخ با توجه به نقش احتمالی که در حذف رادیکال‌های آزاد دارد، می‌تواند از طریق جیره‌ی غذایی در طی یک دوره کامل اسپرماتوژنز سبب بهبود عملکرد اسپرم خروس گردد. اگرچه تاکنون مطالعات مدونی در ارتباط با حداقل زمان دقیق مورد نیاز برای اعمال تیمارهای تغذیه‌ای جهت بهبود شاخص‌های تولیدمثلی خروس صورت نگرفته است اما برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که این حداقل زمان مورد نیاز همان زمان لازم برای سیکل اسپرماتوژنز است (۴). اما با این حال انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اینکه یکی از مشکلات همیشگی در فارم‌های مادر گوشتی، افت باروری خروس‌های گله، همگام با افزایش سن آنها است، هدف از انجام این پژوهش جستجوی راهکاری تغذیه‌ای جهت رفع این مشکل بود. در تحقیق حاضر عصاره گل سرخ با توجه به نقش آنتی اکسیدانی مواد پلی فنلی موجود در آن با هدف کنترل رادیکال‌های آزاد مورد استفاده قرار گرفت تا بتواند ویژگی‌های مربوط به کیفیت اسپرم را با کنترل فرآیند پراکسیداسیون بهبود بخشد. نتایج به دست آمده نشان داد وجود مقادیر ۱۰۰ یا ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره گل سرخ در هر کیلوگرم از جیره‌ی خروس، موجب بهبود فراسنجه‌های حرکتی و افزایش زنده‌مانی پس از طی روند انجماد-یخ‌گشایی می‌شود. لازم به ذکر است که جهت فهم هرچه بهتر شیوه‌ی اثرگذاری عصاره گل سرخ، انجام بررسی‌های سلولی و مولکولی ضروری به نظر می‌رسد و نیز ارزیابی باروری این خروس‌ها در فارم نیز می‌تواند به روشن شدن هرچه بیشتر ابعاد این موضوع کمک نماید.

منابع مورد استفاده

1. Agarwal A., S. A. Prabakaran and T. M. Said. 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal of Andrology*, 26: 654-60.

2. Agnieszka P., L. Ewa and N. Wojciech. 2012. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, 77: 1497–1504.

3. Aitken R. J., G. N. De Iuliis, Z. Gibb and M. A. Baker. 2012. New horizons on an old landscape oxidative stress, DNA damage and apoptosis in the male germ line. *Reproduction in Domestic Animals*, 47: 7–14.

4. Akhlaghi A., Y. Jafari Ahangari, B. Navidshad, Z. Ansari Pirsaraei, M. Zhandi, H. Deldar, M. R. Rezvani, M. Dadpasand, S. R. Hashemi, R. Poureslami and E. D. Peebles. 2014. Improvements in semen quality, sperm fatty acids, and reproductive performance in aged Cobb 500 breeder roosters fed diets containing dried ginger rhizomes (*Zingiber officinale*). *Poultry Science*, 93(5):1236-1244.

5. Amini M. R., H. Kohram, A. Zare-Shahaneh, M. Zhandi, H. Sharideh and M. M. Nabi. 2015. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cryobiology*, 70(3):226-32.

6. Baker H. W., J. Brindle, D. S. Irvine and R. J. Aitken. 2004. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertility and Sterility*, 65: 411–419.

7. Blanco J. M., J. A. Long, G. Gee, A. M. Donoghue and D. E. Wildt. 2008. Osmotic tolerance of avian spermatozoa: influence of time, temperature, cryoprotectant and membrane ion pump function on sperm viability. *Cryobiology*, 1: 8-14.

8. Breque C., P. Surai and J. P. Brillard. 2006. Antioxidant status of the lower oviduct in the chicken varies with age and dietary vitamin E supplementation. *Molecular Reproduction and Development,* 73(8): 1045–1051.

9. Castro L.S., P. M. Assis, A. F. P. Siqueira, T. R. S. Hamilton, C. M. Mendes, J. D. A. Losano, M. Nichi, J. A. Visintin and M. E. O. A. Assumpção. 2016. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity,* 2016: 1-12.

10. Etches R. 1996. The Male Reproduction in Poultry. CAB International, New York, USA, pp. 208–233.

11. Hammerstedt R. H and J. K. Graham. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29: 26-38.

12. Katalanic V., M. Milos, T. Kullisic and M. Jukic. 2006. Screening of 70 medicinalplants forantioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94(4): 550–557.

13. Long J. A. 2006. Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? *Poultry Science*; 85: 232-236.

14. Malo C., L. Gill and F. Martin. 2010. Anti-oxidant supplementation improve boar sperm charasterictics and fertility after cryopreversation: comparison between systein and rosemary. *Cryobiology*, 61: 142-147.

15. Memar M., A. Zare Shahne, S. Zeinoddini, H. Kohram and M. J. Zamiri. 2013. Effect of Melatonin and Vitamin E on Frozen Semen Characteristics of Fars Indigenous Roosters. *Iranian Journal of Animal Science*. 43(3): 379-391.

16. Neild D. M., J. F. Brouwers, B. Colenbrander, A. Agüero and B. M. Gadella. 2005. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 72: 230 –38.

17. Nilgun G.B and B. Hasan. 2013. Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearingrose (*Rosa damascena* Mill) extracts. *Industrial Crops and Products*, 41: 375-380.

18. Park N. C., H. J. Park, K. M. Lee and D. G. Shin. 2003. Free radical scavenger effect of rebamipide in spermprocessing and cryopreservation. *Asian Journal of Andrology*, 5: 195-201.

19. Perez L. J, A. Valcarcel, M. A. De Las Heras, D. F. Moses and H. Baldassarre. 1996. In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. *Theriogenology*, 45: 1037–1046.

20. Pietta P. G. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natu-*

ral Products, 63: 1035-1042.
21. Sakhaee E., L. Emadi, and H. Siahkouhi. 2016. Histopathological evaluation of supportive effects of *Rosa damascene* on mice testes, following long term administration of copper sulfate. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(1): 46-50.
22. Shahverdi A., M. Sharafi, H. Gourabi, A. Yekta, V. Esmaeili, M. Sharbatoghli, E. Janzamin, M. Hajnasrollahi and M. Mostafayi. 2014. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology*, 83(1): 78-85.
23. Shoae A and M. J. Zamiri. 2008. Effect of butylated hydroxytoluene on bull sperm frozen in egg yolk-citrate extender. *Animal Reproduction Science*, 104: 414-418.
24. Surai P. F., J. P. Brillard, B. K. Speake, E. Blesbois, F. Seigneurin and N. H. Sparks. 2000. Phospholipid fatty acid composition, vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. *Theriogenology*, 53: 1025-1039.
25. Thiagarajan R and T. Valivitan. 2009. Antioxidant properties of green and black tea. *Experimental Eye Research*, 73(3): 393-401.
26. Thuwanut P., K. Chatdarong, M. Techakumphu and E. Axnér. 2008. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology*, 70(2): 233-40.
27. Zhang Y. Y. 2006. Semen characterization and sperm storage in Cabots Tragopan. *Poultry Science,* 85: 892-898.
28. Zini A., K. Garrels and D. Phang. 2000. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology*, 55 (6): 922-926.