Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

The effect of adding Evening Primrose (*Oenothera biennis*) seed oil to Tris extender on ram semen quality after the freeze-thawing process in Romanov

Rohollah Mastani[1*], Yousef Jafari Ahangari[2], Saeed Hasani[2], Mohsen Sharafi[3], Azim Ghasem-nezhad[4]

[1]Ph.D Graduated and [2]Professor , Department of Animal and Poultry Genetics, Breeding and Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, Email: rouhmastani@yahoo.com
[3]Associate Professor, Animal Physiology, Tarbiat Modares Univercity, Tehran, Iran.
[4]Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 10/24/2022
Revised: 02/20/2023
Accepted: 02/21/2023

Keywords:
Evening primrose seed oil
Freeze-thawing
Motility
Ram semen

ABSTRACT

Background and Objectives: Studies have shown that excessive production of free radicals during sperm processing decreases its quality parameters including motility, viability, and fertilizing ability. Therefore, it seems necessary to use a compound with antioxidant properties during this process. Evening primrose seed oil (EPSO), with its phenolic compounds, possesses antioxidant properties. The purpose of this research is to investigate the effect of adding evening primrose seed oil to the freezing diluent on the quality of ram sperm after the freezing and thawing process.

Materials and Methods: In this research, the semen of 5 adult Romanov rams with an average age of 3 to 4 years and average weight of 60 to 65 kg were used. Semen collected using artificial vagina from trained rams twice a week. The treatments included control (without EPSO), treatment 1 with 25 microliters EPSO, treatment 2 with 50 microliters EPSO, treatment 3 with 100 microliters EPSO. The collected semen samples were taken to the laboratory and examined in terms of volume, concentration and motility. Semen samples were diluted with a diluent based on Tris-lecithin soy and frozen. After thawing, parameters of general mobility and progressive mobility and other parameters related to mobility were evaluated. The survival percentage, membrane integrity, mitochondrial activity and peroxidation were determined.

Results: The results showed that the level of 25 microliters of evening primrose seed oil improved the motility of the whole sperm compared to the control group, and no significant difference was observed in other experimental treatments compared to the control group. There was no significant difference between the 25 and 50 microliters treatments with the control group in the progressive parameter, but there was a significant difference with the 100 microliters treatment compared to the other treatments and the control treatment ($P<0.01$). The results of lipid peroxidation showed that the lowest amount of Malon-di-aldehyde production was related to the 25 microliters treatment but no significant difference was observed with the control treatment. The results of the apoptosis test showed that the inclusion levels of 25 and 50 microliters EPSO decreased the amount of apoptosis compared to the control group and the level of 100 microliters of EPSO ($P<0.01$), as well as survival in the treatment of 25 and 50 microliters compared to others. The treatments showed significant differences and increased survival ($P<0.01$). Finally, dead sperms in the 25 microliters treatment were significantly less than

what observed in other experimental groups (P<0.01).

Conclusion: In general, the addition of EPSO in the freezing diluent leads to an increase in the viability and health of sperms' plasma membrane after thawing. Inclusion level of 25 microliters EPSO to the diluent caused a significant difference in the parameters of lipid peroxidation and apoptosis compared to the control treatment.

Cite this article: Mastani, R., Jafari Ahangari, Y., Hasani, S., Sharafi, M., Ghasem-nezhad, A. (2023). The effect of adding Evening Primrose (*Oenothera biennis*) seed oil to Tris extender on ram semen quality after freeze-thawing process Romanov. *Journal of Ruminant Research*, 11(3), 33-48.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/ejrr.2022.20717.1867
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش در نشخوارکنندگان
شاپا چاپی: ۴۲۶۱-۲۳۴۵
شاپا الکترونیکی: ۴۲۵۳-۲۳۴۵

تأثیر افزودن روغن بذر گل مغربی به رقیق‌کننده انجمادی بر پایه تریس بر کیفیت اسپرم قوچ رومانوف پس از انجماد و یخ‌گشایی

روح‌اله مستانی[1*]، یوسف جعفری آهنگری[2]، سعید حسنی[2]، محسن شرفی[3]، عظیم قاسم‌نژاد[4]

[1] فارغ التحصیل دکتری و [2]استاد گروه فیزیولوژی و ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران،
رایانامه: rouhmastani@yahoo.com [3] دانشیار دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران، [4] دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران،

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۸/۲
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۱۲/۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲

واژه‌های کلیدی:
اسپرم قوچ
انجماد یخ گشایی
جنبایی
روغن بذرگل مغربی

چکیده

سابقه و هدف: تحقیقات نشان داده‌اند که فرآوری و انجماد با تولید رادیکال‌های آزاد سبب کاهش جنبایی، زنده‌مانی و قدرت باروری اسپرم می‌شود؛ بنابراین استفاده از یک ترکیب با ویژگی آنتی‌اکسیدانتی طی این فرآیند ضروری به نظر می‌رسد. روغن بذرگل مغربی به‌دلیل داشتن ترکیبات فنولی دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانتی است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر افزودن روغن بذر گل مغربی به رقیق‌کننده انجمادی بر کیفیت اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از منی ۵ رأس قوچ رومانوف بالغ با میانگین سنی ۳ تا ۴ سال و میانگین وزنی ۶۰ تا ۶۵ کیلوگرم استفاده شد. جمع‌آوری منی با استفاده از واژن مصنوعی به‌صورت هفته‌ای دو بار انجام گرفت. برای افزودن روغن به گروه‌های تیماری از توین-۸۰ استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار شاهد بدون روغن گل مغربی، تیمار ۱ دارای ۲۵ میکرولیتر، تیمار ۲ دارای ۵۰ میکرولیتر و تیمار ۳ دارای ۱۰۰ میکرولیتر از روغن گل مغربی بود. نمونه‌های منی پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه منتقل شد و از نظر حجم، غلظت و جنبایی پیش‌رونده اسپرم بررسی شدند. درنهایت، نمونه‌های منی با رقیق‌کننده بر پایه تریس- لستین سویا رقیق‌سازی و منجمد شد. پس از یخ‌گشایی فراسنجه‌های جنبایی کل و پیش‌رونده، درصد زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء، فعالیت میتوکندریایی و پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم تعیین گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که سطح ۲۵ میکرولیتر روغن بذر گل مغربی توانست جنبایی کل اسپرم را نسبت به گروه کنترل بهبود ببخشد و در دیگر تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد. در فراسنجه جنبایی پیش‌رونده بین تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ولی این فراسنجه در تیمار ۱۰۰ میکرو لیتر نسبت به گروه‌های دیگر به‌طور معنی‌داری تفاوت نشان دادند ($P<0/01$). افزودن سطوح **۲۵ و ۵۰** میکرولیتر روغن گل مغربی به رقیق‌کننده، صفت یکپارچگی غشا را نسبت به سطح ۱۰۰ میکرولیتر و تیمار شاهد بهبود داد ($P<0/01$) ولی این بهبود در تیمار ۲۵ میکرولیتر نسبت به

سطح ۵۰ میکرولیتر بیشتر بود (P<۰/۰۱). نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت میتوکندری نشان داد که بیشترین درصد اسپرم دارای میتوکندری فعال در گروه‌های ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر بود (P<۰/۰۱). نتایج حاصل از پر اکسیداسیون لیپیدی نشان داد که کمترین مقدار تولید مالون دی آلدئید مربوط به تیمار ۲۵ میکرولیتر می‌باشد ولی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج حاصل از آزمایش آپوپتوز نشان داد که افزودن سطوح ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر روغن گل مغربی باعث کاهش میزان آپوپتوز نسبت به گروه شاهد و سطح ۱۰۰ میکرولیتر روغن گل مغربی گردید (P<۰/۰۱). همچنین زنده‌مانی در تیمار ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر نسبت به دیگر تیمارها به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۱). درنهایت اسپرم‌های مرده در تیمار ۲۵ میکرولیتر نسبت به دیگر گروه‌های آزمایشی کمتر بود و همین امر سبب اختلاف معنی‌دار این صفت در این سطح نسبت به دیگر سطوح گردید (P<۰/۰۱).

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی افزودن روغن گل مغربی در رقیق‌کننده انجمادی منجر به افزایش جنبایی، قابلیت زنده‌مانی و سلامت غشاء پلاسمایی و کاهش آپوپتوز اسپرم‌ها پس از انجماد-یخ‌گشایی می‌شود. با در نظر گرفتن همه فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده، گروه مربوط به ۲۵ میکرولیتر نسبت به سایر سطوح اثر حفاظتی بیشتری از خود نشان داد.

استناد: مستانی، ر.، جعفری آهنگری، ی.، حسنی، س.، شرفی، م.، قاسم‌نژاد، ع. (۱۴۰۲). تأثیر افزودن روغن بذر گل مغربی به رقیق‌کننده انجمادی بر پایه تریس بر کیفیت اسپرم قوچ رومانوف پس از انجماد و یخ‌گشایی. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۱(۳)، ۴۸-۳۳.

DOI: 10.22069/ejrr.2022.20717.1867

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

تلقیح مصنوعی با کنترل فعالیت‌های تولیدمثلی و همچنین بالابردن راندمان صنعت پرورش دام سبب افزایش بهره‌وری در این صنعت شده است. به‌عبارت‌دیگر، استفاده از تکنیک تلقیح مصنوعی می‌تواند موجب سرعت بخشیدن به آزمون نتاج، کنترل بیماری‌های مقاربتی، کاهش واردات دام های زنده از کشورهای خارجی و کاهش هزینه‌های سنگین حمل‌ونقل شود (Leboeuf و همکاران، ۱۹۹۸). پژوهش ها در مورد تلقیح مصنوعی گوسفند از ابتدای قرن بیستم توسط ایوانف آغاز شد که مطالعات خود را در مورد رقیق‌کننده‌ها و فرآوری انجام داد و منجر به توسعه و کاربرد عملی تلقیح مصنوعی در حیوانات مزرعه شد (Salamon و همکاران، ۲۰۰۰). به‌منظور تحقق بخشیدن به بسیاری از مزایای تلقیح مصنوعی، ذخیره‌سازی منی برای زمان‌های طولانی یک امر ضروری محسوب می‌شود. این امر به‌وسیله فرآیند انجماد محقق می‌شود، فرآیندی که با متوقف ساختن فعالیت‌های متابولیکی اسپرماتوزوآ، امکان ذخیره‌سازی به طور نامحدود و بدون کاهش معنی‌دار باروری را در پی دارد(Bailey و همکاران، ۲۰۰۰).

مطالعات گذشته نشان داده‌اند که تولید رادیکال‌های آزاد[1](ROS)، در مراحل مختلف فرآوری، نگهداری و انجماد اسپرم، افزایش‌یافته که منجر به کاهش جنبایی، زنده‌مانی و قدرت باروری اسپرم می‌شود (Bilodeau و همکاران، ۲۰۰۰). رادیکال‌های آزاد ترکیب های واکنش‌پذیری هستند که به علت داشتن یک یا چند الکترون جفت نشده، می‌توانند با انواعی از ماکرومولکول‌های زیستی به‌ویژه لیپیدها، قندها و DNA واکنش داده و با اکسید نمودن آن‌ها منجر به تنش اکسیداتیو در سلول‌ها و درنهایت مرگ سلول شوند (Bilodeau و همکاران، ۲۰۰۰). رقیق کردن منی موجب کاهش غلظت‌های ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی طبیعی اسپرم شده، درنتیجه اسپرم‌ها آسیب‌پذیر می‌شوند، وقتی اسپرماتوزوآ طی محافظت سرمایی در معرض آسیب قرار می‌گیرند، شرایط برای تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابد و از طرف دیگر کمبود آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی در منی رقیق‌شده اسپرم‌ها را آسیب‌پذیرتر می‌نماید (Rostami و همکاران، ۲۰۱۹). علاوه بر این، حضور غلظت‌های زیاد اسیدهای چرب غیراشباع در سلول‌های اسپرم آن‌ها را مستعد پراکسیداسیون[2] (LPO) کرده و درنهایت منجر به کاهش تحرک، باروری، یکپارچگی غشایی و تغییرات متابولیک اسپرم خواهد شد. اسیدهای چرب اشباع‌نشده در غشای اسپرم انسان، قوچ و گاو نر یافت می‌شوند. اسیدهای چرب سیالیت غشاء را بهبود می‌بخشند و اسپرم را در برابر شوک سرمایی مقاوم می‌کنند (Kaka و همکاران، ۲۰۱۶). برای مقابله با این مشکل، استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها ضروری به نظر می‌رسد (Lenzi و همکاران، ۱۹۹۴). ایجاد تعادل بین تولید رادیکال‌های فعال اکسیژنی و پاک‌سازی آن‌ها توسط آنتی‌اکسیدانت‌ها، یک عامل مهم در بقای سلول اسپرم و عملکرد طبیعی آن پیش و پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی است. پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهد که حضور آنتی‌اکسیدانت‌ها اسپرماتوزوآ را در برابر تولید رادیکال‌های آزاد، آسیب‌های DNA، کاهش تحرک و زنده‌مانی، بلوغ نابهنگام، آسیب‌های فرآیند انجماد-یخ گشایی حفاظت کرده و موجب بهبود کیفیت منی و توان باروری اسپرماتوزوآ می‌شوند (Makker و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین موجب حفظ کیفیت دیگر فراسنجه‌های مربوط به اسپرم، نظیر جنبایی و یکپارچگی غشا می‌شوند (Bucak و همکاران، ۲۰۰۸). در حالت طبیعی سلول دارای آنتی‌اکسیدان‌های متنوعی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز است که از تجمع رادیکال‌های

آزاد جلوگیری می‌کنند، اضافه کردن آنتی‌اکسیدانت‌های مصنوعی (سیستئین، ویتامین E، ویتامین C، کارتنوئیدها و غیره) برای محافظت از غشای سلول‌های اسپرماتوزوئید و جلوگیری از پر اکسیداسیون لیپید ضروری است(Giulini و همکاران، ۲۰۰۹). گل مغربی با نام علمی *Oenothera biennis* نوعی گیاه دارویی متعلق به خانواده *Onagraceae*، گیاهی دو ساله و کوتاه عمر است. این گیاه در بسیاری از کشورها، جهت تولید روغن بذر گل مغربی در سطح وسیعی کشت می‌شود. روغن بذر گل مغربی، دارای ترکیبات گیاهی متنوعی از جمله استرها، الکل‌ها، تری ترپنوئیدها، اسیدهای چرب، اسیدهای فنولیک، لاکتون‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و استرول‌ها است. این روغن منبع غنی اسیدهای چرب غیراشباع به‌ویژه گامالینولنیک اسید بوده که حدود ۳ ± ۱۱ درصد از اسیدهای چرب این روغن را تشکیل می‌دهد (Munir و همکاران، ۲۰۱۷). نتایج به‌دست‌آمده نشان داد، گل گیاه گل مغربی با داشتن مقادیر قابل‌توجهی از ترکیبات فنولی دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی و ضدمیکروبی بالایی است. گل‌مغربی دارای برخی ترکیبات فنولی است (Zahradnikova و همکاران، ۲۰۰۸). فلاونوئیدها به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت‌های اولیه و ثانویه عمل می‌کنند و عمل آن ها وابسته به نوع ترکیبات و ارگانیسم‌های موجود است(Birch و همکاران، ۲۰۰۱). روغن بذرگل مغربی[۳] (EPSO) شامل ۹۸ درصد تری آسیل گلیسرول و در حدود ۲-۱ درصد ماده غیرقابل صابونی و برخی از استرول‌ها و توکوفرول‌های مهم است. بخش استرول شامل ۹۰ درصد بتاسیتوسترول است (Christie، ۱۹۹۹). روغن بذر گیاه گل مغربی اثرات آنتی‌اکسیدانتی مشخصی دارد (Knorr و Hamburger، ۲۰۰۴). اثرات روغن گل‌مغربی در استرس اکسیداتیو نه‌تنها مرتبط به اثرات بازدارندگی آن بر پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد بلکه مرتبط با اثرات مثبت آن بر سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی وابسته به گلوتاتیون نیز است (De La Cruz و همکاران، ۱۹۹۹). ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی موجود در روغن بذر گل مغربی به‌طور عمده ناشی از قدرت احیاءکنندگی و ساختار شیمیایی آن‌هاست که آن‌ها را قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی و غیرفعال کردن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه‌گانه می‌کند (Ahmadi و همکاران، ۲۰۰۷). روغن گل‌مغربی دارای سطوح زیادی از گاماتوکوفرول و آلفاتوکوفرول می‌باشد (Eskin، ۲۰۰۸؛ Schmidt و همکاران، ۲۰۰۳). توکوفرول‌ها شامل هشت همولوگ طبیعی هستند که همگی خانواده ویتامین E را تشکیل می‌دهند (Chun، ۲۰۰۲). ویتامین E به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی به‌خوبی شناخته شده است، این دسته از ترکیبات با مهار رادیکال‌های آزاد، مانع از آسیب به بافت‌ها می‌شوند. در بین ایزومرهای ویتامین E، آلفاتوکوفرول بیشترین فعالیت و توان بیولوژیکی را داشته و گاماتوکوفرول نیز به‌عنوان ایزومری که بالاترین پتانسیل حذف رادیکال‌های آزاد را دارد، شناخته می‌شود (Grilo و همکاران، ۲۰۱۴). روغن گیاه گل‌مغربی جزو اسیدهای چرب امگا ۶ است و عمدتاً دارای ۶-۱۱ درصد اولئیک اسید، ۶۵ -۸۰ درصد لینولئیک اسید و ۸-۱۴ درصد گاما لینولنیک اسید است (Hudson، ۱۹۸۴). اثرات درمانی آن ارتباط مستقیم با اسیدهای چرب ضروری آن دارد (Fan و Chapkin، ۱۹۹۸) و به دلیل محتوای بالای اسید گاما لینولنیک موردتوجه واقع شده است. افزودن اسیدهای چرب سبب کاهش ویژگی‌های اسپرم منجمد شده مانند جنبایی، یکپارچگی غشاء، مورفولوژی، یکپارچگی آکروزوم و زنده‌مانی می‌شود (Kaka و همکاران، ۲۰۱۶).

اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه PUFA همراه با یک آنتی‌اکسیدانت، پارامترهای کیفیت اسپرم گوسفند را بهبود می‌بخشد (Towhidi و Parks، ۲۰۱۲). با تمام این خواص مفید، به نظر می‌رسد که روغن بذر گل مغربی یک مکمل مطلوب است که ممکن است اثرات هم‌افزایی مفیدی با رقیق‌کننده داشته باشد، اگرچه قبلاً در ترکیب با رقیق‌کننده‌های انجمادی ارزیابی نشده بود؛ بنابراین، مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی استفاده روغن بذر گل مغربی در رقیق‌کننده تریس برای انجماد اسپرم قوچ رومانوف انجام شد.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش، جمع‌آوری نمونه‌ها و فرایند انجماد-یخ‌گشایی اسپرم: این تحقیق در پاییز ۱۳۹۷ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. گیاه گل‌مغربی از مزرعه آموزشی، پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جمع‌آوری و بعد از جدا کردن بذر با استفاده از پرس سرد روغن‌کشی شد. روغن گرفته‌شده در داخل ظرف شیشه‌ای تیره تا زمان استفاده در دمای یخچال نگهداری شد.

برای اسپرم‌گیری از ۵ رأس قوچ رومانوف بالغ با میانگین سنی ۳ تا ۴ سال و میانگین وزنی ۶۰ تا ۶۵ کیلوگرم استفاده شد. جمع‌آوری منی با استفاده از واژن مصنوعی پس از عادت دهی دام‌ها به‌صورت هفته‌ای دو بار انجام گرفت. نمونه‌های منی اخذشده به آزمایشگاه منتقل شد و از نظر حجم، غلظت جنبایی پیش‌رونده اسپرم‌ها بررسی‌شده و آن دسته از نمونه‌هایی که دارای حجم ۰/۷۵- یک میلی‌لیتر، غلظت ۳×۱۰^{۹} اسپرم در هر میلی‌لیتر و همچنین درصد حرکت پیش‌رونده بالاتر از ۷۰ و سلول‌های اسپرم غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد در هر انزال داشتند مورداستفاده قرار گرفت. برای جلوگیری از اثرات فردی دام‌های نر مقدار مساوی از نمونه‌های منی از هر ۵ رأس قوچ در هر تکرار آزمایشی با هم مخلوط و مورداستفاده قرار گرفتند. برای ساخت رقیق‌کننده دارای لستین سویا ابتدا تک‌تک مواد شیمیایی محیط پایه (تریس ۲۷/۱ گرم/ لیتر، فروکتوز ۱۰ گرم/لیتر و اسیدسیتریک ۱۴ گرم / لیتر) با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت بالا توزین، سپس با آب دو بار تقطیر مخلوط و توسط مگنت هم زده شد، غلظت مورداستفاده از لستین سویا ۱ درصد بود و گلیسرول به میزان ۷ درصد به محیط انجماد اضافه شد. رقیق‌سازی به مقدار ۱ حجم منی و ۲۰ حجم رقیق‌کننده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار شاهد بدون روغن گل مغربی، تیمار ۱ دارای ۲۵ میکرولیتر، تیمار ۲ دارای ۵۰ میکرولیتر و تیمار ۳ دارای ۱۰۰ میکرولیتر از روغن گل مغربی بود. سپس لوله منی در ظرف محتوی ۱۰۰ سی‌سی آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و برای رسیدن به تعادل به مدت ۲ ساعت در دمای یخچال قرار گرفت. پس از دوره سردسازی، نمونه‌ها در استراهای (نی) انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتر پر شد. در مرحله بعد، نی‌های بسته‌شده دارای منی بافاصله ۴ سانتی‌متر بالای سطح ازت مایع قرار گرفت. پس از گذشت ۱۵ دقیقه استراها در داخل ازت مایع غوطه‌ور شدند و برای شناسایی بهتر استراهای مربوط به هر گروه تیماری در گابلت‌های مخصوص داخل تانک ازت قرار داده شد. برای ذوب منی، پس از خارج کردن استراها از نیتروژن مایع، به مدت ۳۰ ثانیه درون حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت سپس با استفاده از یک قیچی طرفی از استرا که با خمیر مسدود شده بود چیده شد و به داخل لوله‌های اپندرف ریخته شد.

ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم

فراسنجه های جنبایی: اولین فراسنجه ارزیابی در این تحقیق بررسی جنبایی اسپرم پس از انجماد – ذوب بود. بدین منظور سه استرا از هر گروه آزمایشی به روشی که در بالا توضیح داده شد ذوب شد و به داخل لوله‌های اپندورف انتقال داده شدند. سپس با استفاده از سمپلر متغیر و با برداشتن ۷ تا ۱۰ میکرو-لیتر از منی و قرار دادن آن روی لام و گذاشتن یک لامل تمیز روی آن، با استفاده از میکروسکوپ CASA (هوشمند فن‌آور، HFT,CASA) فراسنجه های جنبایی اسپرم ارزیابی شدند.

یکپارچگی غشای پلاسمایی: برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از تست‌هاست استفاده شد. به این منظور، ۱۰ میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاست با اسمولاریته ۱۰۰ میلی‌اسمول که حاوی فروکتوز و سیترات سدیم (فروکتوز ۹ گرم، سیترات سدیم ۹/۴ گرم، در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) بود اضافه شد و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه درون انکوباتور انکوبه شد (Revell و Mrode، ۱۹۹۴). پس از گذشت این زمان و با حداقل سه قطره از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ بررسی صورت گرفت. در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های با دم گره‌خورده (دارای غشای یکپارچه) نسبت به گره نخورده (دارای غشای آسیب‌دیده) و غیر یکپارچه محاسبه شدند (Asgari و همکاران، ۲۰۲۰).

درصد اسپرم‌های غیرطبیعی: برای سنجش اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل سه قطره از نمونه به تیوب‌های اپندورف حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک شامل فرمالین ۳۷٪ (۶۲/۵ میلی‌لیتر) محلول سالین (۱۵۰ میلی‌لیتر)، محلول بافر فسفات (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دو بار تقطیر (۵۰۰ میلی‌لیتر) می‌باشد، افزوده شد. سپس یک قطره از این مخلوط روی لام قرارگرفته و لامل‌گذاری گردید. با شمارش حداقل ۲۰۰ سلول زیر میکروسکوپ، فاز کنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰ درصد اسپرم‌های غیرطبیعی (غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم محاسبه شدند (Evans و همکاران، ۱۹۸۷).

درصد زنده‌مانی: برای تعیین درصد زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین – نیگروزین استفاده شد. در این روش اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ی اسپرم را برداشته و بر روی لام قرار داده سپس ۲۰ میکرولیتر از رنگ آماده ائوزین نیگروزین برداشته و بر روی نمونه اسپرم ریخته و با سرسمپلر به‌آرامی نمونه و رنگ را مخلوط می‌کنیم. پس از ۳۰ ثانیه، ۲۰ میکرولیتر از نمونه را برداشته و گوشه لام دیگری گذاشته و با یک لام دیگر به آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن لام را زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ قرار داده و سپس از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کم‌رنگ به خود گرفته یا تنها بخشی از گردن آن‌ها رنگ گرفته بود به‌عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شدند.

پراکسیداسیون لیپیدی: غلظت مالون دی آلدهید با استفاده از واکنش تیوباربیوتوریک اسید که یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی نرخ پر اکسیداسیون لیپیدها است اندازه‌گیری شد. یک میلی‌لیتر از هر نمونه منی با یک میلی‌لیتر اتیلن دی آمین تترا استیک اسید، یک میلی‌لیتر بوتیلید هیدروکسی تولوئن و ۲ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید با هم مخلوط و به داخل لوله‌های مخروطی ریخته شدند. لوله‌های مخروطی در ۱۲۰۰ دور برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ شدن، یک

میلی‌لیتر از محلول بالای لوله مخروطی با یک میلی‌لیتر تیوباربیوتوریک اسید در میکروتیوپ آمیخته گردیدند. لوله‌های مخروطی برای مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند سپس جذب نوری در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر (Biochrom,libra s12,England) اندازه‌گیری شد. غلظت مالون دی آلدئید(نانو مول در میلی‌لیتر) با توجه به نمودار استاندارد محاسبه شد (Placer و همکاران، ۱۹۶۶).

وضعیت آپوپتوز: در این ارزیابی از کیت Annexin V-FITC (IQP,PSD kit,Netherland) برای تشخیص جابجا شدن فسفاتیدیل سرین از لایه داخلی به لایه بیرونی غشای پلاسمایی سلول به‌عنوان شاخص آپوپتوزیس اسپرم استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان آپوپتوزیس ابتدا نمونه‌های منی با بافر PBS و سپس با بافر کلسیم شستشو (۱۲۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه) شد و سپس به هر نمونه ۱ میکرولیتر Annexin-V اضافه شد که این مرحله در تاریکی انجام گرفت، سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس‌ازآن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفیوژ (۱۲۰۰g) شدند و پس از اضافه کردن ۲ میکرولیتر PI در تاریکی به هر نمونه، توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACSCalibur Flowcytometer) خوانده شدند. تعداد ۱۰۰۰۰ رخداد توسط این دستگاه ثبت گردید.

فعالیت میتوکندری: برای اندازه‌گیری میزان فعالیت میتوکندریایی ابتدا نمونه‌های منی سانتریفیوژ شدند و بعد از حذف قسمت رقیق‌کننده، پلت تشکیل‌شده با ۵۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس مخلوط شد. ۱۰ میکرولیتر رودامین (Rhodamin-123, invtrogen) به نمونه‌ها اضافه شد و درجایی تاریک و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه قراردادِ شدند. مقدار ۱۰ میکرولیتر PI به نمونه اضافه شد. پس‌ازآن، میزان فعالیت میتوکندریایی نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. در نموداری که دستگاه فلوسایتومتر می‌دهد، اگر نمونه رودامین مثبت و PI منفی (R123+/ PI-) باشد، به‌عنوان نمونه دارای میتوکندری فعال محسوب می‌شود و اگر رودامین مثبت و PI مثبت (R123+/PI+) باشد به‌عنوان میتوکندری غیرفعال در نظر گرفته می‌شود.

آنالیز آماری

داده‌های به‌دست‌آمده در این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS (۹.۱) و با کمک رویه GLM آنالیز شدند. برای انجام مقایسات میانگین تیمارها از آزمون توکی و سطح معنی‌داری (P<۰/۰۱) در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از ارزیابی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان دادند که سطح ۲۵ میکرولیتر روغن بذرگل مغربی جنبایی کل اسپرماتوزوئید را نسبت به گروه شاهد بهبود داد (P<۰/۰۱). در دیگر تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد. همچنین در جنبایی پیش‌رونده بین تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ولی تیمار ۱۰۰ میکرولیتر نسبت به دیگر تیمارها و تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشت(P<۰/۰۱). رقیق‌کننده دارای ۲۵ میکرولیتر روغن گل مغربی نسبت به دیگر تیمارها در فراسنجه میانگین سرعت در مسیر عملکرد بهتری از خود نشان داد و اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد و دیگر تیمارها داشت (P<۰/۰۱). با توجه به اینکه روغن گل مغربی دارای اسیدهای چرب اولئیک، لینولئیک و گاما لینولنیک

می‌باشد می‌توان چنین استنباط کرد که با افزایش اسیدهای چرب غیراشباع در اطراف غشای پلاسمایی سر و دم اسپرماتوزوئید و بهبود سیالیت و قابلیت فشردگی غشا، توانایی سازگاری غشای پلاسمایی با حرکات فلاژلوم اسپرماتوزوئید، اثرگذاری در تأمین انرژی و همچنین برخی مواد که در تسهیل و افزایش تحرک اسپرماتوزوئید دخالت دارند افزایش می‌یابد (Farshad و همکاران، ۲۰۱۶). انصاری و همکاران (۲۰۱۲)، گزارش کردند که اضافه نمودن اسیدهای چرب امگا-۳ همراه با آلفا-توکوفرول به رقیق‌کننده اسپرماتوزوئید بز، سبب افزایش تحرک و تحرک پیش‌رونده اسپرم می‌شود. محققین نشان داده‌اند که بین تولید رادیکال‌های آزاد در سلول و کاهش تحرک اسپرم یک ارتباط قوی وجود دارد، به‌طوری‌که مشخص‌شده است که با افزایش تولید رادیکال پراکسید هیدروژن این ترکیب در سراسر غشای اسپرم پخش‌شده و فعالیت برخی از آنزیم‌های حیاتی مانند آنزیم گلوکز-۶ فسفات دهیدروژناز را مهار کرده و باعث اخلال در تولیدATP و تحرک اسپرم می‌شود (Aitken و Sawyer، ۲۰۰۳).

جدول ۱- تأثیر سطوح مختلف روغن بذر گل مغربی به رقیق‌کننده بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد –یخ‌گشایی

Table 1- The effect of different levels of evening primrose seed oil in extender on the motility parameters of ram sperm after the freezing-thawing

فرا سنجه‌های حرکتی Motion parameters	تیمارها[1] Treatments			
	EPSO0	EPSO25	EPSO50	EPSO100
جنبایی کل (%) Total motility (%)	43.92^{b}±0.21	49.67^{a}±0.64	44.14^{b}±0.71	42.70^{b}±0.60
جنبایی پیش‌رونده (%) Progressive motility (%)	19.62^{a}±0.70	18.60^{a}±0.45	18.90^{a}±0.67	17.15^{b}±0.47
میانگین سرعت در مسیر (µm/s) Average path velocity (µm/s)	60.84^{b}±0.47	64.35^{a}±0.44	61.02^{b}±0.70	60.70^{b}±0.70
سرعت در مسیر مستقیم (µm/s) Straight-line velocity (µm/s)	41.67±0.30	42.52±0.54	41.68±0.51	41.88±0.42
سرعت در مسیر منحنی (µm/s) Curvilinear velocity (µm/s)	71.24±0.46	70.75±0.61	70.67±0.47	70.81±0.82
خطی بودن جنبایی (%) Linearity	40.42^{b}±0.28	42.74^{a}±0.59	40.77^{b}±0.49	41.35^{ab}±0.44

[a-b]حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۱).

[1]گروه‌های تیماری شامل کنترل یا بدون روغن گل مغربی (EPSO0)، ۲۵ میکرولیتر روغن گل مغربی(EPSO25)، ۵۰ میکرولیتر روغن گل مغربی (EPSO50)، ۱۰۰ میکرولیتر روغن گل مغربی (EPSO100) بود.

[a-b]Values with different letters within the same row are significantly different (P<0.01).

نتایج حاصل از تجزیه اثرات سطوح مختلف روغن گل مغربی بر برخی صفات در جدول ۲ نشان داده‌شده است. بررسی زنده‌مانی اسپرم نشان داد که تیمار ۲۵ میکرولیتر نسبت به گروه شاهد و دیگر سطوح اختلاف معنی‌داری دارد و باعث افزایش زنده‌مانی اسپرم پس از یخ‌گشایی شد و کمترین درصد زنده‌مانی مربوط به تیمار ۱۰۰ میکرولیتر بود. این کاهش احتمالاً به دلیل تغییرات اسمزی، pH و یا برهم خوردن تعادل رقیق‌کننده صورت گرفته است. افزودن سطوح ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر روغن به رقیق‌کننده صفت یکپارچگی غشا را نسبت به سطح ۱۰۰ میکرولیتر و تیمار شاهد بهبود داد ولی این بهبود در تیمار ۲۵ میکرولیتر نسبت به سطح ۵۰ میکرولیتر بیشتر بود. فرآیند انجماد باعث آسیب برگشت‌ناپذیر به

اسپرماتوزوئید، از جمله تورم و اختلال در غشای پلاسما می‌شود(Tousi و همکاران، ۲۰۱۵). فسفولیپیدها که از اجزای غشای سلولی هستند، سیالیت غشا را تضمین می‌کنند. در واقع آن‌ها اسپرماتوزوئیدها را از شوک سرما محافظت می‌کنند. اسید چرب غیراشباع مانند اسید لینولئیک مشارکت زیادی در فسفولیپیدهای غشای سلولی دارد و افزودن اسید لینولئیک به رقیق‌کننده منی، زنده‌مانی اسپرماتوزوئید را افزایش می‌دهد(Kaya و Eraslan، ۲۰۱۴). ازآنجایی‌که روغن گل مغربی دارای اسیدهای چرب فراوانی است، می‌توان چنین نتیجه گرفت که باعث بهبود یکپارچگی غشای سلول اسپرم می‌شود. در پژوهشی گزارش‌شده است که افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر اسید لینولئیک به رقیق‌کننده منی گاو نر، جنبایی پیش‌رونده و الگوهای حرکتی اسپرماتوزوئید(پس از یخ‌گشایی) را نسبت به گروه شاهد بهبود نبخشید، درحالی‌که روی فراسنجه‌های یکپارچگی غشا اثر مثبت داشته و تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده‌شده است (Buyukleblebici و همکاران، ۲۰۱۴). این پژوهش با نتایج پژوهش حاضر در خصوص فراسنجه‌های حرکتی اسپرم همخوانی ندارد، ولی با صفت یکپارچگی غشا مطابقت دارد. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اسید اولئیک، اسید لینولئیک، اسید آراشیدونیک، اسیدپالمتیک و اسید آلفا لینولئیک، تحرک کل، زنده-مانی و یکپارچگی غشاء را طی ذخیره‌سازی سرد و پس از انجماد-یخ‌گشایی در اسپرم خوک بهبود دادند (Hossain و همکاران، ۲۰۰۷). اسیدهای چرب برای بهبود سیالیت غشاء مهم هستند و از آسیب‌های انجمادی و تشکیل کریستال‌های یخ در حین انجماد جلوگیری می‌کنند همچنین باعث افزایش توانایی لقاح اسپرم می‌شوند (Maldjian و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین مشخص‌شده است که تغییر در غلظت اسیدهای چرب بر انعطاف‌پذیری و فشرده شدن غشاء تأثیر می‌گذارد و حرکت اسپرم را کاهش می‌دهد (Christie، ۱۹۹۹). تأثیر اسیدهای چرب به فاکتورهای مختلفی از جمله روش اضافه کردن، منبع و نوع اسیدهای چرب و غلظت اسیدهای چرب بستگی دارد (Kandelousi و همکاران، ۲۰۱۳. Castellano و همکاران، ۲۰۱۰).

ریخت‌شناسی اسپرم تحت تأثیر سطوح مختلف روغن گل مغربی قرار نگرفت. نتایج حاصل از فعالیت میتوکندری پس از ذوب اسپرم نشان داد که بیشترین درصد اسپرم با میتوکندری فعال به ترتیب مربوط به تیمار ۲۵ میکرولیتر و ۵۰ میکرولیتر می‌باشد و تیمار ۱۰۰ میکرولیتر فعالیت میتوکندری کمتری نسبت به سطوح دیگر از خود نشان داد. نتایج حاصل از پراکسیداسیون لیپیدی نشان داد که کمترین مقدار مالون دی آلدئید تولیدشده مربوط به تیمار ۲۵ میکرولیتر می‌باشد و اختلاف معنی‌داری را با سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دارد، ولی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. پراکسیداسیون لیپیدی با اندازه‌گیری تولید مالون دی آلدئید ارزیابی می‌شود، مولکولی که پس از اکسیداسیون لیپیدها آزاد می‌شود و به‌عنوان نشانگر زیستی استرس اکسیداتیو استفاده می-شود (Sanocka و Kurpisz، ۲۰۰۴). این ماده محصول نهایی پراکسیداسیون چربی است و افزایش آن در منی نشانه پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد. لذا افزایش غلظت این ماده با کاهش قدرت باروری اسپرم‌ها همراه است (Ghiasi Ghalehkandi، ۲۰۱۴). در مطالعه حاضر، تولید مالون دی آلدئید با افزایش میزان روغن بذر گل مغربی افزایش یافت و در تیمار ۱۰۰ میکرولیتر بیشتر بود. بااین‌حال، مقادیر متغیرهای اسپرم در فراسنجه‌های حرکتی و یکپارچگی غشاء و فعالیت میتوکندری برای تیمار ۱۰۰ میکرولیتر مشابه با تیمار شاهد بود. به نظر می‌رسد که مقدار بیشتر مالون دی

آلدئید در تیمار ۱۰۰ میکرولیتر در مقایسه با سایر تیمارها بر مقادیر متغیرهای کیفیت اسپرم تأثیری نداشته است. این موضوع نشان می‌دهد که عوامل دیگری غیر از پراکسیداسیون وجود دارد که اگر به‌درستی مدیریت شود، می‌تواند کیفیت اسپرم منجمد-ذوب شده را بهبود بخشد. حتی اگر مقادیر مالون دی آلدئید نیز افزایش یابد. نتایج حاصل با گزارشات Bucak و همکاران (۲۰۰۹) و Salmani و همکاران(۲۰۱۳) که در آن به نظر می‌رسد پراکسیداسیون لیپیدی دلیل اصلی کاهش کیفیت اسپرم پس از انجماد نیست مطابقت دارد. گزارش‌شده که مکمل PUFA مقاومت در برابر پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داد ((Abavisani و همکاران، ۲۰۱۳). علاوه بر این، گزارش‌شده است که مکمل PUFA باعث کاهش مقاومت در برابر شوک سرمایی و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در مایع منی می‌شود (Kandelousi و همکاران، ۲۰۱۳). آنتی‌اکسیدانت‌های موجود در پلاسمای منی به‌عنوان جاروب کننده‌های رادیکال‌های آزاد، شرایط سلولی را به‌گونه‌ای تغییر می‌دهند که جنبایی اسپرم حفظ‌شده و مرگ سلولی اتفاق نیفتد (Bucak و همکاران، ۲۰۱۰). ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدها به دلیل خواص اکسید و احیاکنندگی، دهنده گروه هیدروکسیل و داشتن خصوصیت کلاته‌کنندگی یون‌های فلزی، نقش مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و تجزیه پراکسیدها دارند (Arora و همکاران، ۱۹۹۸). به همین دلیل استفاده از این آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی بیشتر موردتوجه محققین قرارگرفته است. برخی از ترکیبات فنولیک مثل کافیول استرها که در روغن گل مغربی موجود است مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانتی می‌باشند این ترکیبات همچنین خاصیت جاروب کنندگی و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را بر عهده دارند و واکنش‌های زنجیره‌ای را مهار می‌کنند. علاوه بر این ترکیبات فنولیک اکسیداسیون لیپیدها را از طریق کیلات کردن یون‌های فلزی به تأخیر می‌اندازند. به‌علاوه روغن گل مغربی خام دارای سطح بالایی از آلفاتوکفرول و گاماتوکفرول می‌باشد که همه آن‌ها تأثیر آنتی‌اکسیدانتی دارند همچنین گامالینولنیک در روغن گل مغربی به‌مقدار زیادی یافت می‌شود که تبدیل به دی هوموگامالینولنیک می‌شود. اسید دی هوموگامالینولنیک آنزیم لیپوکسیژناز را مهار می‌کند. مهار مسیر لیپوکسیژناز پر اکسیداسیون لیپیدها را مهار می‌کند. این مکانیسم غیرمستقیم یا جدا از فعالیت آنتی‌اکسیدانتی است. علاوه بر این استرهای روغن سطوح نیتریک اکساید را در سیستم‌های بیولوژیکی کاهش می‌دهد. در پژوهش‌های اخیر که بر روی موش‌ها انجام شد روغن گل مغربی سطوح مالون دی آلدئید را در تمام بافت‌ها در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش داد (Kaya و Eraslan، ۲۰۱۴). این موضوع نشان‌دهنده این است که روغن گل مغربی آنتی‌اکسیدانت قوی می‌باشد و توانایی بدن و سیستم دفاعی بدن را برای جبران رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. مشاهده‌شده است که تغییرات در فعالیت آنتی‌اکسیدانتی به‌طور خلاصه می‌تواند تولید رادیکال‌های آزاد را مهار کند یا اینکه رادیکال‌های آزاد از قبل تولیدشده را غیرفعال کند. (Kaya و Eraslan، ۲۰۱۴). این موضوع با یافته این تحقیق در کاهش سطح مالون دی آلدئید در تیمار ۲۵ میکرولیتر مطابقت دارد.

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف روغن بذر گل مغربی به رقیق‌کننده بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ پس از انجماد-یخ‌گشایی

Table 2- The effect of different levels of evening primrose seed oil on sperm quality parameters

تیمارها[1] Treatments				فراسنجه Parameter
EPSO100	EPSO50	EPSO25	EPSO0	
$40.14^{c}\pm0.63$	$41.71^{b}\pm0.21$	$49.14^{a}\pm0.73$	$39.14^{c}\pm0.50$	یکپارچگی غشاء (%) Membrane integrity (%)
18.57 ± 0.36	17.75 ± 0.36	17.75 ± 0.36	18.71 ± 0.42	ریخت‌شناسی غیرطبیعی(%) Abnormality (%)
$48.28^{c}\pm0.44$	$49.85^{bc}\pm0.50$	$51.75^{a}\pm0.48$	$50.14^{b}\pm0.45$	زنده‌مانی (%) sperm viability
$32.14^{b}\pm0.63$	$38.85^{a}\pm0.59$	$48.51^{a}\pm0.56$	$31.28^{b}\pm0.42$	فعالیت میتوکندری (%) Mitochondrial activity (%)
$3.78^{a}\pm0.11$	$3.44^{a}\pm0.14$	$2.90^{b}\pm0.13$	$2.97^{b}\pm0.07$	مالون‌دی‌آلدهید (نانو مول بر میلی‌لیتر) (nmol/ml) Malondialdehyde

[a-c]حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۱).

[1]بدون روغن گل مغربی (EPSO0)، دارای ۲۵ میکرولیتر روغن گل مغربی (EPSO25) دارای ۵۰ میکرولیتر روغن گل مغربی(EPSO50)، دارای ۱۰۰ میکرولیتر روغن گل **مغربی**(EPSO100).

[a-c]Values with different letters within the same row are significantly different (P<0.01).

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف روغن بذر گل مغربی به رقیق‌کننده بر وضعیت آپوپتوز اسپرم قوچ بعد از فرآیند یخ‌گشایی

Table 3- The effect of different levels of evening primrose seed oil on sperm apoptosis after thawing process

تیمارها[1] Treatments				فراسنجه parameter
EPSO100	EPSO50	EPSO25	EPSO0	
$32.71^{a}\pm0.53$	$29.14^{b}\pm0.40$	$28.15^{b}\pm0.45$	$33.15^{a}\pm0.55$	آپوپتوز Apoptosis
$30.57^{b}\pm0.68$	$34.29^{a}\pm0.56$	$40.57^{a}\pm0.48$	$29.28^{b}\pm0.35$	اسپرم زنده Live sperm
$36.71^{a}\pm0.64$	$36.5^{a}\pm0.42$	$31.28^{b}\pm0.36$	$37.57^{a}\pm0.56$	اسپرم مرده Dead sperm

[a-b]حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۱).

بدون روغن گل مغربی، (EPSO0)، دارای ۲۵ میکرو لیتر روغن گل مغربی (EPSO25)دارای ۵۰ میکرو لیتر روغن گل مغربی((EPSO50)، دارای ۱۰۰ میکرو لیتر روغن گل **مغربی**(EPSO100).

[a-b]Values with different letters within the same row are significantly different (P<0.01).

نتایج حاصل از آزمایش آپوپتوز در جدول ۳ نشان داده‌شده است. این تحقیق نشان داد که افزودن سطوح ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر روغن گل مغربی به رقیق‌کننده باعث کاهش میزان آپوپتوز نسبت به گروه شاهد و سطح ۱۰۰ میکرو لیتر روغن گل مغربی گردید. همچنین زنده‌مانی در تیمار ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر نسبت به دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت و باعث افزایش زنده‌مانی گردید. درنهایت اسپرم‌های مرده در تیمار ۲۵ میکرولیتر نسبت به دیگر گروه‌های آزمایشی کمتر بود و همین امر سبب اختلاف معنی‌دار این صفت نسبت به دیگر سطوح گردید. Kaka و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که اضافه کردن پالمتیک اسید و لینولئیک اسید زنده‌مانی اسپرم‌های گاو نر را پس از انجماد و یخ‌گشایی بهبود می‌دهد.

همچنین گزارش‌شده است که اضافه کردن کپسول‌های ژلاتینی دارای اسیدهای چرب، امگا ۳، امگا ۶ و امگا ۹، تحرک اسپرم گاو نر را در شرایط سرد و پس از انجماد کاهش داد (Kandelousi و همکاران، ۲۰۱۳). تفاوت در این نتایج ممکن است مربوط به غلظت و منبع تهیه اسیدهای چرب باشد. دلیل دیگر تفاوت می‌تواند مربوط به حلال یا غیرحلال بودن اسیدهای چرب باشد. همچنین این نتایج به مشکل اضافه کردن موفقیت‌آمیز مواد افزودنی اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه به محیط جهت حفاظت از اسپرم در هنگام انجماد و یخ‌گشایی نسبت داده‌شده است (Abavisani و همکاران، ۲۰۱۳).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این پژوهش، افزودن ۲۵ میکرولیتر روغن بذر گل مغربی به رقیق‌کننده اسپرم قوچ پس از فرآیند یخ‌گشایی، بر فراسنجه‌های زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء، فعالیت میتوکندری اثر مثبتی دارد. همچنین افزودن ۲۵ میکرولیتر روغن بذر گل مغربی بر روی فراسنجه‌های تحرک اسپرم پس از فرآیند یخ گشایی تأثیر مثبت و معنی‌داری نشان داد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان استفاده از روغن بذر گل مغربی تا سطح ۲۵ میکرولیتر در رقیق‌کننده انجمادی تریس جهت بهبود فراسنجه‌های مورد آزمایش پیشنهاد کرد.

منابع

Abavisani, A., Arshami, J., Naserian, A.A., Kandelousi, M.A.S. and Azizzadeh, M. 2013. Quality of bovine chilled or frozen-thawed semen after addition of omega-3 fatty acids supplementation to extender. International Journal of Fertility and Sterility, 7 (3):161-168.

Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima Mozaff* in model and food systems, Food Chemistry, 105: 57-64.

Aitken, R.J. and Sawyer, D. 2003. The human spermatozoon – not waving but drowning. Advances in Experimental Medicine and Biology, 518: 85-98.

Ansari, M., Towhidi, A., Moradi Shahrbabak, M. and Bahreini, M. 2012. Docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol improve sperm Cryosurvival in goat. Slovak Journal of Animal Science,45: 7-13.

Arora, A., Nair, G.M. and Strasburg, M.G. 1998. Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. Free Radical Biology and Medicine, 2: 1355-1363.

Asgari, M., Khodaei Motlagh, M., Kazemi bonchenari, M., Vahedi, V.2020. Antioxidant effect of carob seedextract (*Ceratoniasiliqua L*) on quality parameters Farahani ram sperm after freeze-thawing. Journal of Cell and Tissue, 11:1-12.

Bailey, J. L., Bilodeau, J. and Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. Journal of Andrology, 21: 1-12.

Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A. and Gagnon, C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing.Molecular Reproduction and Development, 55: 282–288.

Birch, A.E., Fenner, G.P., Watkins, R. and Boyd, L.C. 2001. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 4502-4507.

Bucak, M. N., Atessahin, A. and Yuce, A. 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. Small Ruminant Research, 75: 128-134.

Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sarıözkan, S., Başpınar, N., Taşpınar, M., Çoyan, K., Bilgili, A., Akalın, P.P., Büyükleblebici, S., Aydos, S. and Ilgaz, S. 2010. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. Cryobiology 61: 248-53.

Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sarıözkan, S. and Ulutaş, P.A. 2009. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. Small Ruminant Research, 81:13-17.

Buyukleblebici, S., Tasdemir, U., Tuncer, P. B., Durmaz, E., Ozgurtaş, T., Buyukleblebici, O. and Gurcan, İ. S. 2014. Can linoleic acid improve the quality of frozen thawed bull sperm. Cryoletters, 35: 473-481.

Castellano ,C.A ., Audet, I ., Bailey, J ., Laforest, J. and Matte, J. 2010. Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at17 C or Cryopreserved. Theriogenology,74 (8):1482-1490.

Christie, W. W. 1999. The analysis of evening primrose oil. Industrial crop and Products, 10: 73-83.

Chun, J.Y. 2002. Vitamin E content and stability in peanuts and peanut products during processing and storage (Doctoral dissertation, uga).

De La Cruz, J.P., Quintero, L., Galvez, J., Villalobos, M.A. and De La Cuesta, F.S. 1999. Antioxidant potential of Evening Primrose Oil administration in hyperlipemic rabbits. Life Sciences,65: 543-555.

Eskin, N.A.M. 2008. Borage and Evening Primrose Oil. European Journal of Lipid Science and Technology, 110: 651–654.

Evans, G.، Maxwell, W. M. C.1987. Salamons' artificial insemination of sheep and goats. No.Ed. 2 pp.xi ,194 pp.

Fan, Y.Y. and Chapkin, R.S. 1998. Importance of dietary γ-Linolenic acid in human health and nutrition. The Journal of Nutrition, 128: 1411-1414.

Farshad, A., Farzinpour, A. and Mahmoudi, SH. 2016. Effects of α- Linolenic and linoleic fatty acids, with or without trehalose and sucrose on quality of Markhoz goat frozen-thawed spermatozoa. Animal Science Journal, 114:35-42. (In Persian).

Giulini, S., Sblendorio, V., Xella, S., La Marca, A., Palmieri, B. and Volpe, A. 2009. Seminal plasma total antioxidant capacity and semen parameters in patients with varicocele. Reproductive Biomedicine Online, 18: 617-621.

Ghiasi Ghalehkandi, J. 2014. Garlic (*Allium sativum*) juice protects from semen oxidative stress in male rats exposed to chromium chloride. Animal Reproduction,11(4): 526-532.

Grilo, E.C., Costa, P.N., Gurgel, C.S.S., Beserra, A.F.D.L., Almeida, F.N.D.S. and Dimenstein, R. 2014. Alpha tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils. Food Science and Technology (Campinas), 34(2): 379-385.

Hossain, S., Tareq, K.M.A., Hammano, K.-I., Tsujii, H. 2007. Effect of fatty acids on boar sperm motility, viability and acrosome reaction. Reproductive Medicine and Biology, 6:235–239.

Hudson, B. J. F. 1984. Evening primrose (*Oenothera spp*.) oil and seed. Journal of the American Oil Chemists Society, 61: 540-543.

Kandelousi, M.S., Arshami, J., Naserian, A., Abavisani, A. 2013. The effects of addition of omega-3, 6, 9 fatty acids on the quality of bovine chilled and frozen-thawed sperm. Open Veterinary Journal,3 (1): 47–52.

Kaka, A., Haron, Wahid., Leghari, R. A. Memon, M. I., Kaka, U., Mirani, A. H., Naeem, M. and Kalwar, Q. 2016. Effect of *in-vitro* supplementation of polyunsaturated fatty acids on frozen-thawed bull sperm characteristics using Bioxcell® extender. Pure and Applied Biology,5: 399-405.

Kaka, A., Haron, W., Yusoff, R., Yimer, N., Khumran, A. M., Sarsaifi , K., Behan Atique, A., Kaka, U., Memon, A. A., Ebrahimi, M. 2017. Effect of Docosahexanoic acid on quality of frozen–thawed bull semen in BioXcell extender. Reproduction, Fertility and Development,29:490-495.

Kasamo, K., Kagita, F., Yamanishi, H. and Sakaki, T. 1992. Low temperature-induced changes in the thermotropic properties and fatty acid composition of the plasma membrane and tonoplast of cultured rice (*Oryza sativa L*.) cells. Plant and Cell Physiology, 33: 609-616.

Kaya, Z., Eraslan, G.2014. The effects of evening primrose oil on arsenic-induced oxidative stress in rats. Toxicological and Environmental Chemistry,95:1416-1423.

Knorr, R. and Hamburger, M. 2004. Quantitative analysis of anti-inflamatory and radical scavenging triterpenoid esters in evening primrose oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 3319-3324.

Leboeuf, B., Manfredi, E., Boue, P., Piacère, A., Brice, G., Baril, G. and Terqui, M. 1998. Artificial insemination of dairy goats in France. Livestock Production Science, 55: 193-203

Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., Lombardo, F., Terminali, O., Passi, S. and Dondero, F. 1994. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. Journal Human Reproduction, 9: 2044-2050.

Makker, K., Agarwal, A. and Sharma, R. 2009. Oxidative stress and male infertility. Indian Journal of Medical Research, 129: 357-367.

Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T., Cerolini, S., Penny, P. and Noble, R. 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen.Theriogenology, 63 (2):411-421.

Munir, R., Semmar, N., Farman, M. and Ahmad, N.S. 2017. An updated review on pharmacological activities and phytochemical constituents of evening primrose *(genus Oenothera*). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7: 1046–1054.

Placer, Z.A., Cushman, L.L., Johnson, B.C. 1966. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. Analytical Biochemistry, 16(2): 359-364.

Revell, S.G. and Mrode, R.A. 1994. An osmotic resistant test for bovine semen. Animal Reproduction Science, 35(3): 305-312.

Rostami, S., Beigi nassiri, M. T., Nazari, M., Tabatabaei Vakili, S. 2019. Effect of freezing with different extenders on the semen quality and sex ratio of Holstien bull sperm by Real-time qPCR technique. Animal Production, 21(3): 409-418. (In Persian).

Salamon, S. and Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science, 62: 77-111.

Salmani, H., Nabi, M.M., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, R., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Towhidi, A., Zare Shahneh, A. and Zhandi, M. 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing.Small Ruminant Research, 112:123-127.

SAS Institute. 2003. STAT user's guide: Statistics. Version 9.1. Cary, NC: Statistical Analysis System Institute.

Sanocka, D. and Kurpisz, M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. Reproductive Biology and Endocrinology, 2:12-18.

Schmidt, S., Niklova, I., Pokorny, J., Farkas, P. and Sekretar, S. 2003. Antioxidant activity of evening primrose phenolics in sunflower and rapeseed oils. European Journal of Lipid Science and Technology, 105: 427-435.

Tousi, S., Aminafshar, M., Gharaelyasipour, S. 2015. Mild osmotic stresses induction in sperm freezing medium and their effects on bull sperm quality. Journal of Cell and Tissue,6(2): 213-220.

Towhidi, A.and Parks, J. E. 2012. Effect of n-3 fatty acids and α-tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 29:1051-1056.

Zahradnikova, L., Schmidt, S., Sekelyova, Z. and Sekretar, S. 2008. Fractionation and identification of some phenolics extracted from evening primrose seed meal. Czech Journal of Food Sciences, 26: 58.