نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۰۸، پاییز ۱۳۹٤
ص‌ص: ۱۰۱~۱۱۲

بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره مرزه ماکرانتا بر فراسنجه‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی اسپرم گاو پس از فرآیند انجماد-یخ گشایی

- **حسین دقیق کیا** (نویسنده مسئول)

دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

- **رقیه شهباززاده**

دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

- **ایرج اشرفی**

دانشجوی دکتری فیزیولوژی دام دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

تاریخ دریافت : بهمن ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش : خرداد ۱۳۹۳

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۰۸۹۴۳۱

Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

چکیده

آسیب‌های اکسیداتیو به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد در طی فرآیند انجماد- یخ‌گشایی، یکی از مهمترین دلایل کاهش باروری اسپرم می‌باشند. استفاده از آنتی اکسیدان‌ها در جهت حذف و پاکسازی رادیکال‌های آزاد از محیط اطراف اسپرم ضروری به نظر می‌رسد. هدف این مطالعه، بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی سطوح مختلف عصاره مرزه ماکرانتا در رقیق‌کننده اسپرم گاو می‌باشد. نمونه‌های منی پس از جمع‌آوری از ۳ راس گاو نر هلشتاین، با رقیق‌کننده سیترات-زرده تخم مرغ به همراه سطوح مختلف عصاره مرزه ماکرانتا (۰، ۲، ٤، ۸، ۱۲، ۱٦ و ۲۰ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر) رقیق شده و پس از طی مراحل سردسازی، بسته‌بندی و انجماد در تانک حاوی ازت مایع ذخیره شدند. پس از یخ‌گشایی، فراسنجه‌های تحرک اسپرم، میزان زنده‌مانی اسپرم، یکپارچگی غشای پلاسمایی و پراکسیداسیون لیپید به ترتیب توسط نرم افزار تجزیه و تحلیل کامپیوتری تحرک اسپرم، رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین، تست التهاب هیپواسموتیک و تولید مالون‌دی‌آلدهید ارزیابی شدند. نتایج این مطالعه نشان دادند که استفاده از ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره مرزه ماکرانتا بهترین اثر محافظتی را روی اسپرم یخ‌گشایی شده گاو هلشتاین داشته و موجب بهبود معنی‌دار کلیه فراسنجه‌های میکروسکوپی شد. افزودن ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره، غلظت مالون‌دی‌آلدهید را نسبت به سایر گروه‌ها کاهش داد که این کاهش در مقایسه با گروه شاهد از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از تاثیر مثبت دوزهای پایین عصاره مرزه ماکرانتا بر فراسنجه‌های میکروسکوپی اسپرم منجمد-یخ گشایی شده گاو می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: مرزه ماکرانتا، فعالیت آنتی اکسیدانی، فریز اسپرم، گاو.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 108 pp: 101-112

Antioxidant effect of Macrantha Satureja extraction on microscopic and biochemical parameters of bull sperm after freeze -thawing process

Hossein Daghigh Kia*[1], Roghayeh Shahbaz zadeh[2], Iraj Ashrafi[3]

1:Faculty member, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir. Tel: +989144089431

2: Graduate MSc Student, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

3: PhD Student, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: February 2014 **Accepted: June 2014**

Oxidative damage due to production of reactive oxygen species during the freezing-thawing process is one of the main causes for the decline in fertility of sperm. The use of antioxidants to eliminate free radicals from the sperm diluents appears to be essential for sperm. The aim of this study was to investigate the antioxidant effect of different levels of Macrantha Satureja extracts on quality of post thawed sperm. Semen samples were collected from three Holstein bulls and diluted with a citrate-egg yolks diluents - with different levels (0, 2, 4, 8, 12, 16 and 20 ml/dl) of Macrantha Satureja extraction. After packing, cooling and freezing steps, straws stored in the liquid nitrogen tank. After freeze-thawing, the sperm motility, viability, plasma membrane integrity parameters and lipid peroxidation, were evaluated using Computer Assisted Semen Analysis, eosin-nigrosin staining, hypo-osmotic swelling test and malondialdehyde production respectively. The results showed that the extender supplemented with 4 ml/dl Macrantha Satureja extract have the best protective effect on freeze-thawed Holstein bull sperm and significantly improved all microscopic parameters. Inclusion of 4 ml/dl of extract, decreased the serum malondialdehyde compared to the other groups, however, this decrease was not statistically significant compared to control group. The result of this study confirms the positive effects of low doses of Macrantha Satureja extract on microscopic parameters of frozen-thawed bull sperm.

Key words: Macrantha Satureja, Antioxidant activity, sperm freezing, bull

مقدمه

در سیستم‌های صنعتی پرورش دام‌های اهلی، انجماد اسپرم و تلقیح مصنوعی نقش مهمی در کنترل تولیدمثل و اصلاح نژاد دارند. آسیب وارده به ساختمان اسپرم در طول فرآیند انجماد–یخ-گشایی، بزرگترین مانع در انجماد اسپرم بوده و منجر به باروری ضعیف اسپرم منجمد می‌گردد (Watson، ۲۰۰۰).

فاکتورهای ژنتیکی، فیزیولوژیکی و محیطی بسیاری در عملکرد ضعیف اسپرم تاثیرگذار هستند. در میان علل گوناگون، استرس اکسیداتیو به تاثیرگذاری بر ناباروری و فیزیولوژی اسپرم‌ها نسبت داده می‌شود (Bansal و Bilaspuri، ۲۰۱۱). استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین مواد اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که با افزایش سرعت آسیب سلولی توسط اکسیژن و اکسیدان‌های مشتق از اکسیژن معروف به گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)[1] همراه است (Bucak و همکاران، ۲۰۱۰). پلاسمای منی گاو، یک منبع مهم آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که اسپرم را در فرآیند انجماد، علیه استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (Bilodeau و همکاران، ۲۰۰۰). آنتی‌اکسیدان‌های کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز که به عنوان مکانیسم عملکرد دفاعی لیپید پراکسیداسیون در منی توصیف شده‌اند (Bilodeau و همکاران، ۲۰۰۱؛ Fahy، ۱۹۸۶)، در غلظت‌های بالا در سیتوپلاسم اکثر سلول‌ها یافت می‌شوند. در طی اسپرماتوژنز، اسپرم‌ها مقادیر قابل توجهی از سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهند.

بنابراین، تنها مقدار کمی از این خنثی کننده‌های اثرات ROS وجود دارند (Haeri و همکاران، ۲۰۰۶) که برای ممانعت از پراکسیداسیون لیپید در طول فرآیند انجماد–یخ‌گشایی، ناکافی می‌باشند (Özcan و Al Juhaimi،2011) از این‌رو، برای

[1]-Reactive oxygen species

رقیق‌سازی اسپرم نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدان‌هائی با منشأ خارجی می‌باشد (Bansal و Bilaspuri، ۲۰۱۱).

آنتی‌اکسیدان‌های متنوعی در سال‌های اخیر، برای محافظت اسپرم در طول فرآیند انجماد–یخ‌گشایی استفاده شده است. با این حال، استفاده از آنتی اکسیدان‌های سنتتیک دارای مشکلاتی است که در چند سال اخیر محققین و تولیدکنندگان اسپرم منجمد را به جایگزین نمودن آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک با آنتی اکسیدان‌های گیاهی مانند رزماری متمایل کرده است (Sadeghi Ghotbabadi و همکاران، ۲۰۱۲). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی برای حفظ انجماد منی حیوانات اهلی از قبیل خوک (Malo و همکاران، ۲۰۱۱)، سگ (Gadea و همکاران، ۲۰۰۴)، گوسفند (González و همکاران، ۲۰۱۰) و بز (Zanganeh و همکاران، ۲۰۱۳) به طور موفقیت‌آمیزی آزمایش شده‌اند.

مرزه متعلق به خانواده نعنائیان و شامل بیش از ۳۰ گونه است که مرزه ماکرانتا (Macrantha) یکی از این گونه‌ها بوده و در بخش‌های شمال غرب و غرب ایران به ویژه در منطقه کلیبر استان آذربایجان‌شرقی یافت می شود. ۶۵ ترکیب در اسانس مرزه Macrantha شناسایی شده است که پاراسایمن (۲۵/۸٪)، لیمونن (۱۶/۳٪) و تیمول (۸/۱٪) ترکیبات اصلی می‌باشند (Rezvanfar و همکاران، ۲۰۰۸). گونه‌های مرزه مانند دیگر اعضای خانواده نعنائیان غنی از ترکیبات فنولیک از جمله فلاونوییدها، فنولیک اسیدها و دی‌ترپن‌های فنولیک بوده و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌باشند. فلاونوییدها و ترکیبات فنولیک دارای چندین خاصیت فارماکولوژیکی از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد می‌باشند (Sefidkon و Jamzad، ۲۰۰۵).

تاکنون گزارشی مبنی بر تاثیر عصاره مرزه ماکرانتا بر فراسنجه‌های بعد از یخ‌گشایی اسپرم صورت نگرفته است. بنابر این، مطالعه در جهت بررسی و مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره مرزه ماکرانتا روی فراسنجه های کیفیت اسپرم گاو و در نتیجه انتخاب بهترین سطح از عصاره برای انجماد منی گاو انجام پذیرفت.

مواد وروش ها

تهیه عصاره مرزه ماکرانتا

عصاره اتانولی مرزه ماکرانتا در آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده علوم پایه دانشگاه تبریز تهیه شد. مرزه ماکرانتا از منطقه آذربایجان‌شرقی (شهرستان کلیبر) جمع‌آوری و بعد از خشک‌کردن در سایه و دمای اتاق، به صورت پودر درآمده و مقدار ۵۰ گرم از پودر را در یک بشر ۱۰۰۰ میلی‌لیتری ریخته و روی آن تا ارتفاع ۲ سانتی‌متر بالاتر از سطح مرزه، اتانول ۶۰٪ (تا حدودی که تمامی پودر را بپوشاند) ریخته و هر ۳ ساعت بهم زده شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت، از کاغذ صافی عبور داده شد. عمل خیساندن و صاف کردن حدود ۳ بار تکرار گردید. محلول صاف شده به کمک دستگاه سوکسله تغلیظ شده و بعد در مجاورت هوای آزاد قرار داده شد تا حلال آن به طور کامل جدا گردد (Tavassoli و Djomeh، ۲۰۱۱). عصاره غلیظ مرزه ماکرانتا جهت مصرف در این آزمایش در ۵۰ میکرولیتر توئین ۸۰٪ [۲] و آب دیونیزه حل شد (Zhao و همکاران، ۲۰۰۹).

تهیه نمونه منی و فرآوری آن

در این تحقیق، از منی گاوهای هلشتاین مرکز اصلاح نژاد شمال-غرب و غرب کشور که از نظر سلامت عمومی و ویژگی‌های تولیدمثلی (اندازه بیضه، سلامت غضیب و توانایی جفت‌گیری) در حد مطلوبی قرار داشتند، استفاده شد. نمونه‌های منی از سه راس گاو هلشتاین دو بار در هفته به وسیله مهبل مصنوعی جمع‌آوری شدند. نمونه‌هایی که دارای رنگ کرمی، حجم بین ۱۲-۵ میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از $۱۰^{۹}$ ×۱ سلول اسپرم در هر میلی‌لیتر، تحرک بیشتر از ۷۰ درصد و مرفولوژی کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیرطبیعی در هر انزال بودند به عنوان منی طبیعی گاو در نظر گرفته شده و در غیر این‌صورت، منی جمع‌آوری شده از دام مورد نظر حذف شد. سپس به منظور حذف اثرات فردی دام و با در نظر گرفتن جمعیت اسپرم در مایع منی از نمونه‌های منی هر دام به مقدار مساوی در یک لوله آزمایش مجزا ریخته و با هم مخلوط شدند.

۱-Tween 80

در این آزمایش از رقیق کننده بر پایه سیترات-زرده تخم مرغ به همراه سطوح مختلف عصاره مرزه ماکرانتا (۰، ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی لیتر بر دسی لیتر) استفاده شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر این محلول حاوی ۲۵ ml زرده تخم مرغ، ۶۷/۱۶۷۵ ml محلول حاوی۲/۹٪ سیترات، ۷ ml گلیسرول، ۵ ml جنتامایسین، ۰/۳ ml لینکوپک ، ۰/۰۲۵ ml تایلوزین و pH=۶/۹ بود. در رقیق‌سازی اسپرم گاو از روش دو مرحله‌ای استفاده شد، به نحوی که ۳ درصد گلیسرول در مرحله اول و در دمای ۳۵°C (رقیق کننده A) و باقیمانده گلیسرول (۱۱ درصد) در دمای ۵°C (رقیق کننده B) به مایع منی افزوده شد. ترکیب مواد و حجم رقیق کننده‌های A و B در فرآوری اسپرم گاو به جز درصد گلیسرول کاملا یکسان بود. بعد از سپری شدن زمان سردسازی و تعادل، نمونه‌ها توسط دستگاه پر کن در پایت‌های ۰/۵میلی لیتری پر و بسته‌بندی شدند. پایت‌ها روی راک چیده شده و به دستگاه نیمه اتوماتیک انجماد اسپرم که قبلا در دمای ۵۰°C- تنظیم شده بود، منتقل شدند. پایت‌ها به مدت دو دقیقه در دمای ۵۰°C- ماندند و در ادامه شیب انجماد به گونه ای تنظیم شد که دمای داخل دستگاه در عرض ۱۴ دقیقه از دمای۵۰°C- به ۱۵۰°C- رسید (حدود ۷°C- در هر دقیقه). بعد از انجماد برای نگهداری تا زمان ارزیابی به تانک‌های ازت منتقل شدند.

یخ گشایی و ارزیابی فراسنجه های اسپرم:

پایوت های حاوی منی منجمد شده از تانک ازت خارج شده و در داخل حمام آب گرم با دمای ۳۷°C به مدت ۴۵ ثانیه یخ‌گشایی شدند، سپس محتویات پایت درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری تخلیه شده و جهت تطابق‌پذیری و بازگشت آب درون‌سلولی به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفتند.

تحرک اسپرم

پس از یخ‌گشایی و انکوباسیون، ویژگی‌های جنبایی، جنبایی پیش‌رونده و سایر ویژگی‌های حرکتی سلول‌های اسپرم برای تمام تیمارهای آزمایشی به کمک نرم افزار تجزیه و تحلیل کامپیوتری (CASA)[۳] مجهز به میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۱۰۰× ارزیابی شدند. ۵ میکرولیتر از نمونه توسط سمپلر روی لام از قبل گرم شده (دمای ۳۷°C) قرار گرفته و با لامل پوشانده و روی صفحه گرم میکروسکوپ قرار داده شد. از هر نمونه حداقل ۱۰ فیلد به طور کاملا تصادفی انتخاب و بوسیله سیستم کاسا آنالیز شد. ارزیابی بر اساس شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم صورت گرفت. از سیستم CASA مدل HFTCASA ساخت شرکت فن آوران هوشمند تهران برای انجام این پژوهش استفاده شد. این سیستم مجهز به یک میکروسکوپ سه چشمی فاز کنتراست (Nikon, Japan)، یک دوربین (SAMSUNG, Korea)، صفحه گرم (Hot Stage)، یک کارت سخت افزار برای تبدیل تصاویر به صورت دیجیتال، یک کامپیوتر و یک نرم افزار بسیار پیشرفته پردازش و آنالیز تصاویر بر اساس تکنیک‌های هوش مصنوعی بود. فراسنجه‌هایی که توسط این سیستم‌ها برآورد شدند شامل جنبایی، جنبایی پیش‌رونده، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، میانگین سرعت در مسیر، درصد خطی بودن جنبایی، راستی مسیر طی شده و جنبایی عرضی سر بودند.

زنده مانی اسپرم

وضعیت زنده‌مانی اسپرم‌ها به وسیله رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین (۱/۶۷ گرم رنگ ائوزینY، ۱۰ گرم رنگ نگروزین، ۲/۹ گرم سیترات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) بر اساس روش De Graaf و همکاران (۲۰۰۷) ارزیابی شد. یک قطره نمونه اسپرم و یک قطره رنگ روی لام گرم مخلوط شده و با لام دیگری گسترش تهیه شد. جهت خشک کردن، نمونه گسترش یافته بمدت سه دقیقه در دمای ۳۷ °C قرار گرفت. زنده‌مانی تعداد ۲۰۰ اسپرم به وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی × ۱۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌هایی که به طور جزیی یا کامل رنگ ارغوانی را نشان دادند مرده و تنها اسپرم‌هایی که از ورود رنگ به داخل خود ممانعت کرده بودند به عنوان اسپرم زنده مدنظر قرار گرفتند.

یک‌پارچگی غشای پلاسمایی

یک‌پارچگی غشای پلاسمایی با استفاده از تست التهاب هیپواسموتیک (HOST) بر اساس روش Buckett و همکاران (۱۹۹۷) تعیین شد. به طور خلاصه، یک محلول هیپو-اسموتیک (100 mOsm/L) به وسیله حل کردن ۴/۹ گرم تری-سدیم

[۱] Computer Aided Semen Analyses

سیترات دی‌هیدرات و ۹ گرم D(-) فروکتوز در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر یونیزه آماده شده است. برای این آزمایش، ابتدا ۵۰ µl از هر نمونه اسپرم منجمد-یخ گشایی شده با ۵۰۰µl محلول هیپواسموتیک مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ ° C گرمخانه گذاری شدند. سپس نمونه با ملایمت مخلوط شده و یک قطره (حدود ۵µl) روی لام قرار داده و با لام پوشانده و زیر میکروسکوپ (×۴۰۰) بررسی شد. ۲۰۰ عدد اسپرم در هر اسلاید شمارش شده و درصد اسپرم‌هایی با دم تاب‌خورده (طبیعی) که دارای غشای سالم بودند و اسپرم هایی با دم صاف با غشای آسیب دیده تعیین شدند.

ارزیابی پراکسیداسیون لیپید

غلظت‌های مالون دی‌آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید است که با استفاده از واکنش اسید تیوباربیتوریتیک (TBA)[۴] اندازه‌گیری شد. معمولا در دمای ۹۵°C و شرایط اسیدی، یک مولکول MDA[۵] با دو مولکول اسید تیوباربیتوریتیک واکنش داده و کمپلکس صورتی رنگی را به وجود می آورد. برای ارزیابی پراکسیداسیون لیپید ابتدا هموژن سلولی تهیه شد. به این صورت که پایوت‌های حاوی منی منجمد در آب حاوی۳۷°C به مدت۴۰ ثانیه یخ‌گشایی شدند و بعد از تخلیه محتویات پایوت‌ها به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری، بلافاصله پس از افزودن ۱ میلی-لیتر کلریدسدیم ۰/۹ درصد با سرعت ۳۵۰۰×G به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس سه بار با بافر سیترات شستشو و مجددا سانتریفیوژ شدند.

در نهایت محلول رویی دور ریخته شده و پلت باقیمانده اسپرم‌ها در ۱ میلی لیتر آب دی‌یونیزه حل شدند و تا زمان ارزیابی نمونه‌ها در فریزر (-۸۰°C) نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید ابتدا نمونه‌ها در دمای۳۷°C یخ گشایی شده و ۲۵۰ میکرولیتر از هموژن سلولی به ۱ میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد تری کلریدریک اسید و ۰/۵ درصد تیوباربیتوریتیک اسید اضافه و به مدت ۱ساعت در دمای ۹۵°C حرارت داده شد و سپس سریعا روی یخ سرد شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند (۱۰ هزار دور در دقیقه).

سپس جذب محلول رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. غلظت MDA به وسیله فرمول زیر محاسبه و واحد آن بر حسب نانومول بر دسی لیتر نوشته شد. (Peris و همکاران، ۲۰۰۷).

$A=\varepsilon Cl$ معادله بیر-لامبرت

$l=۱cm$

$\varepsilon=۱۵۵$ nmol/ml

A = عدد جذب

C =غلظت مالون دی آلدهید

روش تجزیه وتحلیل اطلاعات

این تحقیق با هفت تیمار و هرکدام در ۵ تکرار انجام گردید.

داده‌های بدست آمده برای فراسنجه‌های درصد تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، پاسخ به محلول HOST در قالب طرح کاملا تصادفی و بر اساس مدل آماری زیر و با استفاده از نرم افزار SAS (۹.۱.۳) و با کمک رویه GLM آنالیز شدند. قبل از انجام آنالیز آماری، داده‌ها به صورت Arcsin تبدیل شده و آنالیزها بر روی داده‌های تبدیل شده انجام گردید. برای معنی‌داری اثرات از آزمون مقایسه‌ای دانکن استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار بیان شدند. سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری MDA نیز توسط این رویه آنالیز شدند. مدل آماری این طرح عبارت است از:

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

Y_{ij} = مشاهده ij ام

μ = میانگین جمعیت

$Treat_i$ = اثر تیمارها

e_{ij}= اثر عوامل ناشناخته ij ام

---

[4] - Tiobarbitoretic Acid

[5] - Malonaldialdehyde

نتایج

فراسنجه های تحرک

نتایج تاثیر سطوح مختلف عصاره مرزه‌ماکرانتا بر فراسنجه‌های تحرک بعد از فرایند انجماد–یخ‌گشایی در نمودارهای ۴-۱ نشان داده شده است. رقیق کننده حاوی سطح ۴ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره مرزه ماکرانتا، موجب بهبود تحرک کل نسبت به گروه شاهد شده است (P< ۰/۰۵). تفاوت تیمارهای ۲ و ۸ میلی لیتر بر دسی لیتر نسبت به گروه شاهد غیر معنی‌دار بوده و سطوح تیماری ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر به طور معنی‌داری باعث کاهش تحرک کل نسبت به سطوح دیگر شده است (P< ۰/۰۵).

رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح ۲ و ۴ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره ماکرانتا تحرک پیش‌رونده را نسبت به گروه شاهد افزایش داده که این افزایش نسبت به گروه شاهد برای تیمار ۲ غیر معنی‌دار و برای تیمار ۴ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر معنی‌دار بود (P < ۰/۰۵). اختلاف تیمار ۸ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر با گروه شاهد غیر معنی‌دار بوده و سایر سطوح تیماری موجب کاهش تحرک پیش‌رونده نسبت به گروه شاهد شدند (P < ۰/۰۵) (نمودار۲).

فراسنجه‌های سرعت در مسیر منحنی، سرعت در مسیر مستقیم و میانگین سرعت در مسیر با افزودن ۴ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره به رقیق‌کننده منی بهبود یافت (P < ۰/۰۵). مقدار هر سه فراسنجه ذکر شده درتیمارهای ۲ و ۸ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نداشت اما با افزودن تیمارهای ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره در مقایسه با سایر سطوح تیماری کاهش یافتند (P < ۰/۰۵) (نمودار۱).

فراسنجه‌های دیگر تحرک یعنی تحرک عرضی سر و خطی بودن تحرک، با افزودن ۴ میلی لیتر بر دسی‌لیتر عصاره، بهترین عملکرد را در مقایسه با سایر سطوح تیماری داشتند (P < ۰/۰۵). (نمودار۳و ۴)

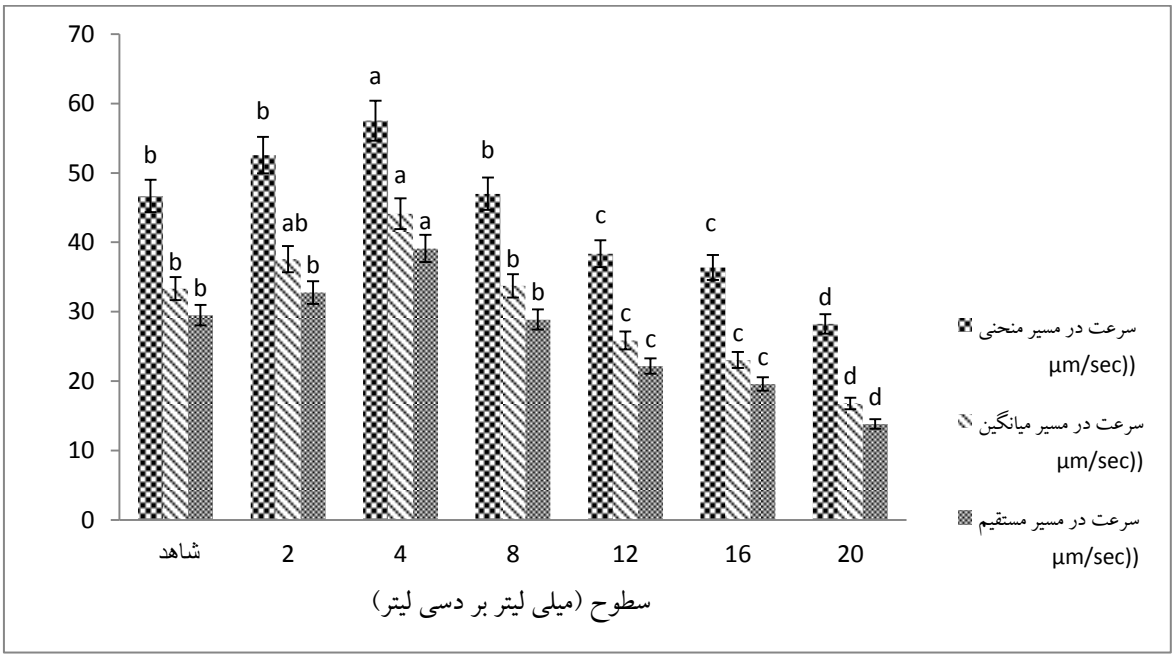
زنده مانی، یک‌پارچگی غشای اسپرم و پراکسیداسیون لیپید

جدول ۱ اثر افزودن غلظت‌های مختلف عصاره مرزه ماکرانتا بر فراسنجه‌های زنده‌مانی، سلامت غشای اسپرم و تولید MDA بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی را نشان می‌دهد. درصد زنده‌مانی در رقیق‌کننده حاوی ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره نسبت به گروه شاهد و بقیه گروه‌های تیماری بالاتر بود (P<۰/۰۵). با این وجود، سطوح ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره به‌طور معنی‌داری زنده‌مانی اسپرم‌ها را کاهش داد (P<۰/۰۵). درصد زنده‌مانی سایر گروه‌های تیماری تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند.

نتایج تست HOST نشان می‌دهند که تعداد اسپرم‌های با دم پیچ خورده و متورم در تیمارهای ۲ و ۴ میلی لیتر در دسی‌لیتر نسبت به گروه شاهد بیشتر بوده به طوری‌که این اختلاف در تیمار ۴ میلی-لیتر در دسی‌لیتر، معنی‌دار می‌باشد (P < ۰/۰۵). اختلاف تیمارهای ۲ و ۸ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر با گروه شاهد غیرمعنی‌دار بوده و افزودن ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره به رقیق‌کننده منی به طور معنی‌داری تاثیر منفی بر یکپارچگی غشای اسپرم داشت (P < ۰/۰۵).

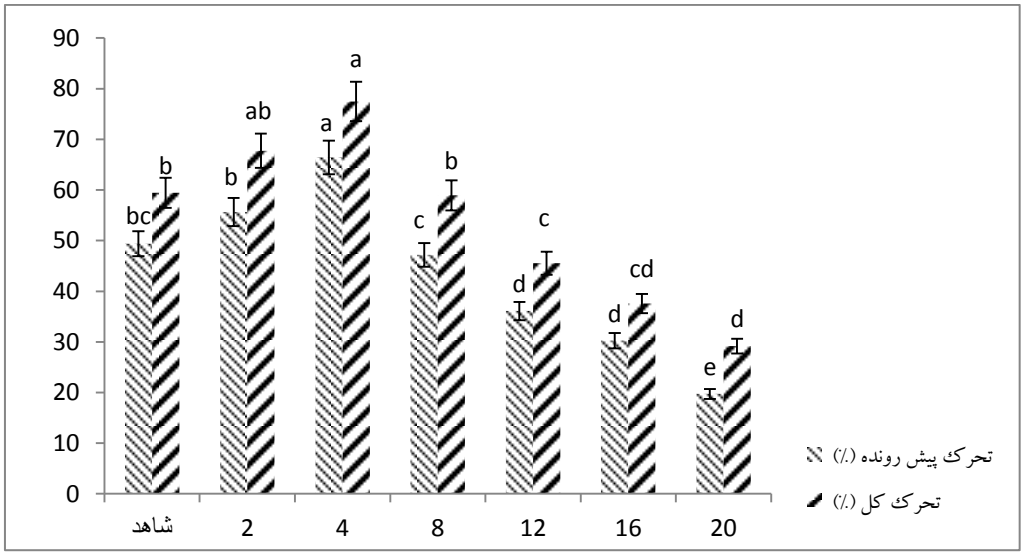
نتایج حاصل از سنجش میزان LPO نشان می‌دهد که اضافه کردن ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره مرزه ماکرانتا به محیط رقیق‌کننده موجب کاهش میزان MDA تولید شده گردید اما در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود. اضافه کردن غلظت‌های بیشتر عصاره مرزه ماکرانتا به محیط واکنش، نه تنها موجب کاهش روند پراکسیداسیون نگردید بلکه موجب افزایش غلظت MDA شد.

نمودار ۱- مقایسه فراسنجه‌های سرعت در مسیر منحنی، سرعت در مسیر مستقیم و سرعت در مسیر میانگین با استفاده از سطوح مختلف تیماری عصاره مرزه ماکرانتا



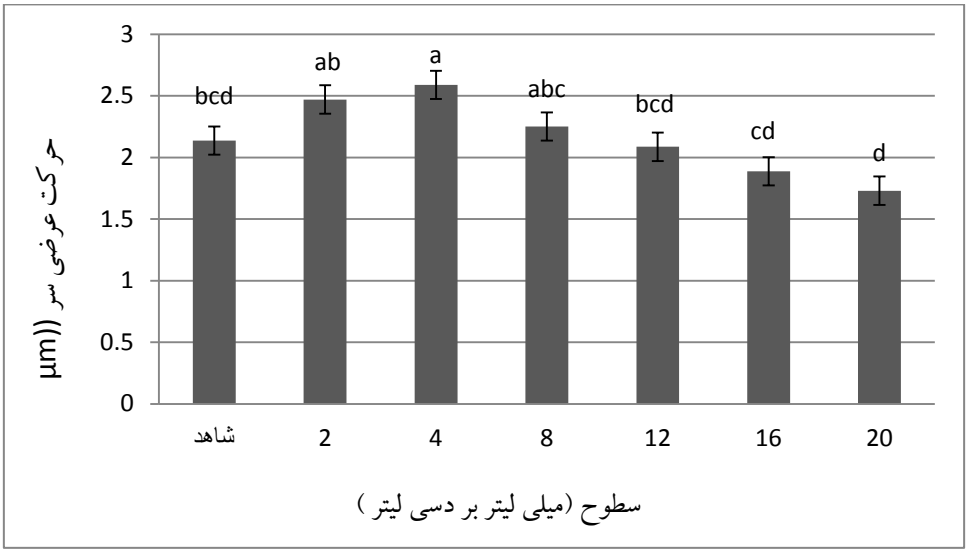
هر ستون نشان دهنده میانگین ± خطای معیار می باشد. اختلاف مشاهده شده در بین ستون‌ها با حروف مختلف از نظر آماری معنی‌دار است

نمودار ۲- مقایسه میانگین های فراسنجه های تحرک پیش رونده و تحرک کل با استفاده از سطوح مختلف تیماری عصاره مرزه ماکرانتا



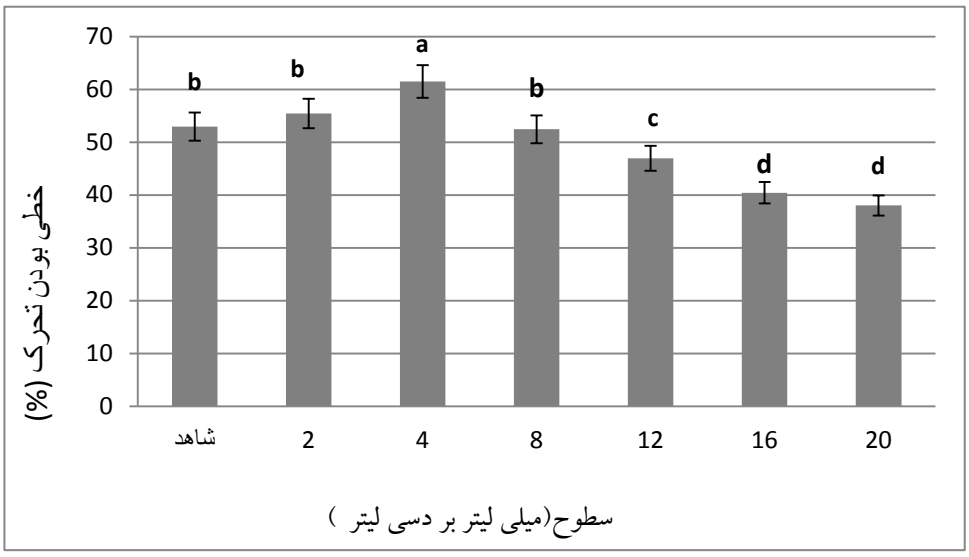
هر ستون نشان دهنده میانگین ± خطای معیار می باشد. اختلاف مشاهده شده در بین ستون‌ها با حروف مختلف از نظر آماری معنی‌دار است.

نمودار۳- مقایسه میانگین های فراسنجه حرکت عرضی سر با استفاده از سطوح مختلف تیماری عصاره مرزه ماکرانتا.



هر ستون نشان دهنده میانگین ± خطای معیار می باشد. اختلاف مشاهده شده در بین ستون‌ها با حروف مختلف از نظر آماری معنی‌دار است

نمودار٤- مقایسه میانگین های خطی بودن تحرک با استفاده از سطوح مختلف تیماری عصاره مرزه ماکرانتا



هر ستون نشان دهنده میانگین ± خطای معیار می باشد. اختلاف مشاهده شده در بین ستون‌ها با حروف مختلف از نظر آماری معنی‌دار است

جدول۱- تاثیر سطوح مختلف عصاره مرزه ماکرانتا بر فراسنجه های زنده‌مانی، یک‌پارچگی غشای پلاسمایی و تولید مالون دی آلدهید در اسپرم پس از فرآیند انجماد- یخ گشایی

صفات	گروه شاهد	۲ml	۴ml	۸ml	۱۲ml	۱۶ml	۲۰ml
زنده مانی (٪)	۶۶/۳۲^{b}±۷/۲۷	۷۴/۴۹^{ab}±۶/۵۵	۸۱/۳۴^{a}±۴/۱۰	۶۶/۶۶^{b}±۱۲/۲۳	۵۲/۳۲^{c}±۷/۲۰	۴۷/۶۴^{c}±۵/۷۵	۴۲/۶۶^{c}±۲/۷۸
یک‌پارچگی غشای پلاسمایی (٪)	۶۲/۱۷^{b}± ۶/۷۶	۷۰/۶۱^{ab}±۶/۹۸	۷۹/۰۹^{a}±۴/۱۷	۶۱/۰۵^{b} ±۱۳/۴۸	۴۶/۶۵^{c} ±۴/۳۵	۴۲/۳۳^{cd}±۵/۵۴	۳۶/۵۷^{d}±۴/۶۷
مالون‌دی‌آلدئید (nmol/dl)	۱۷/۶۲^{abc}±۳/۵۱	۱۵/۸۰^{bc}±۳/۴۳	۱۳/۰۷^{c}±۲/۴۰	۱۸/۲۷^{abc}±۲/۹۵	۱۹/۵۴^{ab}±۳/۲۹	۲۰/۰۷^{ab}±۵/۹۹	۲۱/۷۶^{a}±۳/۶۴

*حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دارهستند (P<۰/۰۵)

بحث

در سال‌های اخیر، آنتی‌اکسیدان‌های صناعی برای محافظت اسپرم-ها در برابر اثرات مضر انجماد و شوک سرمایی استفاده شده‌اند (Beconi و همکاران، ۱۹۹۳).

به دلیل سمیت آنتی‌اکسیدان‌های صناعی، دسترسی آسان به گیاهان دارویی، مقرون به صرفه‌بودن و صرف هزینه کمتر نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های صناعی، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است (Yanishlieva و Marinova، ۱۹۹۶). عصاره بسیاری از گیاهان حاوی ترکیبات بیواکتیو از جمله فنولیک‌ها و فلاونوئیدها هستند که خاصیت آنتی اکسیدانی موثری را نشان داده و از آسیب رادیکال‌های آزاد ممانعت می‌کنند (Sefidkon و Jamzad، ۲۰۰۵). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی ازجمله فلاونوئیدها، توجه زیادی را به خود جلب کرده و گزارش شده که آنتی‌اکسیدان‌های بسیارقوی نسبت به ویتامین E و C می‌باشد. مصرف فلاونوئیدها و توانائی قابل توجه آنها به عنوان آنتاگونیست استرس اکسیداتیو، موضوع بسیاری از تحقیقات شده است (Sadeghi Ghotbabadi و همکاران، ۲۰۱۲). مطالعات اخیر اثرات مثبت ناشی از استفاده عصاره رزماری را در رقیق‌کننده انجماد منی چندین گونه از جمله خوک (Malo و همکاران، ۲۰۱۱)، سگ (Gadea و همکاران، ۲۰۰۴)، گوسفند (González و همکاران، ۲۰۱۰) و بز (Zanganeh و همکاران، ۲۰۱۳) گزارش کرده‌اند. همچنین استفاده از عصاره آبی گیاه رودیولا ساکرا در رقیق‌کننده منی خوک مورد بررسی قرار گرفته است (Zhao و همکاران، ۲۰۰۹). در پژوهش حاضر، مرزه ماکرانتا به عنوان یک گیاه دارویی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، در محدوده غلظتی ۲ تا ۲۰ میلی‌لیتردر دسی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفت. هدف اصلی از این طرح، ارزیابی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره مرزه ماکرانتا بر خصوصیات عملکردی اسپرم گاو هلشتاین در طی فرآیند انجماد–یخ‌گشایی بود.

در این مطالعه، افزودن عصاره مرزه ماکرانتا در طی فرآیند انجماد، عملکرد سلول اسپرم گاو (تحرک، زنده مانی، یک-پارچگی غشا و حساسیت به پراکسیداسیون لیپید) را بهبود بخشید. نتایج ما نشان می‌دهند که استفاده از دوزهای پایین (۲ و ۴ میلی-لیتر در دسی‌لیتر) عصاره مرزه ماکرانتا در رقیق‌کننده انجماد منجر به افزایش فراسنجه‌های تحرک و استفاده از دوزهای بالا (۱۲، ۱۶، ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر)، موجب کاهش این صفات می شود. تغییر در ترکیب، فشار اسمزی و pH رقیق کننده می‌تواند از دلایل کاهش فراسنجه‌های تحرک در اثر استفاده از دوزهای بالای عصاره باشد. عصاره مرزه ماکرانتا، خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را بیشتر در تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر نشان داده است بطوریکه بیشترین درصد زنده‌مانی متعلق به این تیمار بود. در سطوح پایین (۲ و ۴ میلی‌لیتر در دسی لیتر)، غشای پلاسمایی سلول‌های اسپرم در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد توسط عصاره مرزه ماکرانتا به خوبی محافظت شده است.

این سطوح با حفظ عملکرد و یکپارچگی غشای پلاسمایی موجب ادامه حیات سلول اسپرم می‌شود. تولید ROS در طی انجماد منجر به پراکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم می‌شود (Chatterjee و

Gagnon، ۲۰۰۱). در این مطالعه، سطح پراکسیداسیون لیپید اسپرم‌های منجمد شده با سطوح ۲ و ۴ میلی‌لیتر در دسی لیتر عصاره کاهش یافت. اثر عصاره مرزه ماکرانتا احتمالا با تغییرات غلظت متغیر خواهد بود بطوریکه عصاره مرزه در غلظت‌های بالاتر از ۱۲ml موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید می‌شود. اگرچه این افزایش نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نیست ولی می‌تواند ناشی از تغییرات اسمزی، pH و بهم خوردن تعادل ترکیبات رقیق‌کننده باشد، زیرا به هم خوردن میزان گلیسرول و زرده تخم مرغ که از عوامل محافظت کننده انجمادی و نگهدارنده اسپرم‌ها از شوک سرمایی در طول فرآیند انجماد محسوب می‌شوند، بسیار مهم بوده و در نتیجه سلامت اسیدهای چرب غشای اسپرم، زنده مانی و عملکردهای اسپرم‌ها با خطر مواجه می‌شود (Fahy، ۱۹۸۶). مطالعات مشابهی در زمینه تاثیر عصاره مرزه ماکرانتا بر عملکرد اسپرم گاو وجود ندارد که بتوانیم با نتایج این آزمایش مقایسه کنیم ولی در مورد آنتی اکسیدان‌های گیاهی دیگر از جمله رزماری، مرزه مانتانا، مرزه خوزستانی و رودیولا ساکرا تحقیقاتی صورت گرفته است. نتایج تحقیقات Malo و همکاران (۲۰۱۱) نشان می‌دهند، استفاده از عصاره رزماری در رقیق‌کننده منی موجب بهبود جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و یک‌پارچگی آکروزوم شده و سطح MDA بطور قابل‌توجهی کاهش می‌یابد (Malo و همکاران، ۲۰۱۱). Zanganeh و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که عصاره آبی رزماری باعث بهبود جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی، یک‌پارچگی غشای پلاسمایی و کاهش میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در اسپرم بز می‌گردد (Zanganeh و همکاران، ۲۰۱۳). در مطالعه‌ای، اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی گیاه رودیولا ساکرا بر خصوصیات منی خوک بعد از انجماد بررسی و نشان داده شد که غلظت‌های ۴، ۶ و ۸ میلی‌گرم در لیتر عصاره گیاه فوق با اثر خنثی‌کنندگی قوی علیه رادیکال آنیون سوپراکسید و کاهش پراکسیداسیون لیپید موجب افزایش تحرک و یک‌پارچگی غشای پلاسمایی شده است (Zhao و همکاران، ۲۰۰۹). مرزه Montana یک گیاه دارویی است که بطور سنتی برای درمان اختلالات عملکرد جنسی نرها استفاده می‌شود. تحقیقات انجام گرفته توسط Zavattia و همکاران (۲۰۱۱) در زمینه اثر مرزه Montana بر رفتارهای جنسی موش‌های نر نشان داد که استفاده خوراکی از عصاره این مرزه منجر به افزایش قابل توجه انزال منی شده و سطح سرمی تستوسترون در موش‌های دریافت‌کننده عصاره، افزایش می‌یابد. این اطلاعات تاثیر مثبت مرزه Montana بر عملکردهای جنسی نر را تایید می‌کند (Zavattia و همکاران، ۲۰۱۱).

تحقیقات انجام‌گرفته توسط Rezvanfar و همکاران (۲۰۰۸) در زمینه تاثیر اسانس مرزه خوزستانی بر سیستم تولیدمثل موش‌ها حاکی از آن است که این اسانس، بواسطه قدرت آنتی اکسیدانی و فعالیت آندروژنیک، سیستم تولیدمثلی را از سمیت سیکلوفسفوآمید محافظت می‌کند (Rezvanfar و همکاران، ۲۰۰۸). بررسی Haeri و همکاران (۲۰۰۶) در زمینه تاثیر مرزه خوزستانی بر باروری موش‌های نر نشان می‌دهد که تزریق mg/kg ۱۵۰ و ۲۲۵ از اسانس این گیاه به موش‌های نر، باعث افزایش تعداد اسپرماتوگونیوم‌ها، سلول‌های لایدیگ و اسپرم‌ها شده و سلول‌های سرتولی در این موش‌ها هایپرتروفی شده بودند (Haeri و همکاران، ۲۰۰۶). با این حال به دلیل متفاوت بودن ترکیبات رقیق‌کننده، اسپرم گونه‌های حیوانی، نوع و گونه گیاه، روش عصاره‌گیری، سطوح استفاده شده از عصاره و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان، محل رشد گیاه و نوع محلول استفاده شده برای عصاره‌گیری، نمی‌توانیم نتایج را با مطالعات پیشین مقایسه کنیم.

مکانیسمی که از طریق آن عصاره مرزه ماکرانتا درطی فرآیند انجماد–یخ‌گشایی اسپرم را محافظت می‌کند به طور واضح درک نشده است. توانایی فلاونوئیدهای موجود در مرزه در احیا هیدروژن (Malo و همکاران، ۲۰۱۰) و پایداری غشاءها از طریق کاهش سیالیت غشا (Gil و همکاران، ۲۰۱۰) می‌تواند دلیلی بر تاثیرگذاری این گونه گیاهی در طی فرآیند انجماد–یخ‌گشایی باشد. افزایش در سیالیت غشای پلاسمایی، نفوذپذیری و بی‌ثباتی غشا موجب کاهش عمر اسپرم می‌شود (Watson، ۱۹۹۵). همچنین مطالعات نشان می‌دهند که گروه کربونیل در کربن شماره ۴ و باندهای دوگانه بین کربن‌های ۳ و ۲ ویژگی مهم برای فعالیت

آنتی‌اکسیدانی بالا در فلاونوئیدها است (Gil و همکاران، ۲۰۱۰). بررسی‌های فیتوشیمیایی گیاه مرزه وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال از جمله تیمول، پاراسایمن، گاماترپنین، کارواکرول، فلاونوئیدها و رزمارینیک اسید را نشان می‌دهد (Zavattia و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی به ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدها محدود نشده است بلکه وجود دیگر متابولیت‌های ثانویه آنتی‌اکسیدانی از جمله روغن‌های فرار، کاروتنوئیدها و ویتامین‌ها می‌تواند دلیل فعالیت آنتی-اکسیدانی این گیاه باشد. بطوریکه در مرزه ترکیبات فنولیک ۵۵٪ و متابولیت‌های ثانویه آنتی‌اکسیدانی ۴۵٪ از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را به خود اختصاص داده‌اند (Alizadeh و همکاران، ۲۰۱۰).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان پیشنهاد کرد که بهبود فراسنجه‌های تحرک، زنده‌مانی و یک‌پارچگی غشای پلاسمایی در حضور دوزهای پایین عصاره مرزه، می‌تواند ناشی از اثر آنتی-اکسیدانی قوی عصاره و ترکیبات فنولیک آن از جمله کارواکرول و تیمول و نیز کاروتنوئیدها و ویتامین‌ها باشد و عصاره مرزه ماکرانتا می‌تواند بعنوان منبع قابل دسترس از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های صناعی استفاده شود. از طرف دیگر ارزیابی اسپرم از طریق فراسنجه‌های دینامیکی و مورفولوژیکی همراه با حساسیت به پراکسیداسیون لیپید ممکن است اطلاعات کاملی را درباره توانایی باروری اسپرم ارائه ندهد. بنابر این، نیاز است بررسی‌های بیشتر در زمینه ترکیبات فعال موجود در عصاره مرزه صورت گرفته و آزمایشاتی جهت ارزیابی قدرت باروری اسپرم‌های تیمار شده با این عصاره انجام شود.

منابع

Alizadeh, A., Khoshkhui, M., Javidnia, K., Firuzi, O., Tafazoli, E. and Khalighi, A. (2010) Effects of fertilizer on yield, essential oil composition, total phenolic content and antioxidant activity in Satureja hortensis L. (Lamiaceae) cultivated in Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(1): 33-40.

Bansal, A.K., and Bilaspuri, G.S. (2011) Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary medicine international*, 1-7.

Beconi, M.T., Francia, C.R., Mora, N.G., and Affranchino, M.A. (1993) Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, 40(4): 841-851.

Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Gagnon, C., and Sirard MA. (2001) Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology, 56(2):* 275–86.

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(3): 282-8.

Buckett, W.M., Luchas, M.J., Aird, I.A., Farquharson, R.G., Kingland, C.R., and Lewis-Jones, D.I. (1997) The hypo-osmotic swelling test in recurrent miscarriage. *Fertility and sterility*. 68(3): 506-509.

Bucak, M.N., Sarıözkan, S., Tuncer, P.B., Ateşşahin, A., Kulaksız, R., and Çevik, M. (2010) The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircus ancryrensis) spermparameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, 89(1): 24-30.

Chatterjee, S., and Gagnon, C. (2001) Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezingand thawing. *Molecular reproduction and development*, 59(4): 451–8.

De Graaf, S.P., Evans, G., Gillan, L., Guerra, M.M., Maxwell, W.M., and O'Brien, J.K. (2007) The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, 67(2): 217–227.

Fahy, G.M., (1986) The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, 23(1): 1–13.

Gadea, J., Selles, E., Marco, M.A., Coy, P., Matás, C., Romar, R., and Ruiz, S. (2004) Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, 62(3-4): 690–701.

Gil, L., Mascaró, F., Mur, P., Gale, I., Silva, A., González, N., Malo, C., and Cano, R. (2010) Freezing ram semen: The effect of combination of soya and rosemary essences as a freezing extender on post-thaw sperm motility. *Reproduction in domestic animals*, 45: 91.

González, N., Gil, L., Martinez, F., Malo, C., Cano, R., Mur, P., and Espinosa, E. (2010) Effect of natural antioxidant rosemary in canine soya freezing extender. *Reproduction in domestic animals*, 45: 88.

Haeri, S., Minaie, B., Amin, Gh., Nikfar, Sh., Khorasani, R., Esmaily, H., Salehnia, A., and Abdollahi, M. (2006) Effect of Satureja khuzestanica essential oil on male rat fertility. *Fitoterapia*, 77(7-8): 495–499.

Malo, C., Gil, L., Cano, R., Martínez, F., and Galé, I. (2011) Antioxidant effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, 75(9): 1735–1741.

Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Martínez, F., Cano, R., de Blas, I., and Espinosa, E. (2010) Antioxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (Rosmarinus officinalis). *Cryobiology*, 61(1): 142-147.

Peris, S.I., Bilodeau, J.F., Dufour, M., and Bailey, J.L. (2007) Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram semen. *Molecular reproduction and development*, 74(7): 878-892.

Özcan, M.M., and Al Juhaimi, F.Y. (2011) Antioxidant and antifungal activity of some aromatic plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 1361-1366.

Rezvanfar, M., Sadrkhanlou, R., Ahmadi, A., Shojaei-Sadee, H., Rezvanfar, M., Mohammadirad, A., Salehnia, A., and Abdollahi, M. (2008) Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Human and Experimental Toxicology*, 27: 901-910.

Sadeghi Ghotbabadi, F., Alizadeh, A., Zadehbagheri, M., Kamelmanesh, M.M., and Shaabani, M. (2012) Phytochemical composition of the essential oil, total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity in Iranian Satureja sahendica Bornm. at different ontogenesis conditions. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(19): 3525-3534.

Sefidkon, F., and Jamzad, Z. (2005) Chemical composition of the essential oil of three Iranian Satureja species (S. mutica, S. macrantha and S. intermedia). *Food Chemistry*, 91(1): 1-4.

Tavassoli, S., and Djomeh, Z.E. (2011) Total Phenols, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Methanol Extract of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) *Global Veterinaria*, 7(4): 337-341.

Watson, P.F. (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, *7*(4): 871–891.

Watson, P.F. (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 61: 481–492.

Yanishlieva, N.V., and Marinova, E.M. (1996) Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. *Z Lebensm Unters Forsch*, *203*: 220-223.

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

Zavattia, M., Zanolib, P., Benellia, A., Rivasic, M., Baraldid, C., and Baraldic, M. (2011) Experimental study on Satureja montana as a treatment for premature ejaculation. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 629–633.

Zhao, H.W., Li, Q.w., Ning, G.z., Han, Z.S., Jiang, Z.L., and Duan, Y.F. (2009) Rhodiola sacra aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 71(5): 849-857.