**دانشکده کشاورزی**

**پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد در رشته علوم دامی- فیزیولوژی دام**

# اثر عصاره خشک گیاه مریم گلی بر برخی فرآسنجه‌های منی خروس‌های بومی فارس

به وسیله : **محمد مهدی امتی**

اساتید راهنما:

**دکتر محمد جواد ضمیری**

**دکتر امیر اخلاقی**

بهمن ۱۳۹۰

بسم الله الرحمن الرحيم

به نام خدا

# اظـــهـــارنـــامـــه

**اینجانب محمد مهدی امتی (۸۸۱۱۵۶) دانشجوی رشته‌ی علوم دامی گرایش فیزیولوژی دام دانشکده کشاورزی اظهار می‌کنم که این پایان‌نامه حاصل پژوهش خودم بوده است و در جاهایی که از منابع دیگران استفاده کرده‌ام، نشانی دقیق و مشخصات آن را نوشته‌ام. همچنین اظهار می‌کنم که تحقیق و موضوع پایان نامه‌ام تکراری نیست و تعهد می‌نمایم که بدون مجوز دانشگاه دستاوردهای آن را منتشر ننموده و یا در اختیار غیر قرار ندهم. کلیه حقوق این اثر مطابق آیین نامه مالکیت فکری و معنوی متعلق به دانشگاه شیراز است.**

**نام و نام خانوادگی: محمد مهدی امتی**

**تاریخ و امضاء: ۱۳۹۰/۱۱/۰۸**

به نام خدا

# اثر عصاره خشک گیاه مریم گلی بر برخی فرآسنجه‌های منی خروس‌های بومی فارس

به کوشش:

محمد مهدی امتی

پایان‌نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم برای اخذ درجه‌ی کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

علوم دامی (فیزیولوژی دام)

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

**ارزیابی شده توسط کمیته‌ی پایان‌نامه با درجه‌ی: عالی**

دکتر محمد جواد ضمیری ، استاد بخش علوم دامی، دانشگاه شیراز (استاد راهنما).....

دکتر امیر اخلاقی، استادیار بخش علوم دامی، دانشگاه شیراز (استاد راهنما).....

دکتر هادی آتشی، استادیار بخش علوم دامی، دانشگاه شیراز (استاد مشاور).....

دکتر محمدرضا جعفرزاده، استادیار بخش علوم دامی، دانشگاه شیراز (استاد مشاور).....

دکتر محمدرضا رضوانی، استادیار بخش علوم دامی، دانشگاه شیراز (استاد مشاور).....

زمستان ۱۳۹۰

**تقدیم به:**

**خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پر بار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم ودانش تلاش نمایم . والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم چرا که این دو وجود، پس از پروردگار مایه هستی‌ام بوده‌اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. نه میتوانم موهایشان را که در راه عزت من سفید شد، سیاه کنم و نه برای دستهای پینه بسته‌شان که ثمره تلاش برای افتخار من است، مرهمی دارم . پس توفیقم ده که هر لحظه شکر گزارشان باشم و ثانیه‌های عمرم را در عصای دست بودنشان بگذرانم.**

**آموزگارانی که برایم زندگی؛ بودن و انسان بودن را معنا کردن، حال این برگ سبزی است تحفه درویش تقدیم آنان....**

**تقدیم به** خواهر دوقلویم (**شیما**)، که وجودش شادی بخش و صفایش مایه آرامش من است و تقدیم به برادرانم (**علی و احسان**) که همواره در طول تحصیل متحمل زحماتم بودند و تکیه‌گاه من در مواجهه با مشکلات، و وجودشان مایه دلگرمی من است.

**کیستم من ذره‌ای اندرزمین برآسمان  پر زنان همبال پرواز زمان**

**من ز دل شادی بگیرم نی ز نی  از درون مستی بگیرم نی ز می**

**دل سپارم من به گل یا هر نگاه آتشین  عاشقم بر خاک گوهر پرور ایران زمین**

## سپاسگزاری

صدها فرشته بوسه بر آن دست می زند

کز کـــــــــــار خلق یک گره بسته وا کند

سپاس ایزد منان که به من این فرصت را داد تا به این مرحله از علم رسیده و از هیچ محبتی دریغ نکرد و در تمام مراحل زندگیم مرا قوت قلب بود.

انجام این تحقیق مرهون راهنمایی‌های بی‌دریغ فرزانه استادی است که گفتار و کلامش همواره سودمند و راهگشای به پایان رسیدن این رساله بود. بدین وسیله از اساتید راهنمای بزرگوار خود جناب آقای **پروفسور محمد جواد ضمیری** و همچنین جناب آقای **دکتر امیر اخلاقی،** کمال تقدیر و تشکر را داشته، همچنین از اساتید مشاور گرانقدر جناب آقای **دکتر هادی آتشی،** جناب آقای **دکتر محمد رضا جعفرزاده** و جناب آقای **دکتر محمد رضا رضوانی** مراتب امتنان و قدردانی خویش را ابراز می‌دارم. بجاست که از زحمات همکارهای عزیزم سرکار خانم مهندس فاطمه صائمی و سرکار خانم الناز فدایی صمیمانه تشکر و قدردانی کنم.

بسیار شایسته است که از وقت و صبوری سرکار **خانم لطف الهی** به خاطر ایجاد جوی صمیمی و دوستانه و همکاری‌های بی شائبه ایشان، تکنسین محترم بخش علوم دامی، مهندس رضازاده، همچنین جناب آقای قباد فرجزاده، سرکار خانم مهندس سهامی، آقای مهندس شهیدیان و آقای جهان‌پناه که با مهربانی در پایان این مجموعه همکاری داشتند بسیار سپاسگزارم.

در پایان از همراهی همیشگی پدر و مادر عزیزم بی‌نهایت سپاسگزارم.

**محمد مهدی امتی**

**بهمن ۱۳۹۰**

# چکیده

# اثر عصاره خشک گیاه مریم گلی بر برخی فرآسنجه‌های منی خروس‌های بومی فارس

**به کوشش:**

**محمد مهدی امتی**

هدف این پژوهش، بررسی اثر عصاره مریم گلی، بر برخی فرآسنجه‌های منی (حجم منی، غلظت اسپرم، شمار کل اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده، جنبایی، شمار کل اسپرم‌های زنده، درصد اسپرم-های نابهنجار و شمار کل اسپرم‌های نابهنجار، بهبود سلامت غشای اسپرم (HOST) و مالون دای آلدهاید (MDA)) و غلظت تستوسترون پلاسما بود. شصت خروس بومی فارس پنج ماهه، به پنج تیمار (هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار چهار پرنده) گروه‌بندی شدند. خروس‌ها، برای دو هفته به اسپرم گیری با روش مالش شکمی عادت‌دهی شدند. هر روز به گروه شاهد ($T_1$) آب، و به گروه های، $T_2$، $T_3$، $T_4$ و $T_5$ به ترتیب، ۱۱۰، ۲۱۰، ۳۲۰ یا ۴۲۰ میلی‌گرم عصاره خشک مریم گلی به ازای هر کیلوگرم وزن زنده از راه دهان خورانده شد. عصاره مریم گلی از هفته بیستم تا هفته سی و دوم به خروس‌ها خورانده شد و منی در فاصله‌های یک هفته‌ای از هفته بیست و دوم به مدت ۱۰ هفته جمع‌آوری شد. پس از دو هفته سازش‌پذیری به جیره، برای ۸ هفته اسپرم‌گیری ادامه یافت. غلظت، جنبایی، HOST و شمار کل اسپرم زنده در گروه $T_4$ دیده شد.

**واژگان کلیدی**: عصاره خشک مریم گلی، فرآسنجه‌های منی، تستوسترون، خروس‌های بومی فارس

عنوان | صفحه


فصل اول ۲

۱-۲- اثر گیاهان دارویی بر فرآسنجه‌های منی و ویژگی آنتی‌اکسیدانی آنها ۳

مروری بر پژوهش‌های انجام شده ۱۳

۲-۱- آناتومی دستگاه تولید مثلی ماده ۱۳

۲-۱-۱- انباشت اسپرم در دستگاه تولید مثل ماده ۱۳

۲-۲- آناتومی دستگاه تولید مثل خروس ۱۵

۲-۲-۱-انتقال و انباشت اسپرم ۲۱

۲-۲-۲- رشد و توسعه بیضه‌ها، اسپرماتوژنز و تولید مایع منی ۲۱

۲-۲-۳- ریخت شناسی اسپرماتوزویید ۲۳

۲-۲-۴- ترکیب شیمیایی و خصوصیات فیزیکی اسپرماتوزویید و مایع منی ۲۷

۲-۲-۵- ویژگی‌های منی ۳۰

۲-۲-۵-۱- حجم منی و غلظت اسپرم ۳۰

۲-۲-۵-۲- حجم منی و اندازه بیضه‌ها ۳۱

۲-۲-۵-۳- کیفیت منی ۳۲

۲-۲-۵-۴- بسامد انزال‌گیری ۳۴

۲-۲-۶- جفتگیری طبیعی و رفتار جنسی ۳۴

۲-۲-۷- سازه‌های موثر بر باروری جنس نر ۳۵

۲-۲-۸- انزال‌گیری ۳۵

۲-۲-۹- مریم گلی ۳۷

فصل دوم ۳۹

۳-۱- محل و زمان اجرای پژوهش ۴۰

۳-۲- روش انجام آزمایش ۴۰

۳-۳- آماده کردن سالن ۴۳

۳-۴- مواد و وسایل لازم ۴۳

۳-۴-۱- آزمایش‌های میکروسکوپی ۴۳

۳-۴-۲- اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدها ۴۴

۳-۴-۳- خون‌گیری ۴۴
۳-۴-۴- دیگر لوازم آزمایشگاهی مورد نیاز ۴۵
**۳-۵- تهیه عصاره خشک مریم گلی ۴۵**
**۳-۶- فرآسنجه‌های اندازه‌گیری شده ۴۷**
۳-۶-۱- حجم منی ۴۷
۳-۶-۲- جنبایی اسپرم ۴۷
۳-۶-۳- تعیین غلظت اسپرم ۴۸
۳-۶-۴- تعیین درصد اسپرم‌های زنده و مرده ۴۹
۳-۶-۵- تعیین شمار کل اسپرم‌های زنده ۵۰
۳-۶-۴-۱- تعیین درصد اسپرم‌های نابهنجار ۵۰
۳-۶-۵- تعیین شمار کل اسپرم‌های نابهنجار ۵۱
۳-۶-۵-۱- تهیه رنگ ائوزین- نیگروزین ۵۱
۳-۶-۶- Hypo- Osmotic Swelling Test ۵۱
۳-۶-۷- اندازه‌گیری غلظت MDA ۵۳
۳-۶-۷-۱- تهیه محلول‌ها ۵۳
۳-۶-۷-۲- رسم منحنی استاندارد ۵۴
۳-۶-۷-۳- اندازه‌گیری MDA نمونه‌های منی ۵۶
۳-۶-۸- اندازه‌گیری غلظت تستوسترون پلاسما ۵۷
۳-۶-۹- آنالیز آماری ۵۸
***فصل سوم* ۵۹**
**۴-۱- چکیده آنالیز واریانس ۶۰**
**۴-۲- اثر تیمار ۶۰**
۴-۲-۱-جنبایی اسپرم ۶۳
۴-۲-۲- غلظت اسپرم ۶۴
۴-۲-۳- درصد اسپرم‌های زنده ۶۵
۴-۲-۴- شمار کل اسپرم‌های زنده در منی ۶۵
۴-۲-۵- درصد اسپرم‌های نابهنجار ۶۶
۴-۲-۶- Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) ۶۷
۴-۲-۷- غلظت تستوسترون در خون ۶۸
**۴-۳- برهمکنش تیمار و زمان ۶۹**

۴-۳-۱- غلظت اسپرم _____ ۶۹
۴-۳-۲- درصد اسپرم‌های نابهنجار _____ ۷۲
۴-۳-۳- شمار کل اسپرم‌های نابهنجار در منی _____ ۷۴
**فصل چهارم** _____ ۷۶
**پیشنهادها** _____ ۸۵
**منابع** _____ ۸۶

**عنوان** **صفحه**


**جدول ۳-۱- ترکیب جیره مصرفی خروس‌های بومی فارس _____ ٤٢**

**جدول ۳-۲- جدول آنالیز Salvia officinalis (مریم گلی، Sage) _____ ٤٦**

**جدول ۳-۳- مقیاس ارزیابی میزان جنبایی اسپرم _____ ٤٨**

**جدول ٤-۱- چکیده آنالیز آماری اثر تیمار، زمان و بر هم کنش آنها بر فرآسنجه‌های منی و غلظت تستوسترون _____ ٦١**

**جدول ٤-۲- اثر سطوح مختلف عصاره خشک مریم گلی بر فرآسنجه‌های منی و غلظت تستوسترون _____ ٦٢**

**جدول ٤-۳- اثر برهمکنش تیمار و زمان بر میانگین غلظت اسپرم در منی _____ ٧١**

**جدول ٤-٤- اثر برهمکنش تیمار و زمان بر میانگین درصد اسپرم‌های نابهنجار ___ ٧٣**

**جدول ٤-٥- اثر برهمکنش تیمار و زمان بر شمار کل اسپرم‌های نابهنجار _____ ٧٥**

عنوان | صفحه


نگاره ۲ ـ ۱ : نمایی از یک لوله انباشت اسپرم _____ ۱۵

نگاره ۲ ـ ۲ : دستگاه اداری تناسلی خروس _____ ۱۶

نگاره ۲ ـ ۳ : ساختمان درونی بیضه‌های خروس _____ ۱۸

نگاره ۲ ـ ٤ : شیار انزالی خروس _____ ۱۹

نگاره ۲ ـ ٥ : شمای جانبی کلوآک و قسمت انتهایی کانال دفرانت در مرغ اهلی _____ ۲۰

نگاره ۲ ـ ٦ : اسپرماتوزوآ ماکیان _____ ۲٤

نگاره ۳ ـ ۱ ـ تعیین درصد اسپرم‌های زنده و مرده _____ ٥۰

نگاره ۳ ـ ۲ ـ HOST _____ ٥۲

نگاره ۳ ـ ۳ ـ معادله رگرسیونی منحنی استاندارد MDA _____ ٥٥

نگاره ٤ ـ ۱ ـ تاثیر عصاره خشک مریم گلی بر جنبایی اسپرم _____ ٦۳

نگاره ٤ ـ ۲ ـ تاثیر عصاره خشک مریم گلی بر غلظت اسپرم _____ ٦٤

نگاره ٤ ـ ۳ ـ تاثیر عصاره خشک مریم گلی بر درصد اسپرم‌های زنده _____ ٦٥

نگاره ٤ ـ ٤ ـ تاثیر عصاره خشک مریم گلی بر شمار کل اسپرم‌های زنده _____ ٦٦

نگاره ٤ ـ ٥ ـ تاثیر عصاره خشک مریم گلی بر درصد اسپرم‌های نابهنجار _____ ٦۷

نگاره ٤ ـ ٦ ـ تاثیر عصاره خشک مریم گلی بر HOST _____ ٦۸

نگاره ٤ ـ ۷ ـ تاثیر عصاره خشک مریم گلی بر غلظت تستوسترون _____ ٦۹

نگاره ٤ ـ ۸ ـ اثر بر همکنش تیمار و زمان بر میانگین غلظت اسپرم _____ ۷۰

نگاره ٤ ـ ۹ ـ اثر بر همکنش تیمار و زمان بر میانگین درصد اسپرم‌های نابهنجار _ ۷۲

نگاره ٤ ـ ۱۰ ـ اثر بر همکنش تیمار و زمان بر میانگین شمار کل اسپرم‌های نابهنجار ۷٤

# مقدمه

با افزایش جمعیت، تامین احتیاجات غذایی از اصلی‌ترین برنامه‌های هر کشور است. محدودیت-های آب و هوایی و بی‌توجهی به پژوهش‌های بنیادی و استفاده نادرست از امکانات سبب کاهش تولید و کاهش سرعت پیشرفت در یک کشور می‌شود. با توجه به توان بالای صنعت پرورش طیور در تامین پروتین با کیفیت بالا برای مصرف انسان، تلاش و پژوهش در این صنعت برای افزایش تولید، نقش مهمی در کاهش وابستگی اقتصادی کشور دارد.

مرغ‌های بومی سرمایه‌های ملی ارزشمندی هستند که حفظ و حراست از آنها به دلایل زیر ضروری است:

**جنبه اقتصادی و علمی،** حفظ ژنوتیپ‌های مرغ‌های بومی به مفهوم فراهم نمودن ایده‌های متنوعی برای تحقیقات فیزیولوژیکی، ژنتیکی و تغذیه‌ای در آینده هستند. **جنبه فرهنگی و تاریخی،** تمامی نژادهای مرغ حاصل تلاش پیشینیان ما در عرصه حیات بوده است و بایستی برای نسل‌های آینده به عنوان بخشی از فرهنگ ملی و باستانی حفظ شوند. این موجودات جلوه‌هایی از تزیین طبیعت و وسیله‌ای برای مطالعات نژادشناسی هستند و در برخی کشورها دارای اهمیت اقتصادی از نظر جلب توریست می‌باشند. **جنبه اکولوژی،** نژادهای طیور بومی، بایستی به عنوان سرمایه‌های ارزشمند به ارث رسیده از بحران عظیم اکولوژیکی و جان رهانیده از فراز و نشیب‌های سخت مبارزه با طبیعت تلقی شوند.

برای افزایش توان تولیدی و بهبود گله‌ها و نژادهای بومی، با روش‌های اصلاح‌نژادی و افزایش توان باروری و تولید مثلی آنها از راه آشنایی با روش‌های نوین و علمی جمع‌آوری، نگهداری و انتقال و ارزیابی اسپرم، می‌توان شاهد گامی روشن در بهبود و پیشرفت این صنعت آریایی در کشور بود.

### ۱-۲- اثر گیاهان دارویی بر فرآسنجه‌های منی و ویژگی آنتی‌اکسیدانی آنها

بسیاری از فرآورده‌های خام گیاهان دارویی به علت داشتن روغن فرار، غیرمستقیم در پزشکی مصرف می‌شوند، ولی در بیشتر موارد روغن‌های فرار را از مواد خام جدا می‌کنند و به عنوان دارو به کار می‌برند. فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاهان از دیر باز شناخته شده و بررسی‌های فراوانی با گونه‌های مختلف گیاهی و تاثیر اسانس یا عصاره آنها بر موجودات زنده انجام شده است (ابروش و همکاران،۱۳۸۳).

پیشرفت‌های فیزیولوژی تولید مثل، به ایجاد روش‌های نوین تولیدمثلی انجامیده است که به کمک آنها می‌توان فرآیندهای تولید مثل را بهبود بخشید. یافته‌های فراوانی درباره فرآیندهای تولید مثلی بهنجار در دسترس است که به یاری آنها می‌توان برخی فرآیندها را برای بهبود مدیریت و تولید مثل گله دستکاری کرد (ضمیری، ۱۳۸۵). حرکت پیش رونده اسپرم مهمترین معیار کیفیت منی است، زیرا باروری با جنبایی اسپرم همبستگی مثبت دارد. همبستگی بین باروری و غلظت اسپرم بسیاراندک است، اما نباید نمونه‌هایی را که غلظت اسپرم آنها کمتر از۵۰ درصد غلظت نرمال است، به کاربرد (ضمیری، ۱۳۸۵). اسپرم نیز همانند عضله، برای جنبایی نیاز به انرژی دارد، که این انرژی را مستقیما از ATP تامین می‌کند. میتوکندری مسئول تامین ATP، برای فعالیت اسپرم است؛ ولی یخ زدن و یخ‌گشایی سبب آسیب به آن و کاهش ATP مورد نیاز سلول می‌شود (De Lamirande and Gagnon, 1992). در قوچ نشان داده شده است که پروتین‌های موجود در مایع منی سبب خروج کلسترول از غشای اسپرم شده و بدین ترتیب استحکام غشای پلاسمایی اسپرم را کاهش می‌دهند، از سویی حضور مایع منی برای انجام واکنش آکروزومی و ظرفیت پذیری اسپرم ضروری به نظر می‌رسد (Heise *et al*., 2010).

لیپیدها یکی از اجزای اساسی منی هستند که دارای کنش‌های فراوان و تخصصی هستند، لیپیدها هم در پلاسمای منی و هم در اسپرماتوزوییدها وجود دارند. لیپیدهای منی نه‌تنها در سوخت و ساز اسپرم، بلکه در تمامی فرآیندهای مهم مرتبط با باروری دخالت دارند (Resseguie and Hughes, 1984; Scott, 1973). آنها ترکیب‌های اساسی غشای اسپرم هستند و در سوخت و ساز اسپرم، توانایی ظرفیت‌پذیری، جنبایی، قابلیت زنده‌مانی، حساسیت

اسپرم به سرما و سیالیت غشای اسپرم نقش دارند (Kelso *et al*., 1997b). یک ویژگی برجسته غشای اسپرماتوزوآی همه گونه‌های جانوران حضور غلظت‌های فوق‌العاده بالای فسفولیپیدهای دارای اسیدهای چرب دارای چند پیوند دوگانه[1] (PUFAs) است (Neill and Masters, 1972; Lin *et al*., 1993)؛ و به دلیل آن که بیضه مقدار فراوانی اسیدهای چرب دارای چندپیوند دوگانه دارد و از توان آنتی‌اکسیدانی کمی برخوردار است، بنابراین بیشتر در معرض آسیب‌های ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی قرار می‌گیرد (Jones *et al*., 1979).

غشای پلاسمایی اسپرم پستانداران، ماهی‌ها و پرندگان سرشار از اسیدهای چرب غیر اشباع و فسفولیپیدها است (Scott, 1973). اصلی‌ترین اسید چرب با چند پیوند دوگانه در اسپرم پستانداران، دوکوزا هگزاانوییک اسید[2] ($C_{22}$: 6 n-3) است (Neill and Master, 1972; Nissen and Kreyesel, 1983; Lin *et al*., 1993). برخلاف پستانداران، پرندگان غلظت خیلی پایینی از دوکوزاهگزاانوییک اسید و اسیدهای چرب n-3 را دارند و آراکیدونیک اسید ($C_{20}$: 4 n-6) و دوکوزا تتراانوییک اسید ($C_{22}$: 4 n-6) اسیدهای چرب اصلی در اسپرم آنها هستند. به دیگر سخن، پرندگان اسیدهای چرب سری n-6 و در پستانداران سری n-3 غالب هستند (Darin-Bennett *et al*., 1974; Howarth *et al*., 1977; Ravie and Lake, 1985).

پرزپی و همکاران (Perez-Pe *et al*., 2001) نشان دادند که وجود مقادیر کافی اسید لینولییک در جیره قوچ‌ها، مانع از پدیده شوک سرمایی شد و قابلیت زنده‌مانی اسپرم را نیز افزایش داد. بهبود سیالیت غشا، باعث پاسخ‌دهی بهتر اسپرم به گونادوتروپین‌ها می‌شود. یافته-های فراوانی نشان می‌دهند که ترکیب لیپیدهای غشای اسپرم، سازه تعیین کننده‌ای برای جنبایی، حساسیت به سرما و قابلیت زنده مانی است (Bearer and Friend, 1982; Hammerstedt, 1993; Roldan and Harrison, 1993). غلظت بالای اسیدهای چرب غیر-اشباع با چند پیوند دو گانه موجب می‌شود اسپرم به پراکسیداسیون لیپیدی بسیار حساس شود که با ناباروری جنس نر همبستگی مثبت دارد (Fujihara and Howarth, 1978). غلظت بالای این اسیدهای چرب در لیپیدها که سبب ناکارآمدی اسپرم می‌شود، حضور یک سیستم آنتی-

[1] Polyunsaturated Fatty Acid
[2] Docosahexaenoic Acid

اکسیدانی موثر را برای حفاظت در برابر آسیب پراکسیداسیونی لیپید ضروری می‌سازد ( Selley *et al*., 1991; Cecil and Bakst, 1993; Aitken, 1994 ). ترکیب بهینه اسیدهای چرب فسفولیپیدها و حفاظت آنتی‌اکسیدانی، ممکن است سازه مهمی در باروری نرها باشد ( Kelso *et al*., 1997b). روی هم رفته، بین نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اسیدهای چرب اشباع با آسیب پذیری غشای اسپرم، همبستگی وجود دارد. برای نمونه، بالاتر بودن این نسبت در اسپرم گاو و قوچ می‌تواند علت آسیب پذیرتر بودن آنها در مقایسه با اسپرم خرگوش، سگ و انسان باشد که نسبت کمتری از اسیدهای چرب غیراشباع دارند (Baily *et al*., 2000). وجود شرایط هوازی برای زنده‌مانی اسپرم بوقلمون در شرایط برون‌تنی، ضروری است. در اسپرم پستانداران، اکسیژن اضافی هنگام نگهداری برون تنی، سبب پراکسیداسیون لیپید می‌شود؛ که نتیجه آن آسیب‌های غشایی، کاهش جنبایی، تخریب ساختار DNA اسپرم و مرگ سلولی و سرانجام، ناباروری است ( Donoghue and Donoghue.,1997; Ravie and Lake, 1985; Wishart, 1984).

از پی‌آمدهای پراکسیداسیون لیپیدها، کاهش اسیدهای چرب غیراشباع است. رادیکال‌های آزاد[1] باعث افزایش پراکسیداسیون لیپید و تولید مالون‌دای‌آلدهاید[2] و ۴- هایدروکسی نوننول[3] می‌شوند و از آنجا که غلظت‌های بالای اسیدهای چرب غیراشباع برای حفظ سیالیت غشا و جنبایی اسپرم ضروری است، کاهش جنبایی اسپرم را می‌توان در این شرایط توجیه کرد (Baumber *et al*., 2000).

مشاهدات فراوانی، نقش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در ناهنجاری باروری را نشان داده‌اند. افزایش تنش اکسیداتیو سبب بروز ناهنجاری در اسپرم می‌شود (Aitken, 1995). سلامنووا و همکاران (Slamenova *et al*., 2011) نشان دادند که آسیب‌های وارده به DNA سلول‌های جنسی حیوان نر، برای فرزندان نسل بعد، خطرناک است. چرا که جهش‌های ژنتیکی ایجاد شده در ژنوم والد پدری به نسل بعد منتقل و سبب ناهنجاری‌های ژنتیکی در فرزندان می‌شود. رادیکال-های آزاد اکسیژن، در نتیجه فرآیند سوخت و ساز در سلول، و یا در اثر عوامل تنش‌زای برون سلولی به وجود می‌آیند. و به DNA سلول‌ها آسیب می‌رسانند. بین آسیب‌های ایجاد شده در

[1] Free Radicals
[2] Malondialdehyde
[3] 4-Hydroxynonenol

DNA سلول‌های بیضه، از راه 7, 8- dihydro- 8-oxo-2′- deoxyguanosine و باروری حیوان نر و فرآسنجه‌های اسپرم، همبستگی بالایی وجود دارد.

اگرچه فرآورده‌های جانبی پراکسیداسیون (MDA) در زمان انزال، در منی پرندگان وجود دارند، اما بیشترین نرخ پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم خروس (Blesbios *et al*., 1993) و بوقلمون و ماکیان (Fujihara and Osamu, 1984; Cecil and Bakst, 1993) در چند ساعت آغازین نگهداری برون‌تنی دیده می‌شوند. تشکیل MDA در منی پرندگان و پستانداران در شرایط برون‌تنی، با کاهش معنی‌دار اسیدهای چرب غیر اشباع 20: 4n-6 و 22: 4n-6 همراه است و به رغم وجود سیستم آنتی‌اکسیدانی پیچیده در مایع منی و اسپرم، باز هم اسپرم پرندگان دستخوش آسیب‌های اکسیداسیونی می‌شود (Surai *et al*.,1998).

پراکسیداسیون لیپیدی باعث کاهش توان باروری، کاهش کنش آکروزوم، آسیب کروماتین اسپرم و کاهش لقاح اسپرم و اووسایت می‌شود. کنش آکروزوم برای توانایی بارورسازی اسپرماتوزوآ ضروری است؛ زیرا آنزیم‌های آکروزوم اجازه رسیدن به غشای پلاسمایی اووسایت را به آنها می‌دهد (Fraser and Ahuja, 1988). بنابراین، آنزیم‌های آکروزوم در نفوذ اسپرم به درون اووسایت نقش اساسی دارند (Hammadeh *et al*., 2001).

برای جلوگیری از این آسیب‌های آکروزومی که در منی اتفاق می‌افتد، سیستم‌های آنتی-اکسیدانی وجود دارند؛ این سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در پستانداران و پرندگان اهلی از سه سطح عمده‌ی دفاعی به نام گلوتاتیون پراکسیداز[1]، سوپراکسید دیسموتاز[2] و کاتالاز[3] تشکیل شده‌اند. اما سیستم آنتی‌اکسیدانی موجود در منی پرندگان اهلی در تولید مثل طبیعی تنها برای مدت کوتاهی مؤثر است. پژوهش‌های گونه‌گون نشان داده‌اند که افزودن ترکیبات آنتی-اکسیدانی به جیره غذایی پرندگان اهلی موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای منی می‌شود (Surai *et al*., 1998).

مالو و همکاران گزارش کردند، افزودن ۱۰ میلی‌مولار سیستئین[4] و اسانس روزماری به محلول-رقیق کننده، برای کاهش آسیب‌های احتمالی ناشی از شوک سرمایی در فرآیند انجمادسازی

[1] Glutathione Peroxidase
[2] Superoxide Dismutase
[3] Catalase
[4] Cysteine

اسپرم، تاثیر مثبتی بر زنده‌مانی[1] و یکپارچگی غشا، در زمان‌های ( صفر، یک، دو و سه ساعت) پس از یخ‌گشایی داشت. آنها مشاهده نمودند که اسانس روزماری در مقایسه با سیستئین، دارای توان حفاظتی بیشتری در پاسخ به آسیب‌های آکروزومی در سه ساعت پس از یخ‌گشایی است ($P < ۰/۰۰۱$). آنها گزارش کردند که اسانس روزماری در زمان‌های ( صفر، یک، دو و سه ساعت) پس از یخ‌گشایی، نسبت به سیستئین، در پاسخ به تست HOST، پاسخ بهتری نشان داد. هم‌چنین نرخ نفوذ[2] اسپرماتوزوآهای یخزده در گروهی که به مایع رقیق کننده آنها اسانس روزماری افزوده شده بود، در مقایسه با سیستئین، بیشتر بود ($P < ۰/۰۰۱$). آنها هم‌چنین نشان دادند که افزودن سیستئین سبب بهبود زنده‌مانی و یکپارچگی آکروزوم شد (Malo *et al.*, 2010). سیستئین با تحریک سنتز گلوتاتیون، اثر آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کند. گلوتاتیون، ترکیب آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی، در غشای سلول‌های یوکاریوت‌های هوازی است. کاهش در غلظت گلوتاتیون اسپرم در گاو (Stradaioli *et al.*, 2007) و خوک (Gadea *et al.*, 2004)، پس از فرآیند انجماد گزارش شده است. گلوتاتیون دارای گروه SH– (Thio) است. بنابراین به طور مستقیم با رادیکال‌های آزاد واکنش نشان می‌دهد. هم‌چنین این آنتی‌اکسیدان قادر است تا به عنوان کوفاکتوری برای گلوتاتیون پراکسیداز عمل کند و سبب کاتالیز رادیکال-های اکسیژن، $H_2O_2$ سمی و هایدروپروکسیدها شود (Bilodeau *et al.*, 2001). جلزارسکی و همکاران (Jelezarsky *et al.*, 2008)، نقش آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز را در منی خوک گزارش کردند. خان و احمد (Abdella and Ahmed, 2009) نشان دادند، تنش اکسیداسیون، سبب کاهش فعالیت گلوتاتیون و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بیضه موش شد. آنها توانستند تا با افزودن گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا، به نام، Digera muricata (تیره تاج خروس)، توان آنتی‌اکسیدانی بیضه (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون) را افزایش دهند. تغییر در ترکیب لیپیدها که با افزایش سن ایجاد می‌شود، به سبب کاهش مشخصی در سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز پلاسمای منی است (Kelso *et al.*, 1997a).

مکمل‌های کانی‌ها (روی، کبالت و سلنیوم) بر جنبایی، درصد اسپرم‌های زنده و سلامت غشای اسپرم قوچ آثار سودمندی داشتند (Kendall *et al.*, 2000) که این آثار به علت بهبود

[1] Viability
[2] Penetration Rate

وضعیت آنتی‌اکسیدانی به شکل افزایش غلظت گلوتاتیون پراکسیداز در پلاسمای منی مربوط به افزایش سلنیوم بود؛ اما روی، چنین اثری نداشت؛ از سویی بین غلظت کبالت، ویتامین $B_{12}$ و باروری همبستگی دیده نشد. اثر سودمند مکمل‌های سلنیوم بر درصد اسپرم نرمال برای اسپرم‌های یخ زده بیشتر از اسپرم‌هایی بود که به شکل مایع ارزیابی شدند (Anderson *et al.*, 1996). هم‌چنین ابید (Ebeid, 2009) نشان داد که افزودن سلنیوم آلی به جیره خروس در شرایط تنش گرمایی، سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم و سبب افزایش غلظت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز شد.

پژوهش‌های بسیاری در مورد نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در نگهداری اسپرماتوزوآ، در محلول رقیق‌کننده، برای کاهش آسیب‌های احتمالی ناشی از شوک سرمایی در فرآیند یخ زدن اسپرم، انجام شده است. یکی از آنتی‌اکسیدان‌های مهم، ویتامین E (آلفاتوکوفرول) است که نقش آن در انسان (Taylor *et al.*, 2009)، خوک (Breininger *et al.*, 2005)، بوقلمون (Long and Kramer, 2003)، ماکیان (Cerolini *et al.*, 2006) و خرگوش (Yousef *et al.*, 2003) بررسی شده است. آلفا- توکوفرول می‌تواند از راه فسفریلاسیون تایروزین، سبب افزایش فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی شود. هم‌اکنون چندین پژوهش، نقش آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند، هیدروکسی تولوئن بوتیلات[1] (Roca *et al.*, 2004)، کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز (Roca *et al.*, 2005)، پلاسمای منی (Hernandez *et al.*, 2007)، و اسید آسکوربیک (Yoshimoto *et al.*, 2008) را در جلوگیری از شوک سرمایی در منی خوک‌های یخ زده را اثبات کرده‌اند. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، مانند ویتامین E، نیز در منی پرندگان وجود دارند. غلظت ویتامین E منی اردک نر نسبت به منی بوقلمون کمتر و در منی غاز نر بسیار اندک است (Surai and Ionov, 1992). ویتامینE در اسپرماتوزوییدها وجود دارد و از مهمترین و اساسی‌ترین اجزای سیستم آنتی-اکسیدانی برای این سلول‌ها است. این ویتامین از پراکسیداسیون لیپیدهای اسپرم، بویژه زمانی-که در شرایط تنش‌زا، مانند، رقیق‌سازی منی و ارزیابی کیفی و کمی اسپرم‌ها قرار می‌گیرند، جلوگیری می‌کند (Surai, 1991). در صورت استفاده از ویتامین E، به میزان ۵۰۰ برابر توصیه NRC در جیره غذایی ماکیان، افزایش معنی‌داری در کیفیت منی و توانایی باروری پرنده نر

[1]Butylate hydroxytoluene

مشاهده می‌شود. کمبود این ویتامین سبب آسیب به دستگاه تولید مثل نر، ناهنجاری در فعالیت طبیعی بیضه، دژنره و تحلیل رفتن سلول‌های زایای اسپرماتوگونیا و نیز لوله‌های اسپرم-ساز می‌شود (Wilson *et al.*, 2003). اگرچه ویتامین E یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در منی بوقلمون است، اما به نظر می‌رسد که فزون بر آن به مکانیزم‌های مهار کننده‌ای مانند افزایش سطح سوپراکسیددیسموتاز یا گلوتاتیون، برای غلبه کردن به پراکسیداسیون لیپید نیاز باشد (Froman and Thurston, 1981; Surai *et al.*, 2001). سورای و همکاران (Surai *et al.*, 1995) نشان دادند که افزایش سطح ویتامین E حساسیت منی خروس‌ها را به پراکسیداسیون کاهش داد ولی لانگ و کرامر (Long and Kramer, 2003) نشان دادند که افزودن ویتامین E به تنهایی برای پیشگیری از پراکسیداسیون لیپید منی بوقلمون در شرایط برون‌تنی موثر نبود.

آنتی‌اکسیدان مهم دیگر، آمینو اسیدها هستند؛ که سبب کاهش آسیب‌های اکسیداسیون و پراکسیداسیون لیپیدها و همچنین بهبود عملکردهای فیزیولوژیکی اسپرم یخ زده می‌شوند. افزایش غلظت اسیدهای آمینه در رقیق کننده‌ها، عملکرد فیزیولوژیکی اسپرم را کاهش می-دهد، که این امر به خاطر ایجاد اثرهای سمی و فشار اسمزی ناشی از غلظت بالای اسید آمینه است. همچنین نشان داده شده که انباشت آمینواسید پرولین سبب مقاومت در برابر دماهای پایین و شوک سرمایی می‌شود (Stewart and Lee, 1974). آمینواسید پرولین، از آسیب رسیدن به غشا جلوگیری می‌کند؛ همچنین با تثبیت غشا، از پلاسمولیزه شدن آن جلوگیری می‌کند (Rodolph and Crowe, 1985). کارپنتر و همکاران (Carpenter *et al.*, 1986) نشان دادند که اثر محافظت کنندگی پرولین در برابر سرما با جلوگیری از دناتوره شدن آنزیم فسفو-فروکتوکیناز انجام می‌شود.

سری جیت و همکاران (Sreejith *et al.*, 2006) گزارش کردند که در گاوها، تقریبا تمام سلول‌ها دارای مواد و آنزیم‌هایی هستند که می‌توانند اثر سمی انواع اکسیژن‌های واکنش دهنده را خنثی کنند؛ اما آنتی‌اکسیدان‌های اسپرم در مقایسه با دیگر سلولها کمتر هستند و این سلول‌ها نسبت به فشارهای اکسیداتیو آسیب پذیرتر هستند. نوسی‌یر و همکاران (Nusier *et al.*, 2007) نشان دادند که در موش‌های صحرایی تغذیه شده با دوزهای بالای روزماری (۵۰۰ mg/kg) کاهش معنی‌داری در اسپرماتوژنز به علت کاهش شمار اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها دیده شد که علت آن را نیز به کاهش معنی‌دار تستوسترون نسبت دادند؛ هم-