مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال دهم، شماره اول، پیاپی سی و هفتم، تابستان ۱۴۰۰ (۷۹-۷۱)

مقاله پژوهشی:

تأثیر برون‌تنی سطوح مختلف عصاره نعنافلفلی بر فراسنجه‌های کیفی منی در قوچ عربی

شادان گل‌اندام[۱]، صالح طباطبائی وکیلی[۲*]، خلیل میرزاده[۲]
۱. کارشناس، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران
۲. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱٤ - تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/٤/۲۸)

چکیده
هدف از تحقیق حاضر، بررسی تأثیر سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی بر کیفیت منی قوچ عربی بود. اسپرم گیری از ۱۲ رأس قوچ عربی به طور هفتگی به مدت ۸ هفته انجام و منی آنها بلافاصله با هم مخلوط شد. نمونه‌های منی مخلوط و رقیق‌شده به ۵ قسمت تقسیم و سطوح صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر عصاره نعنافلفلی دریافت کردند. در زمان‌های مختلف نگهداری منی رقیق‌شده حاوی تیمارهای آزمایشی (صفر، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) به صورت مایع تحت دمای ۵ درجه سلسیوس، فراسنجه‌های کیفی منی بررسی شدند. بلافاصله پس از اسپرم‌گیری، کمترین میزان تحرک کل و زنده‌مانی اسپرم متعلق به سطح ۲۰۰ عصاره نعناع فلفلی بود (P<۰/۰۵). ۲٤ ساعت پس از اسپرم‌گیری، سطوح ۱۵۰ و ۲۰۰ عصاره نعناع فلفلی میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم را افزایش دادند. در این زمان، کمترین میزان سلامت غشای پلاسمای اسپرم مربوط به سطح ۲۰۰ عصاره نعناع فلفلی بود (P<۰/۰۵). ٤۸ ساعت پس از اسپرم‌گیری، بیشترین جنبایی کل، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم مربوط به گروه شاهد بود (P<۰/۰۵). ۷۲ ساعت پس از اسپرم‌گیری، اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارها برای تمام فراسنجه‌های کیفی اسپرم یافت نشد. در این زمان، بیشترین غلظت مالون دی‌آلدهید (MDA) پلاسمای منی مربوط به سطح ۱۰۰ عصاره نعنافلفلی بود (P<۰/۰۵). به‌طورکلی، با افزودن سطوح مختلف عصاره نعنافلفلی به رقیق‌کننده و نگهداری منی رقیق شده قوچ عربی به حالت مایع در ۵ درجه سلسیوس، غلظت‌های به‌کار رفته عصاره نعناع‌فلفلی نه تنها سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم‌ها نشد، بلکه اثر مخربی هم داشت.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، قوچ، کیفیت اسپرم، نعناع فلفلی.

In Vitro effect of different levels of peppermint (*Mentha piperital*) extract on semen quality parameters in Arabi ram

Shadan Golandam[1], Saleh Tabatabaei Vakili[2*], Khalil Mirzadeh[3]
1. M. A., Department of Animal Science, Faculty of Animal and Food Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal and Food Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran

(Received: Jan. 3, 2021 - Accepted: Jul. 19, 2021)

Abstract
The aim of this study was to investigate the effect of different levels of peppermint extract on semen quality of Arabi rams. Semen was collected from 12 Arabi rams weekly for 8 weeks and immediately mixed, and then were divided into 5 parts and received zero, 50, 100, 150 and 200 µl/ml of peppermint extract. At different storage times of diluted semen containing treatments (zero, 24, 48 and 72 hours) in liquid condition, semen quality parameters were evaluated. Immediately after sperm collection, the lowest total motility and sperm viability belonged to the level of 200 peppermint extract (P<0.05). At 24 hours, levels 150 and 200 of extract increased the rate of morphological abnormalities of sperms. At this time, the lowest level of sperm plasma membrane integrity was related to the level of 200 peppermint extracts (P<0.05). 48 hours after sperm storage, the highest total motility, viability and plasma membrane integrity of sperms were belonged to the control group (P<0.05). 72 hours after semen storage, no statistically significant differences were found among treatments for all sperm quality parameters. At this time, the highest concentration of malondialdehyde (MDA) in seminal plasma was related to the level of 100 µl/ml peppermint extract (P<0.05). In general, by adding different levels of peppermint extract to the diluent and maintaining the diluted semen of the Arabi ram in a liquid state at 5°C, the concentrations used of peppermint extract not only did not improve the qualitative parameters of the sperm, it also had a devastating effect.

Keywords: Antioxidant, Peppermint, Rams, Sperm quality.

* نویسنده مسئول: صالح طباطبائی وکیلی
Email: tabatabaei@asnrukh.ac.ir

مقدمه

معمولاً اسپرماتوزوئیدها در طی نگه‌داری دچار استرس حرارتی شده و در دماهای پایین و بالا با کاهش خواص حیاتی خود مثل تحرک و زنده‌مانی روبه‌رو می‌شوند (Ghazvinian *et al*., 2000). این امر یک عامل نامطلوب در توسعه استفاده از تلقیح مصنوعی در گوسفند با استفاده از منی غیرمنجمد محسوب شده و لزوم ساخت رقیق‌کننده‌های اختصاصی منی در این گونه را دوچندان می‌کند. با توجه به اینکه غشای پلاسمایی اسپرم قوچ در مقایسه با گونه‌های دیگر میزان بالاتری از اسیدهای چرب غیراشباع را داراست، لذا نسبت به تنش‌های اکسیداتیو نیز حساس‌تر می‌باشد (Baumber *et al*., 2000). تولید رادیکال‌های آزاد بوسیله اسپرم بیشتر در ناحیه میتوکندری بوده و از نوع آنیون‌سوپراکسیداز می‌باشد (Halliwel & Gutteridge, 1989). همچنین سلول‌های پیرامون میتوکندری در طی فرایند اسپرماتوژنیک و سلول‌های اپیتلیال نیز در تولید رادیکال‌های آزاد نقش دارند (Plante *et al*., 1994).

آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با کاهش سرعت اکسیداسیون، باعث حفظ سلول از آسیب‌های شدید اکسیده شدن می‌شوند. این ترکیبات ممکن است به طور طبیعی در منی وجود داشته باشند و یا به طریق روش‌های مصنوعی سنتز و به آن‌ها اضافه گردند (Agarwal & Sekhon, 2010). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک بدلیل داشتن ترکیبات سمی سایتوتوکسیک و مشکلات ایمنی، زیاد به صرفه نبوده و لذا استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد توجه محققان قرار گرفته است (Malo *et al*., 2011). تحرک و قابلیت باروری اسپرماتوزوزوئیدها می‌تواند با افزودن عوامل بهبود دهنده تحرک یا آنتی‌اکسیدان‌ها بهبود یابد. امروزه استفاده از گیاهان با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، اهمیت زیادی پیدا کرده است. در سال‌های اخیر در رابطه با خواص آنتی‌اکسیدانی برخی گیاهان پژوهش‌های بسیاری انجام شده است و انواع مختلفی از ترکیب-های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان یافت شده است که می‌توانند برای کنترل رادیکال‌های آزاد مفید واقع شوند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برخی گیاهان برابر و در برخی موارد حتی بیشتر از آنتی‌اکسیدان-های سنتتیک است (Malo *et al*., 2011).

نعناع‌فلفلی با نام علمی *Menthe piperital* از خانواده *lamiaceae* از جمله گیاهان دارویی و معطری است که اسانس آن مصارف دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی فراوانی دارد. این گیاه هیبریدی است که از تلاقی بین گونه‌های *Mentha aquatiica* و *Menta spicata* به دست آمده است (Foster, 1996). طعم تند برگ‌های آن سبب شهرت این گیاه به نام نعنافلفلی شده است. ترکیبات موجود در این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، قارچ‌کشی و حشره‌کشی می‌باشند. از ترکیبات مهم نعناع فلفلی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آن است. به طور متوسط ۲۳-۱۹ درصد وزن خشک برگ نعناع‌فلفلی را ترکیبات فنولی و ۱۲ درصد آن را ترکیبات فلاونوئیدی مانند اریوسیترین، رزمارینیک اسید، هیسپریدین و لوتئولین تشکیل می‌دهند (McKay & Blumberrg, 2006). اعضای خانواده نعناعیان حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از قبیل پلی‌فنول‌ها، ویتامین‌های E، C و کارتنوئیدها هستند که نقش بسیار مهمی در تجزیه پراکسیدها و جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های فعال اکسیژنی، اکسیژن منفرد و اکسیژن سه گانه ایفا می‌کنند (Kursat *et al*., 2011). مشخص شده است که این ترکیبات و به خصوص فلاونوئیدها قادرند با پوشش دادن لیپیدها، روند پراکسیداسیون لیپیدی را تغییر داده و متوقف کنند، هم چنین می‌توانند با کاهش سیالیت غشاهای سلولی و جلوگیری از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و محدود کردن پراکسیداسیون فسفولیپیدها و اسیدهای چرب غیراشباع، از غشاهای سلولی محافظت کنند (Blokhina *et al*., 2003). هدف از این

پژوهش، بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی سطوح مختلف عصاره گیاه نعناع‌فلفلی بر شاخص‌های کیفی منی قوچ عربی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر بر روی ۱۲ رأس قوچ عربی با سن ۳-۲ سال در فصل تولیدمثل پاییزه (از اوایل مهرماه تا اواخر آذرماه ۱۳۹۸) در ایستگاه تحقیقاتی دام و طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در شهر ملاثانی در ۳۶ کیلومتری شمال شرقی اهواز انجام شد. محل نگهداری قوچ‌ها مسقف نیمه باز با آخور و آبشخور دسته‌جمعی بوده و حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. جیره‌ی قوچ‌ها مشتمل بر جو، کاه، یونجه‌ی خشک و سیلاژ ذرت بود و بلوک معدنی لیسیدنی در آخور قرار داشت. عمل استحصال منی با تحریک الکتریکی توسط دستگاه الکترواجاکولیتور به‌طور هفتگی و به مدت ۶ هفته انجام گرفت. به منظور از بین بردن اثرات انفرادی، منی بدست آمده از قوچ‌ها بلافاصله مخلوط و با رقیق‌کننده بر پایه تریس (تریس: ۳/۶۳ گرم، فروکتوز: ۰/۵ گرم، اسیدسیتریک: ۱/۹۹ گرم، زرده تخم‌مرغ: ۱۴ میلی‌لیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) رقیق شد. سپس، این نمونه منی مخلوط و رقیق شده به ۵ قسمت تقسیم و هر کدام سطوح عصاره نعنافلفلی یعنی ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر را دریافت کردند. تیمارهای منی رقیق شده حاوی سطوح مختلف عصاره نعنافلفلی، در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از نگه‌داری به حالت مایع در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد، مورد ارزیابی درصد تحرک، زنده‌مانی، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم و نیز غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) منی در زمان پایانی ذخیره منی قرار گرفتند. درصد تحرک اسپرم با استفاده از سیستم کاسا و درصد اسپرم‌های زنده و ناهنجار توسط روش رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین تعیین گردید. برای ارزیابی سلامت غشای اسپرم‌ها محلول هیپواسموتیک به‌کار رفت. واکنش اسپرم‌ها به محیط هیپواسمول به صورت تورم دم است. در این حالت اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالمی دارند به محلول واکنش نشان می‌دهند، ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. تعیین غلظت مالون‌دی‌آلدهید در نمونه‌های پلاسمای منی به عنوان شاخص پروکسیداسیون لیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم‌ها، با استفاده از واکنش تیوباریوتیک اسید (TBA) طبق روش Placer *et al.* (1966) انجام شد.

نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر در قالب طرح کامل تصادفی، با استفاده از برنامه‌ی نرم افزاری SPSS (ویرایش ۲۰) مورد آنالیز قرار گرفت. جهت بررسی کیفیت اسپرم و غلظت مالون‌دی‌آلدهید پلاسمای منی در هر کدام از زمان‌ها از تحلیل واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها، آزمون مقایسه‌ای چند دامنه‌ای دانکن به‌کار رفت.

مدل آماری طرح به صورت زیر می‌باشد:

$$Yij = \mu + Tij + Eij$$

Yij: مشاهدات مربوط به صفات

μ : میانگین کل مشاهدات

Ti: اثر تیمار

Eij : اثر خطا

نتایج

بلافاصله پس از اسپرم‌گیری (جدول ۱)، میزان تحرک پیش‌رونده، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. در این زمان، نه تنها سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر عصاره نعنافلفلی سبب بهبود درصد تحرک کل و زنده‌مانی اسپرم‌ها نسبت به شاهد نشدند، بلکه بیشترین غلظت این عصاره (سطح ۲۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر) اثر منفی بر این فراسنجه‌ها داشت ($P<۰/۰۵$).

۲۴ ساعت پس از اسپرم‌گیری و نگهداری منی به حالت مایع، میزان تحرک پیشرونده، تحرک کل و زنده‌مانی اسپرم تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. سطوح ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر عصاره نعنافلفلی با افزایش درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و کاهش سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در مقایسه با شاهد همراه بودند ($P<۰/۰۵$) (جدول ۲).

۴۸ ساعت پس از اسپرم‌گیری و نگهداری منی به حالت مایع، نه تنها سطوح نعناع‌فلفلی تأثیر معنی‌داری بر درصد تحرک پیشرونده اسپرم در مقایسه با گروه شاهد نداشت، بلکه بر سایر فراسنجه‌های اسپرم نیز اثرات نامطلوبی به جای گذاشت ($P<۰/۰۵$) (جدول ۳).

تأثیر افزودن سطوح مختلف عصاره نعناع‌فلفلی به منی قوچ عربی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم در زمان ۷۲ ساعت پس از اسپرم‌گیری و نگهداری منی به حالت مایع در $5^{o}C$، در جدول ۴ ارائه شده است. در این زمان، تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم نداشتند.

با توجه به جدول ۵، با افزودن سطوح مختلف عصاره نعناع‌فلفلی به منی قوچ عربی، بیشترین غلظت مالون‌دی‌آلدهید پس از ۷۲ ساعت از نگهداری منی به حالت مایع در $5^{o}C$، مربوط به تیمار ۱۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر عصاره بود ($P<۰/۰۵$).

جدول ۱. تأثیر سطوح مختلف عصاره نعنافلفلی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم (درصد) قوچ عربی (بلافاصله پس از اسپرم‌گیری)

تیمارها (µl/ml)	تحرک پیشرونده	تحرک کل	زنده‌مانی	ناهنجاری مورفولوژیکی	سلامت غشای پلاسمایی
شاهد	۴۳/۱۵ ±۵/۷۴	۸۰/۵۵ ±۳/۳۱^{a}	۸۲/۲۵ ±۳/۰۳^{a}	۳/۷۵ ±۰/۴۸	۶۷/۵۰ ±۳/۲۲
نعنافلفلی ۵۰	۴۰/۸۳ ± ۶/۱۹	۷۷/۷۰ ±۳/۴۹^{ab}	۸۳/۵۰ ±۲/۷۵^{a}	۴/۲۵ ±۰/۴۸	۶۶/۲۵ ±۳/۷۵
نعنافلفلی ۱۰۰	۳۶/۰۸± ۷/۳۷	۷۵/۳۸ ±۴/۵۰^{ab}	۸۰/۰۰ ±۳/۵۴^{ab}	۴/۷۵ ±۰/۲۵	۶۲/۵۰ ±۴/۳۳
نعنافلفلی ۱۵۰	۳۳/۳۳ ± ۶/۶۲	۷۰/۲۵ ±۳/۹۹^{ab}	۷۵/۰۰ ±۳/۵۴^{ab}	۴/۲۵ ±۰/۴۷	۵۷/۵۰ ±۴/۳۰
نعنافلفلی ۲۰۰	۳۱/۰۵ ± ۶/۰۷	۶۵/۷۸ ±۳/۴۱^{b}	۶۸/۷۵ ±۳/۷۵^{b}	۴/۷۵ ±۰/۶۳	۵۳/۷۵ ±۳/۷۵

تفاوت میانگین‌ها (± خطای معیار) با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).

جدول ۲. تأثیر سطوح مختلف عصاره نعناع‌فلفلی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم (درصد) قوچ عربی (۲۴ ساعت پس از اسپرم‌گیری)

تیمارها (µl/ml)	تحرک پیشرونده	تحرک کل	زنده‌مانی	ناهنجاری مورفولوژیکی	سلامت غشای پلاسمایی
شاهد	۲۶/۸۳ ±۲/۴۷	۶۶/۱۰ ±۶/۹۴	۷۰/۲۵ ±۶/۷۴	۵/۰۰ ±۰/۴۲^{b}	۵۶/۲۵ ±۶/۲۵^{a}
نعنافلفلی ۵۰	۲۳/۲۳ ± ۷/۰۸	۵۳/۱۷ ±۴/۰۸	۵۶/۲۵ ±۱۲/۱۴	۶/۵۰ ±۰/۶۵^{ab}	۵۵/۰۰ ±۷/۶۴^{a}
نعنافلفلی ۱۰۰	۲۴/۲۰± ۴/۰۷	۴۵/۱۳ ±۸/۵۲	۶۷/۶۷ ±۱/۴۵	۶/۲۵ ±۰/۶۳^{ab}	۵۶/۶۷ ±۶/۰۱^{a}
نعنافلفلی ۱۵۰	۲۲/۳۰ ± ۳/۳۶	۴۹/۵۳ ±۲/۸۵	۶۱/۶۶ ±۱/۶۷	۷/۲۵ ±۰/۴۸^{a}	۴۰/۰۰ ±۲/۸۹^{ab}
نعنافلفلی ۲۰۰	۲۱/۳۳ ± ۳/۵۹	۴۷/۳۷ ±۲/۸۳	۵۲/۶۷ ±۳/۹۳	۷/۰۰ ±۰/۷۱^{a}	۳۵/۰۰ ±۲/۸۹^{b}

تفاوت میانگین‌ها (± خطای معیار) با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).

جدول ۳. تأثیر سطوح مختلف عصاره نعنافلفلی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم (درصد) قوچ عربی (۴۸ ساعت پس از اسپرم‌گیری)

تیمارها (µl/ml)	تحرک پیشرونده	تحرک کل	زنده‌مانی	ناهنجاری مورفولوژیکی	سلامت غشای پلاسمایی
شاهد	۲۵/۳۷ ±۲/۷۵	۵۵/۹۵ ±۴/۰۴^{a}	۵۷/۰۰ ±۴/۱۴^{a}	۵/۷۵ ±۰/۴۲^{b}	۴۶/۲۵ ±۳/۶۶^{a}
نعنافلفلی ۵۰	۲۳/۳۳ ± ۵/۸۴	۳۲/۹۰ ±۵/۹۸^{b}	۴۱/۳۳ ±۴/۱۰^{b}	۷/۷۵ ±۰/۴۸^{a}	۳۱/۲۵ ±۵/۰۴^{b}
نعنافلفلی ۱۰۰	۱۸/۷۰± ۰/۶۸	۳۸/۰۸ ±۶/۵۶^{ab}	۵۱/۶۷ ±۱/۶۷^{ab}	۷/۷۵ ±۰/۶۳^{a}	۳۷/۵۰ ±۶/۰۰^{ab}
نعنافلفلی ۱۵۰	۱۶/۸۰ ± ۰/۱۵	۳۴/۴۸ ±۵/۹۸^{b}	۴۳/۳۳ ±۱/۷۵^{b}	۷/۵۰ ±۰/۶۵^{ab}	۳۰/۰۰ ±۴/۴۹^{b}
نعنافلفلی ۲۰۰	۱۷/۰۰ ± ۱/۵۳	۳۳/۶۰ ±۴/۷۸^{b}	۴۱/۶۷ ±۱/۶۲^{b}	۷/۵۰ ±۰/۶۴^{ab}	۲۷/۵۰ ±۱/۶۴^{b}

تفاوت میانگین‌ها (± خطای معیار) با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).

جدول ٤. تأثیر سطوح مختلف عصاره نعنافلفلی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم (درصد) قوچ عربی (۷۲ ساعت پس از اسپرم‌گیری)

تیمارها (µl/ml)	تحرک پیشرونده	تحرک کل	زنده‌مانی	ناهنجاری مورفولوژیکی	سلامت غشای پلاسمایی
شاهد	۸/۶۳ ±۱/۰۹	۲۶/۸۷ ±۴/۲۳	۲۸/۳۳ ±۳/۵۳	۶/۵۰ ±۰/۶۵	۱۵/۱۰ ±۲/۸۹
نعنافلفلی ۵۰	۱۲/۵۵ ± ۰/۲۵	۲۴/۳۰ ±۵/۱۲	۳۵/۰۰ ±۲/۸۴	۸/۵۰ ±۰/۶۵	۱۷/۵۰ ±۲/۵۰
نعنافلفلی ۱۰۰	۱۲/۱۰± ۲/۸۴	۲۲/۴۳ ±۳/۸۰	۳۵/۱۰ ±۲/۰۴	۸/۰۰ ±۰/۴۱	۱۵/۰۰ ±۲/۸۹
نعنافلفلی ۱۵۰	۱۲/۲۰ ± ۴/۳۸	۲۲/۳۳ ±۵/۲۷	۲۸/۷۵ ±۴/۲۷	۸/۲۵ ±۰/۸۵	۱۵/۰۰ ±۵/۷۷
نعنافلفلی ۲۰۰	۱۲/۸۰ ± ۳/۴۷	۲۳/۱۳ ±۴/۸۱	۲۷/۵۰ ±۴/۳۳	۸/۵۰ ±۰/۶۵	۱۶/۶۷ ±۴/۴۱

جدول ۵. تأثیر سطوح مختلف عصاره نعنافلفلی بر غلظت مالون‌دی‌آلدهید منی قوچ عربی (۷۲ ساعت پس از اسپرم‌گیری)

تیمارها (µl/ml)	مالون دی آلدهید (نانومول در میلی‌لیتر)
شاهد	۱/۶۵ ±۰/۰۳[b]
نعناع‌فلفلی ۵۰	۱/۹۶ ± ۰/۳۰[b]
نعناع‌فلفلی ۱۰۰	۲/۸۹ ۰±/۰۹[a]
نعناع‌فلفلی ۱۵۰	۱/۷۲ ± ۰/۲۳[b]
نعناع‌فلفلی ۲۰۰	۱/۷۴ ± ۰/۲۴[b]

تفاوت میانگین‌ها (± خطای معیار) با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

گزارش‌ها در خصوص تأثیر برون‌تنی نعنافلفلی بر عملکرد تولیدمثلی حیوانات نر به‌ویژه تحت شرایط مایع (غیرانجماد) بسیار نادر است. در تحقیقی، افزودن عصاره نعناع‌فلفلی به رقیق‌کننده منی قوچ مغانی، تأثیر متفاوت وابسته به دوز بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم متعاقب فرآیند انجماد و یخ‌گشایی منی داشت. به‌طوری که سطوح پایین عصاره نعنافلفلی سبب بهبود درصد زنده‌مانی و تحرک اسپرم‌ها نسبت به گروه شاهد شد. در حالیکه دوز بالاتر این عصاره با کاهش زنده‌مانی اسپرم‌ها همراه بود (Vahedi *et al.*, 2018). در مطالعه حاضر که بر خلاف تحقیق فوق تحت شرایط نگهداری منی قوچ عربی به حالت مایع انجام شد، سطوح به‌کار رفته عصاره نعناع‌فلفلی در زمان‌های مختلف نگهداری منی به حالت مایع، نه تنها سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم‌ها شامل میزان زنده‌مانی، تحرک پیشرونده، جنبایی کل، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی، سلامت غشای پلاسمایی نسبت به شاهد نشدند، بلکه در بعضی از زمان‌ها که در جداول مشخص است، اثرات نامطلوبی نیز بر برخی صفات اسپرم‌ها داشتند. در مطالعه دیگر، با افزودن عصاره اتانولی پونه (هم خانواده با گیاه نعناع‌فلفلی) به رقیق‌کننده منی قوچ بلوچی، درصد زنده‌مانی و تحرک کل اسپرم بهبود نیافت (Alizadeh *et al.*, 2020)، که موافق با تحقیق حاضر در قوچ عربی با استفاده از سطوح مختلف نعنافلفلی و نگهداری منی به حالت مایع است. بر خلاف مطالعه حاضر، افزودن عصاره الکلی رزماری به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مشابه با نعنافلفلی به منی خروس، سبب بهبود کیفیت اسپرم و کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدهید شد (Ramezaninejad *et al.*, 2017).

تحقیقات Daghigh Kia *et al.* (2016) نشان داد که افزودن ۱۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر عصاره مرزنجوش (گیاهی از خانواده نعناییان) با خواص آنتی‌اکسیدانی مشابه نعناع‌فلفلی به منی قوچ قزل باعث بهبود صفت تحرک پیشرونده اسپرم نسبت به گروه شاهد شد ولی در سایر صفات حرکتی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی بهبود معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد به همراه نداشته است. به‌کارگیری سطح ۲۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر عصاره این گیاه موجب کاهش معنی‌دار صفات زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی نسبت به گروه شاهد شد. استفاده از سطح ۱۵۰ عصاره مرزنجوش غلظت تولید مالون‌دی‌آلدهید را نسبت به گروه شاهد و سطح بیشتر آن کاهش داد. در تحقیق ما، سطوح به‌کار رفته عصاره نعنافلفلی نه تنها سبب کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدهید پلاسمای منی عربی نسبت به شاهد

پس از ۷۲ ساعت از نگهداری منی به حالت مایع نشد بلکه دوز ۱۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر نعنافلفلی دارای غلظت مالون‌دی‌آلدهید بیشتری در مقایسه با شاهد بود. در تحقیق دیگر، افزودن سطح پایین (۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر) عصاره مرزنجوش به منی گاو هلشتاین باعث بهبود معنی‌دار پارامترهای تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها و نیز کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدهید بعد از فرایند انجماد- یخ گشایی منی در مقایسه با گروه شاهد شد. این در حالی است که سطوح بالای این عصاره (۱۶ و ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر) سبب کاهش تحرک کل و پیش‌رونده اسپرم‌ها نسبت به گروه‌های دیگر شد (Farhadi *et al.*, 2015). افزودن مقادیر بیشتر عصاره‌های گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، با مهار بیش از حد فعالیت آنزیم‌های دخیل در اکسیداسیون و احیاء و نیز بهم زدن تعادل بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تولید رادیکال‌های آزاد در محیط اسپرم‌ها، موجب کاهش عملکردهای اسپرم می‌شوند (Roca *et al.*, 2004). در مطالعه دیگر، تحت عنوان بهبود ذخیره‌سازی اسپرم خروس با استفاده از اسانس الکلی رزماری، استفاده از سطوح پایین اسانس رزماری (سطوح ۱۰ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) در مایع رقیق‌کننده، کیفیت اسپرم خروس را پس از یخ‌گشایی بهبود بخشید (Shafigh *et al.*, 2016). همچنین افزودن عصاره آبی گیاه رزماری به رقیق‌کننده منی بز، موجب بهبود پارامترهای تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و کاهش مقدار ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم‌ها شده و توانست اسپرم‌های بز را در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد حفظ کند (Zanganeh *et al.*, 2013). نتایج تحقیقات دیگر نشان داد که عصاره آویشن کرمانی در موش‌های دیابتی دارای آثار مطلوب بر دستگاه تولیدمثلی بوده و خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد پراکسیداسیونی لیپیدی در بیضه نشان داد (Honari & Pouraboli, 2019). با بررسی اثر عصاره برگ زیتون بر ذخیره‌سازی منی خروس مشخص شد که اضافه کردن ۱۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون به منی خروس، میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید را به‌طور معنی‌داری کاهش داد و فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت از ذخیره منی بهبود یافت، ولی در نمونه‌هایی که ۲۰۰ میکروگرم عصاره اضافه شده بود، غلظت مالون‌دی‌آلدهید افزایش یافته و کیفیت اسپرم متعاقب نگهداری منی کاهش یافت (Jalali-Kohi Kheili *et al.*, 2016). با بررسی اثر ویتامین E که همانند نعناع‌فلفلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد، بر اسپرم قوچ قزل در شرایط انجماد، غلظت ۲ میلی‌مول آن موجب بهبود میزان زنده‌مانی و تحرک اسپرم و کاهش ناهنجاری‌های اسپرم شد (Amini Pour *et al.*, 2013).

طی پژوهشی که در مورد اثر افزودنی آنتی‌اکسیدان بر پارامترهای فیزیولوژیکی اسپرم قوچ در شرایط سرما صورت گرفت، آنتی‌اکسیدان‌های سیستئین و ویتامین E سبب بهبود میزان تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ شدند (Angel *et al.*, 2009). در تحقیقی دیگر، آنتی‌اکسیدان‌های ویتامین C و گلوتامیون با بهبود حرکت اسپرم‌ها همراه بودند (Fanaei *et al.*, 2013). در بررسی اثر آنتی‌اکسیدان‌های سیستئین، اسید آسکوربیک و هیپوتائورین بر اسپرم بز بوئر مشاهده شد که آنتی‌اکسیدان‌های فوق سبب بهبود میزان زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی و سلامت آکروزوم اسپرم شدند، طوری که غلظت های ۵ میلی‌مول سیستئین و ۱۰ میلی‌مول هیپوتائورین بهبود فراسنجه‌های فوق را به‌دنبال داشتند (Memon *et al.*, 2012). این نتایج، مغایر با یافته‌های مطالعه حاضر با استفاده از سطوح مختلف عصاره نعنافلفلی در رقیق‌کننده منی قوچ عربی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم در زمان‌های مختلف نگهداری منی به حالت مایع در ۵ درجه سانتی‌گراد بود. علیرغم فواید زیاد نعنافلفلی در طب انسانی، شواهدی از اثرات سمی و مضر این گیاه بر عملکرد برخی سلول‌ها و بافت‌ها از جمله کلیه، کبد، رحم، بافت بیضه و نیز کاهش غلظت تستوسترون و میل جنسی مردان احتمالاً با تغییر

روند ترشح گونادوتروپین‌ها وجود دارد. حتی واکنش آلرژیک نسبت به برگ‌های این گیاه گزارش شده است (Nozhat *et al.*, 2014; Akdogan *et al.*, 2004). در تحقیقی، با تجویز خوراکی سطوح مختلف عصاره برگ نعنافلفلی به موش‌های نر نژاد ویستار، تعداد اسپرم‌های غیرپیشرونده و غیرمتحرک در نمونه‌های تیمار با عصاره نعنافلفلی بیشتر از گروه شاهد بود (Nozhat *et al.*, 2014). در مطالعه دیگر، پس از تجویز عصاره برگ نعناع، عملکرد تولیدمثلی موش نر مختل شد. طوری‌که تراکم، درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها کاهش و میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی افزایش یافت (Sharma & Jacob, 1996). اثر سمی این یافته‌ها مشابه با نتایج مطالعه حاضر در قوچ عربی می‌باشد. لذا علارغم این حقیقت که نعنافلفلی حاوی طیف وسیعی از ترکیبات فعال بیولوژیکی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، گزارشاتی از اثرات ضد آندروژنیکی آن وجود دارد. همچنین، تزریق عصاره این گیاه به موش صحرایی، سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا از جمله سوپراکید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز شد. در مطالعه بافت‌شناسی نیز کاهش تراکم اسپرم در دم اپیدیدیم و دژنراسیون مجاری وابران مشاهده شد (Kumar *et al.*, 2008). عصاره نعنافلفلی به‌ویژه در غلظت‌های بالا ممکن است فعالیت زنجیره تنفسی میتوکندریایی مرتبط با کمپلکس II را فعال نموده و از این طریق موجب تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شود. غلظت‌های بالای ROS اغلب منجر به اختلال عملکردی میتوکندری و پاره شدن غشای آن شده و در نتیجه رهایی ROS به محیط پیرامونی اتفاق می‌افتد (Tvrda *et al.*, 2018).

از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که با افزودن غلظت‌های مختلف عصاره نعنافلفلی به رقیق‌کننده منی قوچ عربی و نگهداری آن‌ها به حالت مایع و ارزیابی در زمان‌های مختلف، نه تنها فراسنجه‌های کیفی اسپرم در مقایسه با گروه شاهد بهبود نیافتند، بلکه حتی شاهد کاهش کیفیت اسپرم طی این مدت بودیم. لذا استفاده از عصاره نعنافلفلی در رقیق‌کننده منی قوچ توصیه نمی‌شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به سبب فراهم نمودن امکانات تحقیق حاضر، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Agarwal, A.; Sekhon, L.H. (2010). The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. Human Fertility; 13(4):217-225.

Akdogan, M.; Ozguner, M.; Kocak, A. (2004). Effects of peppermint teas on plasma testosterone, follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone levels and testicular tissue in rats. Urology; 64:394-398.

Alizadeh, K.; Moslemipur, F.; Bahri Binabaj, F.; Mojtahedin, A. (2020). The effect of adding horsemint ethanol extract and cysteine into extender on fertility characteristic of frozen Baluchi ram semen after thawing. Journal of Ruminant Research; 8(1):49-62.

Amini Pour, H.; Tahmasebi, A.M.; Naserain, A.A. (2013). The influence of vitamin E on semen characteristics of ghezel rams in during cooling and frozen process. European Journal of Zoological Reserch; 2(5):94-99.

Angel, A.; Zamfirescu, S.; Coprean, D.; Sogorescu, E. (2009). The effects of cystein, bovine serum albumin and vitamin E on the calitative parameters of frozen-thawed ram semen. Annals of the Romanian Society for Cell Biology; 14(2):133-136.

Baumber, J.; Ball, B.A.; Gravance, CG.; Medina, V. (2000). The effect of

reactive oxygen species on equine sperm moltility, viability, acrosomal integtity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. Andrology; 2000; 21: 895-902.

Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagersted, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivaion stress: a review. Annals of Botany; 91(2):179-194.

Daghigh Kia, H.; Sadeghi Sadegh Abad, F.; Mohamadzadeh, H.; Vaseghi Dodran, H.; Ashrafi, I. (2016). The effect of Origanum vulgare extract as natural antioxidant on quality cryopreserved ram sperm. 26(4): 111-120.

Fanaei, H.; Azizi, Y.; Khayat, S. (2013). A review: Role of oxidative stress in male infertility. Journal of Fasa University of Medical Sciences; 3(2):93-103.

Farhadi, R.; Daghighkia, H.; Hosseinkhani, A.; Ghasemi Panahi B., Dehghan GH.; Ashrafi, I. (2015). Effect of Origanium vulgare ethanol extract on quality parameters and malondialdehyde concentration of cryopreserved Holstein bull sperm. Animal Science Research; 25(1):1-11.

Foster, S. (1996). Peppermint: Mentha piperita. American Botanical Council-Botanical Series; 36:3-8.

Ghazvinian Kh.; Javaheri Vayghan. A.; Irani A. Reproductive physiology and applied artificial insemination in sheep and goat. Semnan University press, 273.

Halliwel, B.; Gutteridge, J.M.C (1989). Lipid preoxidation : a radical chain reaction. Free radicals in biology and medicine; 2:188-218.

Honari, N.; Pouraboli I. (2019). The effect of hydroalcoholic extract of Thymus caramanicus on serum testosterone and testis antioxidant enzymes levels in streptozotocin induced diabetic rats: An experimental study**.** Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences**;** 17(11): 1017-1030.

Jalali-Kohi Kheili, S.M.; Mohammadi, M.; Roostaei-Ali Mehr, M. (2016). Effect of olive leaf extract on rooster semen storage. Journal of Animal Production. 18(2): 377-385.

Kumar, V.; Kural, M.R.; Pereira, .M.; Roy, P. (2008). Spearmint induced hypothalamic oxidative stress and testicular antiandrogenicity in male rats - altered levels of gene expression, enzymes and hormones. Food Chemistry and Toxicology. 46: 3563-3570.

Kursat, M.; Emre, I.; Yilmaz, O.; Erecevit, P. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity in the seeds of Origanum vulgare L. subsp. gracile (C. Koch) ietswaart and origanum acutidens (Hand-Mazz) ietswaart from turket. Grasas Y Aceites; 62(4):410-417.

Memon, A.A.; Wahid, H.; Rosnina, Y.; Goh, Y.M.; Ebrahimi, M.; Nadia, F.M. (2012). Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. Animal Reproduction Science; 136(1): 55-60.

McKay, D.L.; Blumberrg, J.B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (mentha piperital Linn). Phytotherapy Research; 20(8):619-633.

Nozhat, F.; Alaee S.; Behzadi, Kh.; Azadi Chegini, N. (2014). Evaluation the possible toxic effects of spearmint (*Mentha spicata*) on the reproductive system, fertility and number of offspring of adult male rats. Avicenna Journal of Phytomedicine; 4(6):420-429.

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

Plante, M.; de Lamirande, E.; Gagnon, C. (1994). Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. Fertility and Sterility; 62(2): 387-393.

Ramezaninejad, H.; Roostaei Ali Mehr, M. (2017). Storage of rooster semen in liquid form using alcoholic extract of rosemary. Iranian Journal of Animal Science; 48(1): 51-59.

Roca, J.; Gil, M.A.; Parrilla, I.; Vazquez, J.M.; Marinez, E.A. (2004). Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. Journal of Andrology; 25:397-405.

Shafigh, H.; Shakeri, M.; Zeinoldini, S.; Kohram, H.; ZHhandi, M.; Moghbeli, M. (2016). Improving sperm cryopreservation of rooster by using rosemary alcoholic essential oil. Journal of Animal Production; 18(3):615-624.

Sharma, N.; Jacob, D. (1996). Fertility suppression of the male mouse after administration of mint leaf extract. *Phytochemical Research*; 10:175-177.

Tvrda, E.; Konecna, N.; Zbynovska, K.; Lukac, N. (2018). Antioxidant effects of Peppermint (*Mentha piperita*) extract on the oxidative balance of rabbit spermatozoa. Journal of Advanced Agricultural Technologies; 5(2):117-122.

Vahedi, V.; Gharibkhaje V.; Hedayat, N. (2018). Antioxidant effects of peppermint extract on the survival rate of frozen-thawed sperm of Moghani ram. The first national conference on novel ideas in agriculture and natural recourses.

Zanganeh, Z.; Zhandi, M.; Zare-Shahneh, A.; Najafi, A.; Nabi, M.; Mohammadisangcheshme, A. (2013). Does rosemary aqueus extract improve buck semen cryopreservation? Small Ruminant Reserch, 114:120-125.