اثر آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین بر یکپارچگی غشای‌پلاسمایی، زنده‌مانی و جنبایی اسپرم منجمد قوچ قزل

مینا بهنام[۱]، غلامعلی مقدم[۲*]،حسین دقیق کیا[۲]، بابک قاسمی پناهی[۳]، سحر ناطق[۱]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۲۸ تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۰۹/۵۰

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده دانشگاه تبریز

[۲]استاد گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

[۳] استادیار گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبه:Email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: تحقیقات اخیر نشان داده که رادیکال‌های فعال اکسیژنی در تنظیم فعالیت فیزیولوژیک اسپرم نقش دارد. سیلیمارین عصاره گیاه خارمریم است و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی قابلیت مهار تنش اکسیداتیو را دارد. **هدف:** این پژوهش با هدف بررسی اثر سیلیمارین بر ذخیره‌سازی اسپرم قوچ به شکل منجمد انجام شد. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه جمع‌آوری منی از ۴ راس قوچ نژاد قزل استفاده شد. از هر قوچ در ۶ نوبت اسپرم‌گیری صورت گرفت. نمونه منی جمع‌آوری شده بعد ارزیابی اولیه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با رقیق‌کننده‌ی پایه (تریس-سیترات-زرده تخم‌مرغ) مکمل شده با سطوح صفر، ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سیلیمارین رقیق‌سازی شد. خصوصیات کیفی اسپرم شامل زنده‌مانی، جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده و یکپارچگی غشای پلاسمایی (*HOST*) در روزهای صفر، ۱۵ و ۳۰ بعد از انجماد بررسی شد. **نتایج:** یافته‌های آزمایش نشان داد که افزودن سیلیمارین در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی-لیتر به ترتیب با میانگین ۷۴/۴۵ و ۶۷/۳۳ درصد در مقایسه با گروه شاهد (۵۷/۹۵ درصد)، باعث افزایش معنی‌دار جنبایی کلی اسپرم گردید. رقیق‌کننده با غلظت ۵ میکروگرم سیلیمارین با میانگین(۶۸/۰۷ درصد)، باعث افزایش معنی‌دار جنبایی پیش‌رونده اسپرم قوچ پس از یخ‌گشایی در مقایسه با شاهد شد ($p<$ ۰/۰۱). افزودن سطوح سیلیمارین به رقیق-کننده‌ی اسپرم قوچ تاثیر معنی‌داری روی فراسنجه حرکت در جای اسپرم در طول دوره‌ی انجماد نداشت.

نتیجه‌ی نهایی: افزودن سطوح مختلف سیلیمارین به رقیق‌کننده‌ی اسپرم قوچ در طی دوره‌ی نگهداری سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد شد.

واژگان کلیدی: سیلیمارین، آنتی‌اکسیدان، انجماد، اسپرم، قوچ

مقدمه

یکی از بزرگترین چالش‌های موجود در مسیر توسعه تکنیک‌های تولیدمثلی از قبیل تلقیح مصنوعی، آسیب‌های وارده بر اسپرم در طی فرآیند انجماد منی می‌باشد، فرآیند انجماد با تاثیر بر غشای پلاسمایی، اسکلت-سلولی، خصوصیات دینامیکی، هسته و متابولیسم سلول اسپرم، باروری آن را به طور منفی تحت تاثیر قرار می‌دهد. در جریان فرآیند انجماد منی دو اتفاق مهم به وقوع می‌پیوندد: ۱) تولید رادیکال فعال اکسیژنی[۱] (*ROS*) که می‌تواند باعث تغییراتی در بخش‌های کنشی و ساختاری اسپرم شود؛ ۲) تغییر درسامانه آنتی-اکسیدانی اسپرم از جمله کاهش ۷۵ درصد سطح گلوتاتیون(*GSH*) و ۵۰درصدی فعالیت سوپراکسید

[۱]*Reactive Oxygen Species (ROS)*

[2]*Nicotine Amide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase (NADPH)*

دسموتاز (الفتی کرجیو همکاران ۱۳۹۲). در روند ذخیره‌سازی اسپرم، با کمک سرما سرعت متابولیسم سلول و تولید رادیکال‌های فعال اکسیژنی کاهش می‌یابد ولی وقوع پراکسیداسیون چربی‌ها امری اجتناب‌ناپذیر است. نتیجه پراکسیداسیون چربی غشاء، کاهش اسید-های چرب غیراشباع و تولید مالون‌دی‌آلدهید (*MDA*) است. از آنجایی که غلظت‌های بالای اسید چرب غیراشباع برای حفظ سیالیت غشایی وجنبایی اسپرم ضروری است، کاهش جنبایی اسپرم در این شرایط قابل توجیه است (بامبر و همکاران۲۰۰۰). اسپرم پستانداران حاوی مقادیر بالایی از اسید چرب غیراشباع متصل به فسفولیپید است. در این بین، غشای پلاسمایی اسپرم قوچ غنی از اسیدچرب غیراشباع بوده و بنابراین، در مواجه با *ROS*، نسبت به پراکسیداسیون لیپیدی حساس است. در طول فرآیند انجماد، اسپرم دچار شوک سرمایی، آسیب غشایی و تنش اکسیداتیومی‌شود که در نهایت موجب تغییر ساختاری در غشای اسپرم خواهند شد(بلوکی و همکاران ۱۳۹۶). اسپرم‌ها رادیکال-های فعال اکسیژن را از مسیر نیکوتین آمیدآدنین دی نوکلئوتیدفسفات[۲] اکسیداز که در غشای پلاسمایی اسپرم قرار دارد یا از مسیر نیکوتین آمیدآدنین دی-نوکلئوتید وابسته به اکسیدورودکتاز در سطح میتوکندری تولید می کنند. رادیکال هیدروکسیل خطرناک‌ترین رادیکال تولید شده می‌باشد که سبب پراکسیداسیون لیپدها و در نتیجه از بین رفتن فعالیت اسپرم می‌گردد (محمدی و همکاران ۱۳۹۷). انجماد و یخ‌گشایی سبب تغییراتی در حجم آب سلول می‌گردد. اسپرم در مراحل نهایی تمایز، مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را که حاوی آنتی‌اکسیدان‌ها برای مقابله با *ROS* می‌باشد از دست می‌دهد (بوکاک و همکاران ۲۰۰۸). رقیق‌کننده‌های استفاده شده برای نگهداری منی گونه‌های اهلی باید ظرفیت بافری، *pH* ، و اسمولاریته‌ی مناسب برای حفاظت از سلول اسپرم از گزند آسیب انجمادی را داشته باشند (دولتی دورباش و همکاران ۱۳۹۴). افزودن آنتی‌اکسیدان‌های گوناگون به رقیق‌کننده‌ی منی قوچ در طی مدت ذخیره‌سازی اسپرم، جنبایی اسپرم را بهبود می‌بخشد و میزان آسیب سلولی را کاهش داده و سبب بهبود یکپارچگی آکروزوم و افزایش زنده‌مانی و ظرفیت باروری در شرایط لقاح درون آزمایشگاهی می‌گردد (احمدی همدانی و همکاران ۱۳۹۵). سیلیمارین فلاونوئیدی است که به عنوان ماده موثر عصاره گیاه ماریتیغال یا خارمریم *(Silybum marianum)* شناخته شده است و اثرات دارویی متعددی از جمله خاصیت ضدالتهابی و ضدسرطانی دارد (مومنی و همکاران ۱۳۹۴). سیلیمارین فلانوییدی است که به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی تنظیم‌کننده مقدار گلوتاتیون درون‌سلولی و تثبیت‌کننده غشا سلولی مطرح است ساختمان پلی‌فنلی به همراه گروه متوکسی برروی یکی از حلقه‌های فنلی آن خاصیت آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین را افزایش می‌دهد (مومنی و همکاران، ۱۳۹۳). سیلیمارین به عنوان افزودنی طبیعی به رقیق-کننده اسپرم، منی گاو را طی انجماد و سردسازی محافظت می‌کند. سیلیمارین علاوه بر بهبود زنده‌مانی بعد از یخ‌گشایی، درصد اختلالات اسپرم یا اسپرم‌های غیرعادی و درصد سلامت غشای اسپرم و درصد تحرک را بهبود می‌بخشد. کیفیت منی در هر دو حالت سردسازی و انجماد به علت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قوی سیلیمارین بهبود داده شد. سیلیمارین همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز (*SOD*) و گلوتاتیون پراکسیداز را تحریک می‌کند (ال-ششتای و همکاران، ۲۰۱۷). با توجه به تاثیرات مخرب انجماد بر اسپرم، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر سطوح مختلف سیلیمارین بر اسپرم قوچ قزل در طی ذخیره-سازی به شکل منجمد انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش همزمان با فصل تولیدمثل در واحد گوسفندداری ایستگاه تحقیقاتی و پژوهشی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز در انجام پذیرفت. به منظور این آزمایش از ۴ راس قوچ نژادقزل خالص ۳-۲ ساله استفاده شد. برای این منظور، اسپرم‌گیری از هر قوچ شش بار صورت گرفت. قوچ‌ها در یک قسمت سرپوشیده به

صورت دسته جمعی نگه داشته می‌شدند و به آب و غذا و نمک لیسیدنی دسترسی آزاد داشتند. اسپرم‌گیری توسط واژن مصنوعی و هرهفته دوبار از هر قوچ انجام پذیرفت. نمونه‌های اسپرم بلافاصله پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های منی از نظر حجم منی (۰/۷۵ – ۲ میلی‌لیتر)، غلظت، درصد اسپرم ناهنجار و درصد جنبایی پیشرونده ارزیابی شده و تنها نمونه‌هایی با غلظت بالای ۳ میلیارد اسپرم و تحرک پیش‌رونده بالای ۷۰ درصد جهت رقیق‌سازی استفاده شدند. به منظور رقیق‌سازی اسپرم‌ها از رقیق‌کننده بر پایه تریس

[1] *Hypo-osmotic swelling test*

(تریس، اسید سیتریک،فروکتوز)، زرده تخم‌مرغ و گلیسرول استفاده شد(طباطبایی وکیلی و همکاران۱۳۹۶ سالامون و مکسول، ۲۰۰۰). پس از آماده‌سازی رقیق-کننده‌ی پایه (قبل از نمونه‌گیری منی) مقدار دو میلی-لیتراز آن به داخل سه لوله‌ی استریل آزمایشگاهی ریخته شده و به هر لوله براساس نوع گروه‌های آزمایشی آنتی‌اکسیدان اضافه شد. تیمارها شامل گروه *S5* (رقیق‌کننده پایه + ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر سیلیمارین) و گروه *S10* (رقیق‌کننده پایه + ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیلیمارین) وگروه شاهد (رقیق-کننده پایه و بدون افزودن سیلیمارین) بودند.

پس از مخلوط‌سازی آنتی‌اکسیدان‌ها با رقیق‌کننده‌ی پایه، نمونه‌های اسپرم به نسبت(۱ به ۱۰) به داخل هر لوله اضافه گردیده و از هر تیمار تعداد ۶ پایوت ۰/۲۵ میلی‌لیتری(حاوی ۱۱۰ میلیون اسپرم با حرکت پیشرونده) پرشده و به مدت ۱/۵–۲ ساعت در یخچال نگهداری شدند تا به دمای ۵ درجه سلسیوس برسند سپس به مدت ۸–۱۰ دقیقه در ۴ سانتی‌متری بالای ازت مایع قرار گرفتند و در نهایت در داخل ازت مایع غوطه‌ور شدند. به ترتیب در روزهای صفر، ۱۵ و ۳۰ آزمایشی از هر تیمار ۲ پایوت یخ‌گشایی شده و مورد ارزیابی گرفتند. صفات مورد ارزیابی شامل درصد اسپرم‌های جنبا و جنبایی پیشرونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها (HOST[1])در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی‌های بعد از یخ‌گشایی:

جنبایی پیش رونده اسپرم

برای اندازه‌گیری جنبایی پیشرونده اسپرم پس از یخ-گشایی، نمونه‌ها با سیترات سدیم ۲/۹ درصد به میزان ۱ به ۱۰۰ رقیق شدند. سپس یک قطره از آن را روی لام گذاشته و با بزرگنمایی ۴۰۰ با میکروسکوپ نوری بررسی شد . تعداد کل اسپرم*ها* و تعداد اسپرم‌های با جنبایی پیش رونده شمارش شده وسپس درصد اسپرم‌های جنبا محاسبه گردید. ((ساویوژان و همکاران ۲۰۰۹)، احمدی همدانی و همکاران، ۱۳۹۳).

ارزیابی زنده مانی و اسپرم های غیرطبیعی:

برای ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده و مرده و همین طور اسپرم‌های غیرطبیعی از رنگ آمیزی ائوزین–نیگروزین استفاده شد. برای این منظور یک قطره از رنگ ائوزین–نیگروزین که قبلا به دمای ۳۸ درجه سلسیوس رسیده بود روی لام ۳۸ درجه گذاشته شد و سپس۱۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده ی اسپرم با سیترات سدیم ۲/۹ درصد با نسبت ۱ به ۱۰۰ به آن اضافه شد. شمارش اسپرم‌ها در ۵ ناحیه شان میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۴۰۰ انجام گرفت. اسپرم‌هایی که رنگ را جذب نکرده و سر سفید داشتند زنده و اسپرم‌هایی که رنگ جذب کرده و دارای سر صورتی بودند مرده تلقی شدند. اسپرم‌های غیر طبیعی(بدون دم، دم غیر طبیعی، سر غیر نرمال) نیز با استفاده از همین اسلاید شمارش شدند(ضمیری ۱۳۹۱مکسول و ایوانس، ۱۹۸۷).

آزمایش سلامت غشای اسپرم:

برای تعیین سلامت و یکپارچگی غشای اسپرم از محلول آزمون (HOST) استفاده گردید.بدین صورت که ۱۰میکرولیتر از اسپرم با ۱۰۰ میکرولیتر محلول هاست رقیق شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۸ درجه سلسیوس انکوباسیون شد. گسترش‌ها با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ مطالعه گردید و درصد اسپرم‌های سالم به دست آمد. اسپرم‌هایی که دارای غشای سالم هستند به هنگام قرار گرفتن در محیط با فشار اسمزی پایین آب جذب نموده و متورم می‌شوند.

در این آزمایش، محلول هیپواسمول از غشای پلاسمایی اسپرم عبور کرده و سلول سعی می کند تا توازنی بین فضای داخلی و خارجی برقرار کند. بنابراین دم اسپرم-هایی که غشای پلاسمایی سالم و فعال دارند متورم شده و در نتیجه به آنها هاست مثبت اطلاق می‌شود ولی اسپرم‌هایی که غشای ناسالم دارند متورم نشده دمشان حالت مستقیم دارد که به آنها هاست منفی اطلاق می‌شود.

آنالیز داده‌ها

داده‌های به دست آمده از پژوهش حاضر، توسط مدل خطی مختلط با استفاده از مدل *Proc mixed* و رویه *GLM* و توسط نرم افزار *SAS* انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش مقایسه میانگین حداقل مربعات (*LSM*) و روش توکی-کرامر انجام شد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p<۰/۰۱$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. مدل آماری مورد استفاده به شرح زیر می باشد:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + Ram_j + Time_k + e_{ijk}$$

y_{ijk} = صفت مورد مطالعه، μ = میانگین کل، T_i = اثرتیمار، Ram_j = اثرتصادفی قوچ، $Time_k$ = اثر ثابت زمان، e_{ijk} = اثر خطای آزمایشی

نتایج و بحث

با توجه به جدول۱ مشاهده می‌شود که رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح مختلف سیلیمارین نسبت به گروه شاهد به طور معنی داری باعث تغییر صفات جنبایی کلی و جنبایی پیشرونده و زنده مانی اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی شدند؛ به طوری که بین غلظت‌های مختلف سیلیمارین به ترتیب تیمارهای ۵ و ۱۰ میکروگرم با میانگین ۷۴/۴۵ و ۶۷/۳۳ درصد، در مقایسه با گروه کنترل باعث افزایش معنی‌دار جنبایی کلی اسپرم و با میانگین ۶۸/۰۷ و ۶۰/۹۵ درصد باعث افزایش معنی دار تحرک پیش رونده اسپرم منجمد قوچ پس از یخ گشایی شدند ($P <۰/۰۱$).

با توجه به نتایج به دست آمده از تست هاست مشاهده شد (جدول ۲) که رقیق کننده‌های حاوی سطوح ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سیلیمارین باعث افزایش معنی-دار یکپارچگی غشای اسپرم پس از یخ‌گشایی در مقایسه با گروه شاهد شدند ($P <۰/۰۱$). بنا به نتایج حاصل از پژوهش مومنی و همکاران (۱۳۹۴)، استفاده از سیلیمارین (۰/۵ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) به طور معنی‌دار باعث افزایش یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم نسبت به گروه شاهد شد. همچنین طبق نتایج ضیائی‌راد و همکاران (۱۳۹۵) استفاده از سیلیمارین در سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر سبب افزایش یکپارچگی غشای پلاسمایی شد احتمالا افرایش یکپارچگی غشا به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین باشد. سیلیمارین از طریق کاهش رادیکال-های آزاد اکسیژن سبب بهبود غشای سلولهای شش انسان می‌شود. به علاوه سیلیمارین با افزایش فعالیت آنزیم پراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در گلبول‌های قرمز، آثار آنتی‌اکسیدانی خود را تشدید می-کند و سبب پایداری غشای سلول می‌شود.

تحقیقات نشان می‌دهد که تاثیر افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها در طی انجماد اسپرم وابسته به غلظت آن‌ها می‌باشد. انجماد اسپرم با ایجاد شوک سرمایی باعث کاهش جنبایی اسپرم،یکپارچگی غشا آکروزوم و عملکرد میتوکندری می شود . محافظت از غشای پلاسمایی اسپرم در مقابل واکنش‌های اکسیداتیو در طی انجماد توسط آنتی‌اکسیدان‌ها انجام میشود(نظم بجنوردی و همکاران ۱۳۸۷). رادیکال‌های آزاد عمدتا توسط سامانه آنتی‌اکسیدانی حذف می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در مهار رادیکال‌های آزاد دارند. در صورت آسیب یا فقدان این سامانه، پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم منجر به آسیب ساختاری و عملکردی به سلول می‌شود(دولتی دورباش و همکاران ۱۳۹۴).

پژوهش‌های متعددی در ارتباط با اثرات آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین بر فرآیند سردسازی در گونه‌های مختلف پستانداران و خروس انجام شده است (پریسوژ ۱۳۹۲ و ضیائی راد و همکاران ۱۳۹۵). با این حال برای اولین بار انجماد اسپرم قوچ مبنی بر افزودن سیلیمارین به رقیق کننده اسپرم قوچ انجام شد.

در این آزمایش سیلیمارین باعث افزایش درصد جنبایی اسپرم‌ها شد که با نتایج پژوهش های قبلی بر روی خروس (ضیائی راد و همکاران ۱۳۹۵) قوچ (مومنی و همکاران ۱۳۹۳ و پریسوژ و همکاران ۱۳۹۲) و گاو (ال-ششتاوی و همکاران ۲۰۱۷) مطابقت داشت.

Table 1- The effects of different treatments on evaluated traits after thawing

Traits	Control	Silymarin 5 (µg/ml)	Silymarin 10 (µg/ml)
Total Movement (%)	$58.95^{c} \pm 0.79$	$74.45^{a} \pm 0.79$	$67.33^{b} \pm 0.79$
No progressive (%)	5.92 ± 0.92	6.38 ± 0.92	8.31 ± 0.92
Progressive Movement (%)	$53.69^{c} \pm 0.82$	$68.07^{a} \pm 0.82$	$60.95^{b} \pm 0.82$
Viability (%)	$62.84^{c} \pm 0.73$	$78.30^{a} \pm 0.73$	$71.26^{b} \pm 0.73$
HOST (%)	$54.73^{c} \pm 0.72$	$70^{a} \pm 0.72$	$62.98^{b} \pm 0.72$

Unlike Latin alphabets in the row indicates a significant difference at the probability level of one percent ($P<0.01$).

Table 2- The effects of different treatments on evaluated traits after freezing

Traits	**Storage time (Day)**		
	0	**15**	**30**
Total Movement (%)	$75.01^{a} \pm 0.79$	$67.18^{b} \pm 0.79$	$58.55^{c} \pm 0.79$
Progressive Movement (%)	$82.41^{a} \pm 0.82$	$61.10^{b} \pm 0.82$	$53.20^{c} \pm 0.82$
Viability (%)	$78.70^{a} \pm 0.73$	$71.02^{b} \pm 0.73$	$62.68^{c} \pm 0.73$
HOST (%)	$70.43^{a} \pm 0.72$	$62.76^{b} \pm 0.72$	$54.15^{c} \pm 0.72$

Unlike Latin alphabets in the row indicates a significant difference at the probability level of one percent ($P<0.01$).

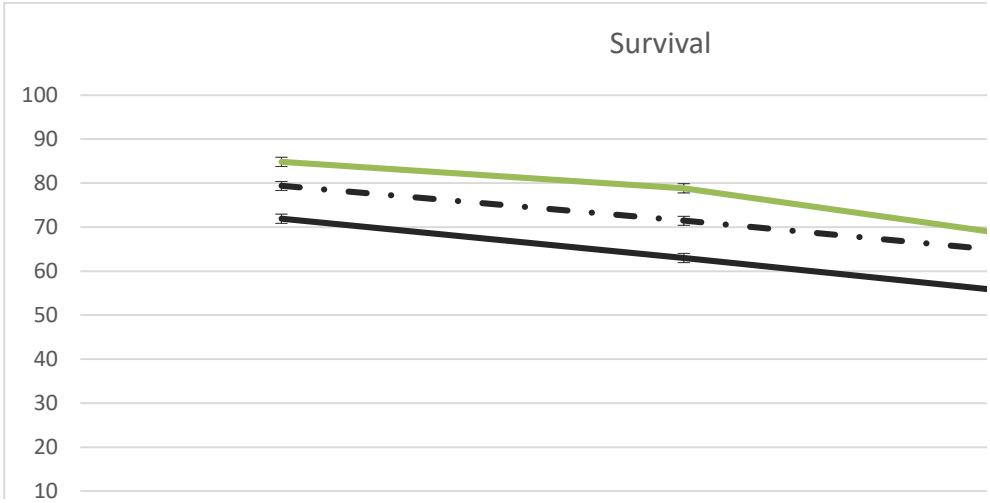

Figure 1: Evaluation of the interaction of time treatment on the survival of frozen ram sperm

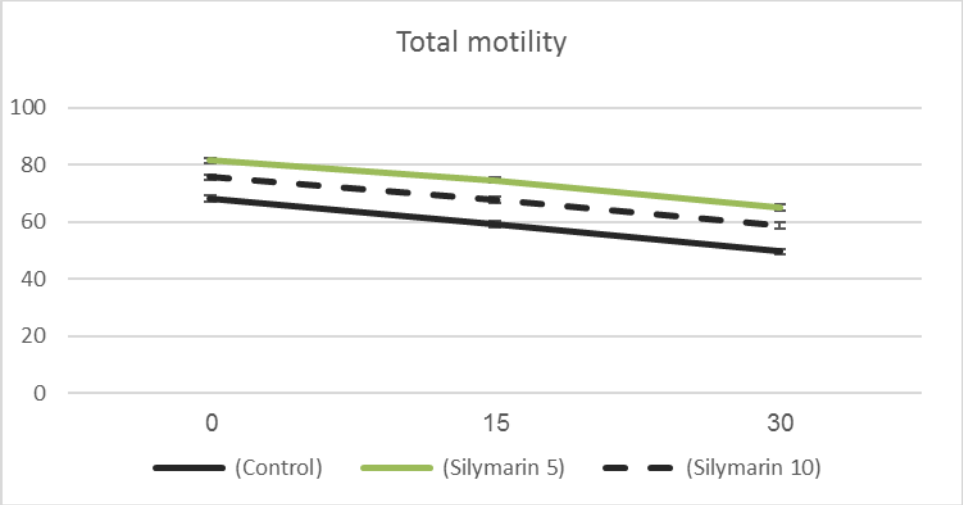

Figure 2: Study of the interaction effect of treatment on time on the total motility of frozen ram sperm

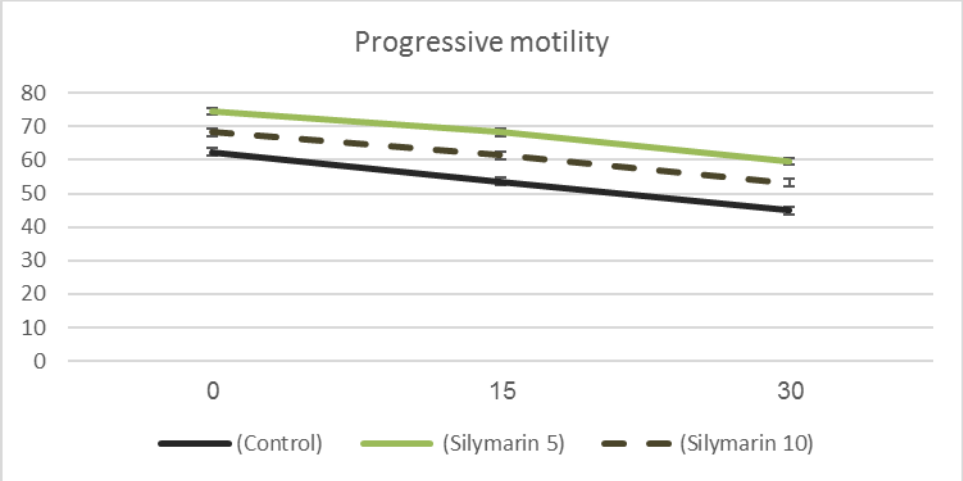

Figure 3: Interaction of the treatment in time with progressive motility of frozen ram sperm

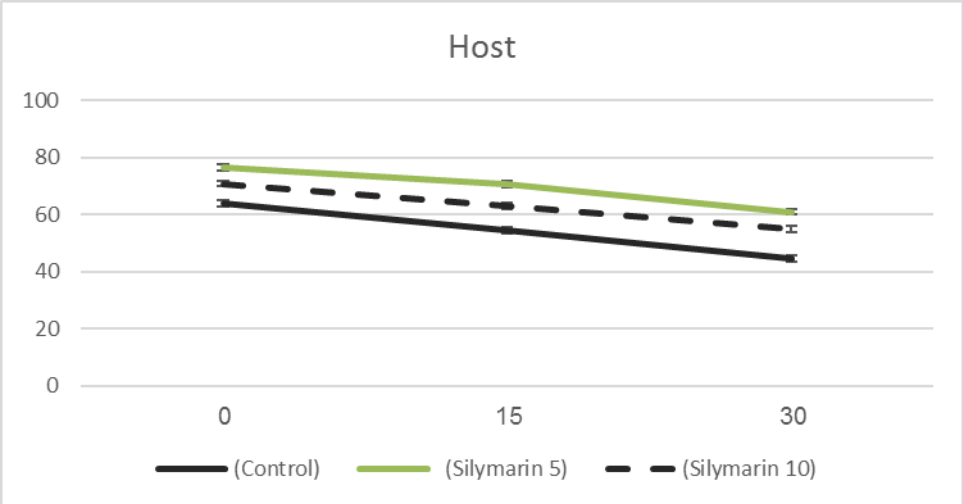

Figure 4: Interaction of treatment at time Effects on the Host Test of Frozen Ram Sperm

طبق نتایج به دست آمده، افزودن ۵ میکروگرم سیلیمارین در رقیق کننده بر پایه تریس بهترین پاسخ را در فرآیند انجماد-ذوب اسپرم قوچ بر روی فراسنجه-های مورد بررسی ایجاد نمود. همچنین افزودن ۱۰ میکروگرم سیلیمارین به رقیق کننده اسپرم قوچ باعث بهبود جنبایی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشا پس از یخ گشایی نسبت به گروه شاهد شد ($p<$ ۰/۰۱).

گزارش شده است که سیلیمارین سبب بهبود جنبایی، زنده‌مانی اسپرم، ناهنجاری اسپرم وحفظ یکپارچگی غشای اسپرم بعد از انجماد-یخ‌گشایی می‌شود. بهبود کیفیت منی در هر دو حالت انجماد و سردسازی به علت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قوی سیلیمارین است (فاکورزی و همکاران ۲۰۰۸ و لانگپایروم و همکاران ۲۰۱۳). حفاظت سلولی سیلیمارین وابسته به خواص آنتی‌اکسیدانی و جاروکردن رادیکال آزاد آن می‌باشد و می‌تواند به طور مستقیم با اجزای سلولی واکنش داده و سیالیت طبیعی غشا گردد (مومنی و همکاران ۱۳۹۳).

نتایج بررسی اثر متقابل تیمار در زمان بر زنده‌مانی، جنبایی کل و جنبایی پیشرونده اسپرم منجمد قوچ در شکل‌های۱،۲و۳ گزارش شده است. قابلیت زنده‌مانی اسپرم‌های رقیق شده با۵ و ۱۰ میکروگرم سیلیمارین به ترتیب در روز ۱۵(۷۸/۸۳ و ۷۱/۴۵) بیشتر از روز۳۰(۶۵/۹۱ و ۶۲/۹۵) نسبت به گروه شاهد را نشان می دهد ($p<0/01$) که با نتایج (ضیائی راد وهمکاران ۱۳۹۵ و چوینه و همکاران ۱۳۹۵) مطابقت دارد. زمان اثر منفی بر قابلیت زنده مانی اسپرم ها می گذارد.

نتایج بررسی اثر متقابل تیمار بر زمان بر حرکت کل و حرکت پیش رونده اسپرم منجمد قوچ به ترتیب سطح ۵ و ۱۰ میکروگرم به صورت نمودار ۵ و ۴ ارائه شده است، افزودن رقیق کننده های سیلیمارین به اسپرم قوچ با عث افزایش جنبایی کل و پیشرونده اسپرم در دو بازه زمانی ۱۵ و ۳۰ نسبت به گروه شاهد شد. میانگین درصد حرکت کل رقیق کننده‌های حاوی سطوح ۵ و ۱۰ میکروگرم سیلیمارین در روز ۱۵ (۷۴/۵۸ و ۶۵) و روز و ۳۰ (۶۷/۷۰ و ۵۸/۷۵) شد و حرکت پیشرونده در روز ۱۵ (۶۸/۲۸ و ۵۹/۵۸) و روز ۳۰ (۶۱/۴۰ و ۵۳/۱۸) شد که نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌دار بود ($p<0/01$) که با نتایج چوینه و همکاران (۱۳۹۵) همخوانی داشت.

نتایج بررسی اثر متقابل تیمار در زمان بر سلامت و یکپارچگی غشا (هاست) اسپرم منجمد قوچ در شکل۴ ارائه شده است. بیشترین درصد سلامت غشا مربوط به سطح ۵ میکروگرم سیلیمارین کمترین درصد سلامت غشا مربوط به گروه شاهد می باشد که با نتایج حاصله از پژوهش ضیائی راد و همکاران (۱۳۹۵) همخوانی داشت ($p<0/01$). سیلیمارین به دلیل ماهیت چربی دوست خود به طور محکم با ترکیبات غشای پلاسمایی متصل می‌شود و بدین ترتیب با افزایش استحکام غشایی، از شکستگی و از هم‌گسیختگی آن جلوگیری می‌کند (ضیائی‌راد وهمکاران ۱۳۹۵). از بین رفتن سیالیت غشا و فعالیت سلول به سبب پراکسیداسیون لیپیدی غشا پلاسمایی اسپرم، دلیلی بر از بین رفتن فعالیت غشایی اسپرم است (آیتکین و همکاران ۲۰۰۳).

نتیجه گیری:

افزودن میزان ۵ میکروگرم سیلیمارین به منی رقیق شده قوچ موجب کاهش پراکسیداسیون چربی و همچنین سبب حفظ ساختار و عملکرد اسپرم طی روند ذخیره سازی می‌شود.

منابع مورد استفاده

Ahmadi Hamedani M, Jafari Ahangari Y and Zerehdaran S, 1393. Effect of Different Levels of Egg Yolk on Tris Dilution in Sperm Cow's Rat Quality in Cooling and Freezing Conditions. Animal Production Research5:10.

Ahmadi Hamedani M, Tahmasebi A, Nasserian A and Jafari Bohrani, 1395. Effect of vitamin B12 in Tris based diluent on the protection of sperm rams. Journal of Research in Ruminants 4: 3.

Ahmadi Hamedani M, Jafari Ahangari Y and Zerehdaran S, 1393. Effect of different levels of egg yolk on Thrissur diluent on sperm quality of Zelm ram under cold and freezing conditions. Animal Production Research 5:10.

Aitken J and Fisher H, 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. Bioassays16: 259-267.
Alfati Karjei R, Daghigh kia H, Moghadam Gh, Hossein Khani A and Alijani S, 2013. Effect of Different Levels of Glutathione and Superoxide Dismutase on Some Characteristics of Cow's Sperm after Freezing. Journal of Animal and Poultry Research 1(4): 1-7.
Bailey JL, Bilodeau JF, and Cormier N, 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. Journal of Andrology 21: 1-7.
Bakhshayesh Khiabani Moghaddam G and Daghigh Kia H, 2017. Effects of adding different levels of Glutamine to modified Beltsville extender on the survival of frozen rooster semen. Animal Reproduction Science 184: 172–177.
Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V and Morel MCG, 2000.The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid–peroxidation. Journal of Andrology 21: 895-902.
Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA and Gagnon C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Molecular Reproduction and Development55:282–288.
Blocki Z and Daghigh kia H, 2017.Improvement of ram semen quality after the freezing- thawing process using various levels of coenzyme Q10. Journal of Animal Production 19(3): 727-738.
Chatterjee S, Lamirande E and Gagnon C, 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. Molecular Reproduction and Development 60: 498–506.
Dolati Durbash P, Moghaddam G, Daghigh kia H, Taghizadeh A and Rafat A, 1394. The Effect of Different Use of Rafinose Sugar in the Maintenance of Frozen Sperm of Different Breeds of Rams in the Reproductive Period, Journal of Animal Science Research 25: 2.
El Sheshtawy R, and El-Natta W, 2017. Impact of silymarin enriched semen extender on bull sperm preservability. Asian Pacific Journal of Reproduction 6(2): 81-84.
Evans G and Maxwell W.M.C, 1987. Handling and examination semen. In: Maxwell WMC, editor. Salamons artificial insemination of sheep and goat. Sydney: Butterworths 93-106.
Fakurazi S, Nanthini U and Hairusah I,2008.Hepatoprotective and antioxidant action of Moringa oleifera Lam.against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats.International journal of pharmacology.4(4):270-275.
Khorram Abadi F, Khodaee Motlagh M. and Moradi M., 1396, investigating the addition of selenium nanoparticles in semen diluent in the laboratory on sperm parameters after freezing ram Farahani, Journal of Zoology Research 30: 3.
Kvasnicka f, Biba B, sevcik R, Voldrich M and Karta J, 2003. Analysis of the active components of silymarin. Journal of Chromatography A, 990: 239–245
Luangpiromn A, Junaimuang T, Kourchampa W, Somsapt P and Sritragoo O, 2013. Protective effect of pomegranate (Punica granatum Linn.) juice against hepatotoxicity and testicular toxicity induced by ethanol in mice. Animal Biology and Animal Husbandry 5(1).
Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD and Rodrigues JL, 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. Theriogenology 57(1): 327-344.
Mohammadi N, Moghadam Gh, Daghigh kia H, Javanmard A, 2017. Protecting mitochondrial function during the process of freezing of sperm. Age of Life Publishing.
Momeni H , Sepehri H and Yousefi M, 1393. The effect of silymarin on plasma membranes and acrosome of treated sperm with aluminum chloride. Journal of Arak University of Medical Sciences 18(4): 80-71.
Momeni H., Sepehri H andYousefi M. 2015. The effect of silymarin on plasma membrane and acrosome of aluminum chloride treated sperm, Journal of Arak University of Medical Sciences 4:71-80.
Momeni H., Khavari A, Khodaei motlaq M, Chobinh T and Eskandari N,1393. The role of Silymarin on survival, mobility and integrity of cadmium chlorid treated sperm acrosomes, Journal of Iranian Journal of Animal Science 24:4.
Parisuj p, 1392. Effect of different amounts of silymarin and caproic acid on storage of ram sperm at 5 ° C. End of letter. Gilan University.
Salamon S and Maxwell W.M.C, 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science, 62(1):77-111.

Sariozhan S, Bucack MN, Purhan BT, Pinnar AU and Ali B, 2009. The influence of cysteine and taurine on microscopic oxidative stress paramerters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. Cryobiology, 58(2): 134-138.
Tabatabaei Vakili S, Zaidi Z, Mamoli M and Mirzadeh Kh, 2017. Investigating of different levels of glutamine aminoasid on the quality of Arabic ram semen in different storage times to 5° C. Journal of Animal Sciences 115: 233-242.
Wellington K and Jarvis B, 2001. Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. BioDrugs Journal, 15(7): 465-489.
Zamiri m, 2012. Reproductive physiology.Third edition, Haghshenas Publishing.
Ziaei Rad H, Roostaee Ali Mehr M and Mohammadi M, 1395. The effect of silymarin on cervical semen storage at 4 ° C. Journal of Animal Science Research 3: 26.

Effect of silymarin antioxidant on the membrane integrity, viability and motility of ram frozen sperm

M Behnam[1], Gh Moghaddam[2*], H Daghigh kia[2], B Ghasemi Panahi3 and S Nateq[1]

Received: January 01, 2019 Accepted: November 26, 2019
[1]MCs Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3] assistant professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Introduction: The need for artificial insemination in the ewe is to access fresh and frozen sperm. Cryopreservation is a suitable method for long-term storage of semen and sperm, but may cause a minor irreversible damage to the sperm cell, especially its membrane region (Khorramabadi et al 2017). The oxidation of fatty acids leads to the production of free oxygen radicals (ROS). These radicals are necessary in normal conditions for certain physiological activities and sperm processes, but excessive production of ROS in the sperm can reduce membrane fluidity, DNA fracture, damage to proteins, and ultimately reduced sperm motility and fertility. (Bakhshayesh et al 2017). Silymarin, the scientific name of Silbum marianum, is the English name Milk Thistle and is a potent inhibitor of oxidative stress as a potent antioxidant. Due to the nature of its friend fat, silymarin is firmly attached to the plasmid membrane compounds, thus preventing fracture and its collapse by increasing membrane strength. Increasing the amount of active oxygen species and lipid peroxidation disrupts mitochondrial membrane, decreases ATP and damage to sperm acesomes, which ultimately reduces the progression of sperm motility. (Kvasnikova et al 2003). The mechanism of action of salimarin is through stimulation of the ribosomal RNA and protects the membrane from oxidative damage. They also stated that silymarin stimulates the activity of the antioxidant enzymes of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (Wellington and Jarvis 2001). Silymarin improves the sperm motility and survival, sperm abnormalities, and preservation of the sperm membrane after freezing-thawing. Improvement of semen quality in both freezing and cooling is due to the strong silicomain antioxidant capacity (Fakorzai et al 2008; Longpyram et al 2013). Objective: Regarding the anti-oxidant effects of silymarin, this study aimed to investigate the effect of silymarin on storage of ram sperm.

Materials and methods: In this research, four rams of pure ghee were used 2-3 years old and each ram was 6 times sperm. Sperm was performed twice a week by artificial vagina. After the sample was transferred to the laboratory, a series of preliminary evaluations including sample size, sample color, wave motion, total mobility, in-situ motion, progressive motion and live weight, and abnormal sperm and density were performed. If standards were met, Necessary (scaling over 2.5 billion sperm and progressive movement above 70%) dilution was performed with treatments. The diluents were prepared prior to sampling and placed in a bin Marie temperature of 37 ° C. Tris-based diluent was used to contain 2.73 g of tries, 1.4 g of fructose, 1 g of citric acid and 100 mg streptomycin in 100 ml sterile distilled water. To prepare the diluent, 73% of the prepared solution will be mixed with 20% egg yolk and 7% glycerol. In order to dilute the sprays from trace based diluent, egg yolk, semen collected with diluent without antioxidants (control) and silymarin 5 and 10 µg / ml mix After cooling for 90 minutes in the refrigerator and reaching 5 ° C, it was placed in 4 cm above the liquid nitrogen for 8-10 minutes and then immersed in liquid nitrogen. The post-mortem examinations of sperm quality properties included liveliness, total motion, progressive motion, integrity of the plasma membrane (tests) on days 0, 15, 30 of the experiment.

Results: According to the results of the experiment, the diluents containing the levels of silymarin significantly increased the total motion, progressive, live survival of ram sperm after the freeze-

thawing process compared to the control group Were opened. Addition of different concentrations of silymarin was 5 and 10 µg with mean of 74.45% and 67.33%, respectively, compared to the control group, significantly increased the total sperm motility with mean of 68.07 and 60.95%, significantly Progressive motility of frozen ram sperm were frozen ($p < 0.01$). According to the results, the in situ movement in the control group (5.92 ± 0.92) was lower than that of the 5 and 10 µg silymarin (6.38 ± 0.92) and (8.9 ± 0.92) respectively In the least amount.
Conclusion: Application of silymarin as an antioxidant in the ram sperm diluent system reduces oxidative damage and improves sperm quality properties such as mobility, viability and the health of acrosome and plasma membrane during freezing process. Was opened. Adding 5 µg of silymarin to diluted ram minus 10 µg and control group reduced fat peroxidation and also improved the structure and performance of sperm during storage.

Keywords: Silymarin, Antioxidant, Freezing, Sperm, Ram