

تأثیر عصاره متانولی گرده زنبورعسل بر کیفیت اسپرم قوچ طی نگهداری کوتاه‌مدت و بلندمدت

چکیده:

این پژوهش با هدف بررسی اثر افزودن عصاره متانولی گرده زنبورعسل به رقیق‌کننده تریس-زرد تخم‌مرغ بر کیفیت اسپرم قوچ‌های نژاد زل در شرایط نگهداری کوتاه‌مدت و پس از انجماد انجام شد. اسپرم‌گیری دو بار در هفته از چهار قوچ بالغ نژاد زل با استفاده از واژن مصنوعی صورت گرفت. پس از ارزیابی اولیه، انزال‌های واجد شرایط برای حذف تأثیرات فردی با هم مخلوط شدند. نمونه‌ها با رقیق‌کننده‌هایی حاوی صفر (گروه شاهد)، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی گرده زنبورعسل رقیق شدند. همچنین، ویتامین E با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار به‌عنوان کنترل مثبت و ۵ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان حلال عصاره استفاده شد که اثر آن نیز به‌صورت جداگانه بررسی گردید. نگهداری کوتاه‌مدت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. نمونه‌های منجمد شده نیز ۱۴ روز پس از نگهداری در ازلت مایع مورد ارزیابی قرار گرفتند. فراسنجه‌های جنبایی، زنده‌مانی، فعالیت غشای پلاسمایی، فعالیت میتوکندری، ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی و پراکسیداسیون لیپیدی غلظت (MDA) اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که افزودن عصاره گرده زنبورعسل به‌طور معناداری ($P < 0.05$) شاخص‌های ارزیابی شده را نسبت به گروه شاهد بهبود بخشید. تیمار ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بهترین نتایج را در نگهداری کوتاه‌مدت و تیمار ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین تأثیر را پس از یخ‌گشایی نشان داد. همچنین، غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در کاهش تنش اکسیداتیو از طریق کاهش سطح MDA مؤثرتر بود. بر اساس نتایج، استفاده از ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی گرده زنبورعسل در رقیق‌کننده منی به‌عنوان راهکاری مؤثر برای بهبود کیفیت اسپرم قوچ پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: اسپرم قوچ، انجماد، تنش اکسیداتیو، فلاونوئیدها، گرده زنبورعسل

Impact of Methanolic Bee Pollen Extract on Ram Sperm Quality in Short- and Long-Term Storage

Abstract

This study evaluated the effect of supplementing a Tris-egg yolk-based extender with methanolic bee pollen extract on the sperm quality of Zel rams during short-term storage and after cryopreservation. Semen was collected twice a week from four mature Zel rams using an artificial vagina. After initial evaluation, qualified ejaculates were pooled to eliminate individual variation. Samples were diluted with extenders containing 0 (control), 5, 10, and 15 mg/mL of methanolic bee pollen extract. Additionally, 0.1 mM vitamin E was used as a positive control, and 5 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added as the solvent for the extract, whose effect was also evaluated. Short-term storage was carried out at 4°C for 5, 24, 48, and 72 hours. Cryopreserved samples were assessed 14 days after storage in liquid nitrogen. Sperm parameters were evaluated, including motility, viability, plasma membrane integrity, mitochondrial activity, morphological abnormalities, and lipid peroxidation (MDA levels). Results showed that supplementation with bee pollen extract significantly ($P < 0.05$) improved all evaluated parameters compared to the control. The 5 mg/mL treatment yielded the best outcomes during short-term storage, while 15 mg/mL was most effective after thawing. Moreover, the 5 mg/mL concentration was superior in reducing oxidative stress by lowering MDA levels. These findings suggest that adding 5 mg/mL methanolic bee pollen extract to the extender improves ram sperm quality and may be an effective strategy for semen preservation.

KEYWORDS: Bee pollen, Cryopreservation, Flavonoids, Oxidative stress, Ram sperm

مقدمه

دسترسی به اسپرم بارور، یکی از عوامل تعیین کننده در ارتقاء کارایی و موفقیت تلقیح مصنوعی به شمار می رود (Watson, 2000). مهم ترین چالش در فرایند ذخیره سازی اسپرم، مهار فعالیت متابولیکی آن است که این هدف از طریق کاهش تدریجی دما در دو مرحله سردسازی و انجماد محقق می شود (Salamon & Maxwell, 1995). اسپرم قوچ به دلیل ویژگی های خاص ساختاری غشای پلاسمایی خود، که حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع ($PUFA^1$) و نسبت پایینی از کلسترول به فسفولیپید است، در مقایسه با اسپرم سایر گونه ها، حساسیت بیشتری نسبت به کاهش دما نشان می دهد و مستعد آسیب های ناشی از تنش اکسیداتیو می باشد (Salamon & Maxwell, 1995). شوک سرمایی با ایجاد تغییرات ساختاری در غشای پلاسمایی، آکروزوم و میتوکندری اسپرم، می تواند منجر به کاهش طول عمر و قابلیت باروری آن گردد (Watson, 1995). اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در مایع منی طی دوره نگهداری دچار اکسیداسیون می شوند و با تسریع فرایند پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب های اکسیداتیو را افزایش می دهند (Sinha et al., 1996). علی رغم وجود مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدانی در سلول های اسپرم، شامل آنزیم های آنتی اکسیدانی (Henkel, 2011)، به دلیل ساختار ویژه این سلول ها و همچنین فرایندهای بلوغ، رقیق سازی و نگهداری، ذخایر آنتی اکسیدانی موجود در پلاسمای منی کاهش می یابد و توان محافظت کامل از سلول اسپرم را از دست می دهد (Amidi et al., 2016). آسیب های ناشی از شوک سرمایی تا حدودی از طریق استفاده از مواد محافظ سرما و افزودنی های دارای خاصیت آنتی اکسیدانی در رقیق کننده های منی کاهش می یابد (Allai et al., 2018). مطالعات متعدد نشان داده اند که مکمل سازی محیط انجمادی با آنتی اکسیدان های خارجی می تواند به بهینه سازی فرایند انجماد و افزایش بقای اسپرم کمک کند (Agarwal et al., 2014).

در این راستا، استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی به ویژه منابع گیاهی، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است (Yanishlieva & Marinova, 1996). گرده زنبور عسل یکی از مواد طبیعی بسیار مغذی است که دارای ترکیب های زیستی ارزشمندی از جمله فنل ها و فلاونوئیدها است (Haydak, 1970). خواص ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد جهش زایی، ضد التهابی و آنتی اکسیدانی گرده زنبور عسل در مطالعات متعددی مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است (Rodríguez-Pólit et al., 2023). همچنین، فعالیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی آن به محتوای بالای ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی نسبت داده شده است (Leja et al., 2009; Xu et al., 2009). از این رو، به نظر می رسد که ویژگی های آنتی اکسیدانی فلاونوئیدهای موجود در گرده زنبور عسل می تواند در بهبود کیفیت اسپرم قوچ در طی دوره های مختلف نگهداری مؤثر باشد.

هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر غلظت های مختلف عصاره متانولی گرده زنبور عسل در محیط رقیق کننده اسپرم بر حفظ فراسنجه های کیفی اسپرم قوچ زل طی ذخیره سازی کوتاه مدت (در دمای ۴ درجه سانتی گراد) و پس از انجماد-یخ گشایی (در دمای ۱۹۶- درجه سانتی گراد در نیتروژن مایع) است.

پیشینه پژوهش:

سلول اسپرم، همانند دیگر سلول هایی که در شرایط هوای زیست می کنند، برای زنده ماندن و ادامه فعالیت خود به اکسیژن نیاز دارد. با این حال، فراورده های حاصل از مصرف اکسیژن، به ویژه گونه های فعال اکسیژن، می توانند برای سلول زیان آور باشند. بنابراین، این ترکیب های ناپایدار باید به صورت پیوسته و مؤثر توسط سامانه های آنتی اکسیدانی خنثی شوند تا تنها مقدار اندکی از آن ها که برای کارکرد طبیعی سلول ضروری است، در محیط باقی بماند (Fry & Peterson, 2001). افزایش بیش از حد گونه های فعال اکسیژن در اسپرم، به ویژه در زمان نگهداری در دمای پایین، می تواند به آسیب های جدی ساختاری و کارکردی منجر شود. از این رو، پژوهش هایی بر افزودن پانتی اکسیدان ها به محلول های رقیق کننده منی متمرکز شده اند تا با کاهش انباشت گونه های فعال اکسیژن، بتوانند تحرک اسپرم و توانایی آن در لقاح را بهبود بخشند (Maxwell & Salamon, 1993). امروزه ترکیب های طبیعی آنتی اکسیدان به عنوان جایگزینی چندمنظوره برای ترکیب های شیمیایی و ساخته شده در آزمایشگاه در نظر گرفته می شوند (Wang et al., 2008). یکی از منابع طبیعی مهم در این زمینه، گرده زنبور عسل است که به دلیل دارا بودن انواع ترکیب های زیست فعال، از جمله فنول ها، فلاونوئیدها و اسیدهای

¹ Polyunsaturated fatty acids

چرب، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. برای نمونه، در مطالعه‌ای روی پرندگان، افزودن ۲۰ و ۳۰ گرم گرده زنبورعسل به جیره غذایی بلدرچین‌های نر با تراکم ۲۱ قطعه در هر مترمربع، موجب افزایش سطح تستوسترون و بهبود شاخص‌های تولیدمثلی از جمله وزن بدن، زنده‌مانی اسپرم و کاهش آثار منفی تراکم بالا شد. این نتایج نشان‌دهنده تأثیر ترکیبات زیست‌فعال گرده بر عملکرد تولیدمثل در گونه‌های نر است (Yonis & Hassan, 2023).

ترکیب‌های فنولیک و فلاونوئیدها، از طریق گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل خود، با یون‌های فلزی ناپایدار مانند آهن و مس پیوند برقرار کرده و با تشکیل ساختارهای پایدار، از ادامه تولید گونه‌های فعال اکسیژن جلوگیری می‌کنند (Wojdyło et al., 2007). گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار فلاونوئیدها، قادرند به‌عنوان دهنده پیوند هیدروژنی عمل کرده و با مولکول‌های گوناگون پیوند برقرار کنند (Chen et al., 2012). افزون بر این، فلاونوئیدها با افزایش کارایی اندامک‌های تولیدکننده انرژی مانند میتوکندری، فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تحریک سنتز پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانی و ساختاری مؤثر بر پایداری غشای اسپرم، نقش مؤثری در بهبود کیفیت اسپرم ایفا می‌کنند (Mohammad et al., 2020). برخی از آن‌ها حتی در تنظیم غلظت یون‌های کلیدی مؤثر بر پایداری اسپرم در زمان نگهداری و یخ‌گشایی نقش دارند (Shahin et al., 2020).

در آنالیز GC-MS عصاره گرده زنبورعسل مورد استفاده در این مطالعه، حضور انواع اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، از جمله اسید پالمیتیک، تأیید شد. این ترکیبات به‌عنوان اجزای ساختاری غشای پلاسمایی اسپرم شناخته می‌شوند و در حفظ سیالیت غشا، پایداری ساختاری و تحمل اسپرم در برابر تنش‌های دمایی نقش دارند (Silva & Gadella, 2006). اسیدهای چرب همچنین با شرکت در فرایندهای زیستی تأمین انرژی، نقش کلیدی در تحرک و زنده‌مانی اسپرم دارند (Aksoy et al., 2006; Rafeie et al., 2023). از میان این اسیدها، اسید پالمیتیک به‌عنوان یکی از اسیدهای چرب اصلی در اسپرم، با شمار کل اسپرم رابطه‌ای مستقیم دارد (Lenzi et al., 2000).

از جمله اسیدهای چرب شناسایی‌شده در گرده، اسیدهای امگا-۳ نظیر آلفالینولنیک اسید هستند که پژوهش‌ها اثر آن‌ها را در بهبود ویژگی‌های غشایی اسپرم و افزایش مقاومت آن در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد نشان داده‌اند (Gholami et al., 2011). این ترکیبات با کاهش تنش اکسیداتیو و حفظ یکپارچگی غشا می‌توانند بخشی از اثر محافظتی عصاره گرده را در شرایط یخ‌زدایی توجیه کنند (Moallem et al., 2015; Istifli et al., 2019). اسید سینامیک و مشتقات آن نیز از ترکیبات فنولی موجود در گرده زنبورعسل هستند که نقش آنتی‌اکسیدانی آن‌ها گزارش شده است. این ترکیبات می‌توانند با مهار رادیکال‌های آزاد و تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محیط اسپرم، از آسیب‌های اکسیداتیو به غشا و DNA جلوگیری کرده و در حفظ کیفیت اسپرم مؤثر باشند (Das et al., 2019; Leja et al., 2007).

روش‌شناسی پژوهش

این پژوهش از مهر تا پایان بهمن سال ۱۴۰۲ در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده علوم دامی و شیلات و مزرعه پژوهشی گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام و تأثیر عصاره متانولی گرده زنبورعسل، بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ مورد ارزیابی قرار گرفت.

تهیه عصاره متانولی گرده زنبورعسل

گرده زنبورعسل از زنبورداری واقع در شهرستان آمل تهیه شد. مقدار ۱۰ گرم گرده زنبورعسل را در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ۱۰۰ درصد ریخته و به مدت ۴ روز روی شیکر قرار داده و پس از سانتریفیوژ و عبور از کاغذ صافی، نمونه باقی‌مانده با فریز درایر خشک شد (Mohdaly et al., 2015).

اندازه‌گیری فلاونوئید کل عصاره متانولی گرده زنبور عسل

محتوای فلاونوئیدی کل با استفاده از کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شد. به نیم میلی‌لیتر از عصاره فریز درایر شده، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد در اتانول، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب محلول نیم ساعت پس از نگهداری در تاریکی با دستگاه طیف‌سنج نوری در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل نمونه شاهد (بلانک) خوانده شد (Chang et al., 2002).

تهیه نمونه منی، فراوری منی و یخ‌گشایی

نمونه منی ۴ رأس قوچ بالغ زل (۲ الی ۳ ساله با میانگین وزن 45 ± 2 کیلوگرم)، هفته‌ای دو بار به مدت هشت هفته و با استفاده از واژن مصنوعی در فصل تولیدمثلی جمع‌آوری شد. پس از ارزیابی اولیه (رنگ، بو، عدم آلودگی، غلظت بیش از نیم میلی‌لیتر و تحرک بیش از ۷۰ درصد)، نمونه‌های قابل قبول برای ازبین‌بردن آثار فردی هر دام با هم مخلوط شدند. برای نگهداری کوتاه‌مدت با نسبت ۱ حجم منی به ۱۹ حجم رقیق‌کننده، رقیق‌سازی انجام شد (Linford et al., 1976).

جهت رقیق‌سازی از یک محیط بافری حاوی ۲/۷۰ گرم تریس (Merck, 108382)، ۱/۴ گرم اسیدسیتریک (Sigma, 251275)، یک گرم فروکتوز (Sigma, F3510)، ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین و ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر (آب استریله) استفاده شد. برای آماده‌سازی رقیق‌کننده انجمادی، به محیط رقیق‌کننده پایه مورد استفاده در مرحله نگهداری مایع، ۶/۵ میلی‌لیتر گلیسرول (Merck, Z7114691) افزوده شد تا غلظت نهایی آن به ۶/۵ درصد حجمی برسد و pH محیط پایه در ۷/۲ تنظیم شد (Evans & Mawvell, 1987).

پس از رقیق‌سازی تیمارهای آزمایشی شامل غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبور عسل (صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵)، ۰/۱ میلی‌مولار ویتامین E به‌عنوان گروه کنترل مثبت و ۵ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO^2) به‌عنوان حلال عصاره متانولی نیز به رقیق‌کننده افزوده شد. نمونه‌های رقیق‌شده برای ارزیابی ۵، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در یخچال قرار گرفتند. به‌منظور انجماد، نمونه‌های مخلوط‌شده به ۶ قسمت مساوی تقسیم و سپس رقیق‌سازی شدند تا غلظت نهایی اسپرم در هر میلی‌لیتر برابر با $10^4 \times 100$ به‌دست آید. برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. پایوت‌های انجمادی یک میلی‌لیتری حاوی نمونه‌های رقیق‌شده به مدت ۵ ساعت در ظرف آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یخچال قرار گرفتند. پس از سردسازی، پایوت‌ها به مدت ۷ دقیقه در فاصله ۵ سانتی‌متری از سطح ازت مایع بخار داده شدند تا فرایند انجماد به‌طور کامل انجام گیرد. در نهایت، پایوت‌ها در گوبلت‌های علامت‌گذاری‌شده به تانک ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد منتقل و تا زمان ارزیابی در این دما نگهداری شدند. پس از خارج کردن پایوت‌ها از ازت مایع، در حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفتند تا فرایند یخ‌گشایی صورت گیرد. پایوت‌ها بعد از یخ‌گشایی با دستمال کاغذی خشک و سپس، انتهایی را که با خمیر هماتوکریت مسدود بود با قیچی بریده و بر اساس تیمارهای مشخص شده نمونه‌ها درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری تخلیه شدند (Nemati et al., 2022). جهت تطابق‌پذیری و بازگشت آب درون سلولی به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد ماندند.

فراسنجه‌های مورد ارزیابی

جنبایی اسپرم

به‌منظور ارزیابی جنبایی اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی در گروه‌های مختلف آزمایشی، از میکروسکوپ معکوس فاز کنتراست (Nikon Eclipse TE 300) با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر استفاده شد. بررسی جنبایی به‌صورت چشمی و در هشت میدان دید تصادفی انجام گرفت؛ این میدان‌ها از نواحی مختلف چمبر میکروسکوپی انتخاب شدند تا ارزیابی از نقاط پراکنده نمونه انجام شود (Bucak et al., 2008).

زنده‌مانی اسپرم

برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده و مرده، از رنگ‌آمیزی ائوزین (E4009, Sigma) و نیگروزین (N4763, Sigma) استفاده شد. به‌منظور شمارش، ۲۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری در بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر بررسی شدند. اسپرم‌هایی که به‌صورت کامل یا جزئی رنگ قرمز مایل به بنفش داشتند مرده و اسپرم‌های بی‌رنگ، زنده در نظر گرفته شدند (Evans & Maxwell, 1987).

سلامت غشای پلاسمایی اسپرم

جهت ارزیابی سلامت غشای پلاسمایی، آزمون یکپارچگی غشاء (HOST³) با استفاده از محلول هایپواسموتیک انجام شد. شمارش اسپرم‌ها با میکروسکوپ نوری فازکنتراست در بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر صورت گرفت. در هر لام، حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای دم پیچ‌خورده (نشانه غشای سالم) نسبت به سایر اسپرم‌ها محاسبه شد (Revell & Mrode, 1994).

ریخت‌شناسی اسپرم

برای ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم، از محلول هانکوک استفاده شد (Hancock, 1952). ارزیابی و شمارش اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و نسبت اسپرم غیرطبیعی (سر جدا شده، نقص‌های دم و بخش میانی) به کل اسپرم شمارش‌شده و به‌صورت درصد اسپرم سالم گزارش شد.

فعالیت میتوکندری اسپرم

ارزیابی فعالیت میتوکندری با استفاده از رنگ فلورسنت رودامین ۱۲۳ انجام شد. به ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده منی، ۱۰ میکرولیتر رودامین ۱۲۳ (۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر آب مقطر) افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در تاریکی انکوبه و سپس به مدت ۳ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پلت به دست آمده با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS⁴) مجدداً معلق شد. اسپرم‌هایی که زیر میکروسکوپ فلورسنت رنگ سبز ساطع می‌کردند، دارای میتوکندری فعال در نظر گرفته شدند (Johnson et al., 1980).

پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم

اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA⁵) با تیوباریتوریک اسید (TBA⁶) رایج‌ترین روش بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها در اسپرم است. بدین منظور در این تست یک میلی لیتر از هر نمونه منی (۱۰^۴ × ۱۰۰ سلول اسپرم)، یک میلی لیتر EDTA، یک میلی لیتر BHT⁷ و دو میلی لیتر TCA⁸ با هم مخلوط شدند و با دور ۱۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس یک میلی لیتر از مایع رویی با یک میلی لیتر TBA ترکیب و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از ۳۰ دقیقه خنک‌سازی، جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت MDA با استفاده از منحنی استاندارد و معادله رگرسیونی، به‌صورت نانومول در میلی لیتر محاسبه شد (Esterbauer & Cheeseman, 1990).

روش آماری

⁵. Hypo-Osmotic Swelling Test

⁶. Phosphate buffered saline

⁷. Malondialdehyde

⁸. Thiobarbituric acid

⁹. Butylated Hydroxytoluene

¹⁰. Trichloroacetic Acid

نتایج به دست آمده با استفاده از طرح کامل تصادفی و از طریق رویه GLM در نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میانگین ها به صورت میانگین حداقل مربعات (LSMeans) گزارش شدند و مقایسه آن ها با آزمون چنددامنه ای توکی انجام گرفت. سطح معنی داری آماری ۰/۰۵ ($P < 0/05$) در نظر گرفته شد.

برای داده هایی که اثر زمان اهمیت پیدا می کرد از مدل ریاضی زیر استفاده شد. مدل آماری برای طرح کرت های (اندازه های) خرد شده در زمان در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + Ea_{ik} + B_j + AB_{ij} + EB_{ijk}$$

Y_{ijk} = مشاهده ی تیمار i ام و زمان اندازه گیری j ام در تکرار k ام، μ = میانگین کلی مشاهدات، A_i = اثر تیمار i ام، Ea_{ik} = خطای اصلی، B_j = اثر زمان اندازه گیری j ام، AB_{ij} = اثر متقابل تیمار i ام و زمان اندازه گیری j ام، EB_{ijk} = خطای فرعی

برای سایر داده ها از مدل ریاضی زیر استفاده شد.

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

Y_{ij} : مقدار عددی هر مشاهده، μ : میانگین مشاهده، x_i : اثر تیمار i ام، e_{ij} : اثر عوامل باقی مانده

یافته های پژوهش

یافته های پژوهش در حالت مایع و پس از انجماد- یخ کشایی در جدول های ۱ تا ۶ نشان داده شدند.

جنبایی اسپرم

نتایج اثر استفاده از غلظت های مختلف عصاره متانولی گرده زنبور عسل بر فراسنجه های اسپرم قوچ در جدول ۱ آمده است. در زمان ۵ ساعت، درصد زنده مانی در تیمارهای ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر تفاوت معنی داری با تیمار شاهد نداشت ($P < 0/05$). بیشترین درصد جنبایی بین تیمارهای عصاره متانولی گرده در زمان های ۵، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مربوط به تیمار ۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. تیمار ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر در زمان ۲۴ درصد جنبایی کمتری نشان داد. تیمار ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر، در زمان ۵، ۴۸ و ۷۲ ساعت کمترین درصد جنبایی را بین تیمارهای عصاره متانولی گرده داشت. غلظت ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره متانولی گرده زنبور عسل در زمان ۴۸ ساعت با ویتامین E تفاوت معنی داری داشت ($P < 0/05$). بین چهار زمان مختلف نگهداری منی در یخچال اختلاف آماری وجود داشت و همچنین اثر متقابل تیمار و زمان هم از نظر آماری اختلاف معنی دار داشت ($P < 0/001$).

جدول ۱: اثر غلظت های مختلف عصاره متانولی گرده زنبور عسل بر جنبایی اسپرم قوچ پس از سردسازی

زمان (ساعت)	شاهد	۵mg/ml	۱۰mg/ml	۱۵ mg/ml	ویتامین E	DMSO	P-value
۵	$80/61A \pm 2/01$	$79/68A \pm 0/84$	$79/66A \pm 2/50$	$77/37A \pm 2/30$	$83/23A \pm 1/76$	$82/84A \pm 2/65$	۰/۰۶۱۱
۲۴	$47/27^{cB} \pm 1/28$	$65/4^{bB} \pm 1/97$	$60/06^{bB} \pm 1/64$	$61/54^{bB} \pm 1/93$	$66/76^{abB} \pm 1/53$	$52/46^{cB} \pm 2/42$	<۰۰۰۰۱
۴۸	$42/93^{cC} \pm 0/57$	$59/39^{abC} \pm 1/98$	$57/86^{abC} \pm 1/66$	$55/27^{bC} \pm 2/06$	$61/38^{aC} \pm 2/44^a$	$47/12^{cC} \pm 2/77$	<۰۰۰۰۱
۷۲	$38/18^{cD} \pm 1/66$	$52/96^{aD} \pm 0/28$	$53/40^{abD} \pm 1/68$	$52/31^{abD} \pm 1/65$	$56/05^{abD} \pm 2/04$	$40/51^{cD} \pm 1/21$	<۰۰۰۰۱

a..b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی دار بین تیمارها است ($P < 0/05$). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی مولار)

حروف بزرگ بالا نویسی شده (A-D) نشان دهنده تفاوت معنی دار در زمان های مختلف است.

زنده مانی اسپرم

باتوجه به جدول ۲ در زمان ۵ ساعت، تفاوت معنی داری در درصد زنده مانی بین تیمارهای ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر و تیمار شاهد مشاهده نشد ($P < 0/05$)، اما تیمارهای ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر تفاوت معنی داری با ویتامین E داشتند ($P < 0/05$). در ۲۴

ساعت، تیمار ۵ میلی گرم در میلی لیتر زنده‌مانی بیشتری نسبت به شاهد نشان داد ($P < 0.05$). درحالی که تیمارهای ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر تفاوتی با شاهد نداشتند. تمامی غلظت‌ها در این زمان با ویتامین E تفاوت معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$). در ۴۸ ساعت، هیچ تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل و شاهد دیده نشد، اما هر سه غلظت با ویتامین E تفاوت معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$). در ۷۲ ساعت، تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان دادند ($P < 0.05$), درحالی که تیمار ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر تفاوتی با شاهد نداشت؛ اما با ویتامین E تفاوت معنی‌دار داشت ($P < 0.05$). تیمار ۵ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین درصد زنده‌مانی اسپرم را در زمان‌های ۵، ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد و کمترین درصد زنده‌مانی در زمان‌های ۵، ۴۸ و ۷۲ ساعت در تیمار ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده شد. بین چهار زمان مختلف نگهداری منی در یخچال اختلاف آماری وجود داشت ($P < 0.001$) به جر تیمار شاهد که بین زمان ۲۴ و ۴۸ اختلافی یافت نشد. در تیمار ۱۵ میلی گرم عصاره گرده بین زمان‌های ۲۴ و ۴۸ اختلاف معنی‌داری دیده نشد. اما اثر متقابل تیمار و زمان از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0.001$).

جدول ۲: اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل بر زنده‌مانی اسپرم قوچ پس از سردسازی

زمان (ساعت)	شاهد	۵mg/ml	۱۰mg/ml	۱۵ mg/ml	ویتامین E	DMSO	P-value
۵	$85/75^{abcA} \pm 1/75$	$85^{abcA} \pm 0/91$	$84/25^{bcA} \pm 0/85$	$82/75^{cA} \pm 1/10$	$90^{aA} \pm 1/29$	$82/25^{abcA} \pm 1/25$	<0.001
۲۴	$69/75^{cB} \pm 1/85$	$76^{bB} \pm 1/29$	$74/75^{bcB} \pm 1/25$	$72/25^{bcB} \pm 1/25$	$87^{aB} \pm 1/08$	$70/75^{cB} \pm 2/17$	<0.001
۴۸	$69^{bB} \pm 0/91$	$73/75^{bC} \pm 1/93$	$72/75^{bC} \pm 1/37$	$69/5^{bBC} \pm 1/84$	$83/5^{aC} \pm 1/55$	$67/25^{abC} \pm 0/85$	<0.001
۷۲	$61/5^{cC} \pm 1/70$	$69/75^{abD} \pm 1/70$	$70/75^{abD} \pm 1/37$	$67/25^{bcC} \pm 1/37$	$74/25^{aD} \pm 2/32$	$63^{cD} \pm 0/91$	0.0002

a...b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی مولار).

حروف بزرگ بالا نویسی شده (A-D) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در زمان‌های مختلف است.

سلامت غشای پلاسمایی اسپرم

بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در جدول ۳ نشان داد که در ۵ ساعت اول پس از نگهداری، تفاوت معنی‌داری میان تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل با تیمار شاهد وجود نداشت و تیمار ویتامین E نیز تفاوت معنی‌داری با این تیمارها نشان نداد ($P < 0.05$). در زمان ۲۴ ساعت، تیمار ۵ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره متانولی گرده، با تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار نشان دادند ($P < 0.05$). تیمار ۵ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر به طور معنی‌داری سلامت غشای پلاسمایی کمتری نسبت به تیمار ویتامین E داشتند ($P < 0.05$). در زمان ۴۸ ساعت، افزایش درصد سلامت غشای پلاسمایی به طور معنی‌داری در تیمار ۵ میلی گرم در میلی لیتر نسبت به تیمار شاهد دیده شد ($P < 0.05$). هیچ یک از غلظت‌های عصاره متانولی گرده با ویتامین E تفاوت معنی‌داری نداشت ($P < 0.05$). در زمان ۷۲ ساعت، تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده با تیمار شاهد و تیمار ویتامین E دیده شد ($P < 0.05$). تیمار ۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره متانولی گرده، بیشترین درصد سلامت غشای پلاسمایی در زمان‌های ۵، ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به غلظت‌های دیگر تیمارهای عصاره متانولی گرده نشان داد. بین چهار زمان مختلف نگهداری منی در یخچال اختلاف آماری وجود داشت ($P < 0.001$) به جر تیمار شاهد که بین زمان ۲۴ و ۴۸ اختلافی یافت نشد. در تیمار ۵ میلی گرم عصاره گرده بین زمان‌های ۲۴ و ۴۸ اختلاف معنی‌داری دیده نشد. اما اثر متقابل تیمار و زمان از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0.001$).

زمان (ساعت)	شاهد	۵mg/ml	۱۰mg/ml	۱۵ mg/ml	ویتامین E	DMSO	P-value
۵	$87/50^{aA} \pm 2/59$	$86/50^{abA} \pm 0/64$	$84^{bA} \pm 0/91$	$87/53^{bA} \pm 1/10$	$84/25^{bA} \pm 2/01$	$86/25^{abA} \pm 1/75$	<0.001

۲۴	$۶۸/۷۵^{dB} \pm ۱/۳۷$	$۷۷/۲۵^{bcB} \pm ۱/۷۵$	$۷۴/۷۵^{dcB} \pm ۰/۸۵$	$۷۹/۷۵^{abcB} \pm ۱/۷۹$	$۸۳/۷۵^{aA} \pm ۲/۷۵$	$۷۰^{dB} \pm ۱/۴۷$	<۰.۰۰۰۱
۴۸	$۶۸/۲۵^{dB} \pm ۰/۸۵^c$	$۷۶/۲۵^{abB} \pm ۲/۵۲$	$۷۲/۲۵^{bcC} \pm ۱/۲۵$	$۷۳/۷۵^{abcC} \pm ۱/۸۸$	$۷۹^{abB} \pm ۱/۶۸$	$۶۶/۲۵^{cC} \pm ۱/۲۹$	$۰/۰۰۰۹$
۷۲	$۵۸/۵^{dC} \pm ۱/۱۹$	$۶۹/۵۰^{bC} \pm ۱/۲۷$	$۶۸/۵۰^{bcd} \pm ۱/۱۹$	$۶۶/۷۵^{bcd} \pm ۱/۱۰$	$۷۷/۷۵^{aB} \pm ۲/۴۲$	$۶۲/۷۵^{cdD} \pm ۱/۴۹$	<۰.۰۰۰۱

جدول ۳: اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی کرده زنبور عسل بر سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ پس از سردسازی

a..b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P < ۰/۰۵$). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی‌مولار).

حروف بزرگ بالا نویسی شده (A-D) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در زمان‌های مختلف است.

ریخت‌شناسی اسپرم

باتوجه به جدول ۴، در زمان ۵ ساعت، تفاوت معنی‌دار بین تیمارها دیده نشد ($P < ۰/۰۵$). همچنین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی کرده با ویتامین E تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P < ۰/۰۵$). در زمان ۲۴ ساعت، به طور معنی‌داری افزایش درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی طبیعی در تیمار ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر نسبت به تیمار شاهد دیده شد ($P < ۰/۰۵$). در حالی که با تیمار ویتامین E تفاوت معنی‌داری نداشت ($P < ۰/۰۵$). تیمارهای ۵ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و ویتامین E نشان ندادند ($P < ۰/۰۵$). در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت هر سه غلظت عصاره متانولی کرده، با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و ویتامین E داشتند ($P < ۰/۰۵$). تیمار ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر به طور معنی‌داری درصد اسپرم طبیعی کمتری نسبت به ویتامین E داشت ($P < ۰/۰۵$). تیمار ۵ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین درصد اسپرم با ریخت‌شناسی طبیعی در زمان ۵ و ۴۸ ساعت را نشان داد. در زمان ۲۴ و ۷۲ تیمار ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر درصد اسپرم با ریخت‌شناسی طبیعی بیشتری داشت. کمترین درصد اسپرم با ریخت‌شناسی طبیعی در زمان‌های مختلف نیز مربوط به تیمار ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. بین چهار زمان مختلف نگهداری منی در یخچال اختلاف آماری وجود داشت ($P < ۰/۰۰۱$). در تیمار ۵ میلی گرم عصاره کرده بین زمان‌های ۲۴ و ۴۸ اختلاف معنی‌داری دیده نشد. اما اثر متقابل تیمار و زمان از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < ۰/۰۰۱$).

جدول ۴: اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی کرده زنبور عسل بر ریخت‌شناسی اسپرم قوچ پس از سردسازی

زمان (ساعت)	شاهد	۵mg/ml	۱۰mg/ml	۱۵ mg/ml	ویتامین E	DMSO	P-value
۵	$۹۲/۷۵^{A} \pm ۱/۷۵$	$۹۵/۵^{A} \pm ۰/۶۴$	$۹۵^{A} \pm ۰/۹۱$	$۹۴/۵^{A} \pm ۱/۰۴$	$۹۳/۷۵^{A} \pm ۱/۱۰$	$۹۴^{A} \pm ۱/۲۹$	$۰/۰۵۱۹$
۲۴	$۸۶/۲۵^{bB} \pm ۰/۸۵$	$۹۱/۷۵^{abB} \pm ۱/۳۷$	$۹۲/۵^{bB} \pm ۱/۵۵$	$۹۰/۵^{abB} \pm ۱/۰۴$	$۹۱/۷۵^{abB} \pm ۱/۳۷$	$۸۵/۵^{bB} \pm ۱/۸۴$	$۰/۰۲۴۴$
۴۸	$۷۸^{bC} \pm ۰/۹۱$	$۸۹/۷۵^{aB} \pm ۱/۴۹$	$۸۷/۷۵^{aC} \pm ۱/۱۰$	$۸۷/۲۵^{aC} \pm ۱/۲۵$	$۹۱/۲۵^{aB} \pm ۱/۳۷$	$۸۰^{bC} \pm ۱/۲۹$	<۰.۰۰۰۱
۷۲	$۷۳^{dD} \pm ۱/۲۹$	$۸۳^{bcC} \pm ۱/۹۵$	$۸۵/۵^{abcD} \pm ۱/۳۲$	$۸۱^{cD} \pm ۱/۲۹$	$۸۹/۵^{abcC} \pm ۱/۴۴$	$۷۱^{adD} \pm ۱/۵۸$	<۰.۰۰۰۱

a..b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P < ۰/۰۵$). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی‌مولار).

حروف بزرگ بالا نویسی شده (A-D) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در زمان‌های مختلف است.

فعالیت میتوکندری اسپرم

باتوجه به جدول ۵، در زمان ۵ ساعت، تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی با تیمار کنترل دیده نشد ($P < ۰/۰۵$). در زمان ۲۴ ساعت تیمار ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان ندادند ($P < ۰/۰۵$). تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های ۵ و ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره متانولی با تیمار ویتامین E دیده نشد ($P < ۰/۰۵$). در زمان ۴۸ ساعت، تیمار ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل نشان دادند ($P < ۰/۰۵$). اما بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی با ویتامین E تفاوت معنی‌داری دیده نشد. در زمان ۷۲ ساعت، فعالیت میتوکندری در تیمارهای ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر به

طور معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل افزایش یافت ($P < 0.05$). تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۵ و ۲۴ ساعت، تیمار ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۴۸ ساعت و تیمار ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۷۲ ساعت درصد فعالیت میتوکندری بیشتری نسبت به غلظت‌های دیگر عصاره متانولی نشان دادند. بین چهار زمان مختلف نگهداری منی در یخچال اختلاف آماری وجود داشت ($P < 0.001$). در تیمار ۱۵ میلی‌گرم عصاره گرده بین زمان‌های ۵ و ۲۴ ساعت و زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری دیده نشد. اما اثر متقابل تیمار و زمان از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0.001$).

جدول ۵: اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبور عسل بر فعالیت میتوکندری اسپرم قوچ پس از سردسازی

زمان (ساعت)	شاهد	۵mg/ml	۱۰mg/ml	۱۵ mg/ml	ویتامین E	DMSO	P-value
۵	$64^{abA} \pm 1/77$	$65/75^{abA} \pm 1/25$	$60^{abA} \pm 1/29$	$58/25^{bA} \pm 2/21$	$66/25^{aA} \pm 1/10$	$63/5^{abA} \pm 2/10$	0.0142
۲۴	$56/75^{abB} \pm 1/65$	$59/50^{aB} \pm 1/19$	$57^{abB} \pm 1/08$	$56^{abAB} \pm 2/38$	$55/5^{abB} \pm 2/32$	$50/75^{bB} \pm 0/85$	0.0424
۴۸	$45/25^{bC} \pm 2/42$	$40/25^{abC} \pm 0/85$	$53/5^{aC} \pm 1/55$	$54/25^{aB} \pm 1/52$	$54/25^{aB} \pm 1/10$	$46/25^{bC} \pm 1/49$	0.0007
۷۲	$30/5^{bD} \pm 1/04$	$44/25^{aD} \pm 1/10$	$45/5^{aD} \pm 1/75$	$44/25^{aC} \pm 2/09$	$48/25^{aC} \pm 1/25$	$36/5^{bD} \pm 1/55$	<0.0001

a..b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی‌مولار).

حروف بزرگ بالا نویسی شده (A-D) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در زمان‌های مختلف است.

غلظت مالون‌دی‌آلدئید اسپرم

با توجه به جدول ۶ در زمان ۵ ساعت، تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی با تیمار کنترل دیده نشد ($P < 0.05$). در ساعت ۲۴ غلظت مالون‌دی‌آلدئید در تیمار ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل کاهش یافت ($P < 0.05$). در زمان ۲۴ ساعت، تفاوت معنی‌دار بین تیمار ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ویتامین E دیده شد ($P < 0.05$). در ساعت ۴۸، غلظت‌های مختلف عصاره متانولی به‌طور معنی‌داری غلظت مالون‌دی‌آلدئید کمتری نسبت به تیمار کنترل نشان دادند ($P < 0.05$). تیمار ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ویتامین E تفاوت معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$). اما تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ویتامین E تفاوت معنی‌دار نشان نداد. در زمان ۷۲ ساعت، غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری غلظت مالون‌دی‌آلدئید کمتری نسبت به تیمار کنترل نشان دادند ($P < 0.05$). تیمار ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ویتامین E تفاوت معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$). از طرفی تفاوت معنی‌داری بین تیمار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ویتامین E دیده نشد. کمترین و بیشترین درصد غلظت مالون‌دی‌آلدئید بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی در زمان ۵، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب مربوط به تیمار ۵ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. بین چهار زمان مختلف نگهداری منی در یخچال اختلاف آماری وجود داشت ($P < 0.001$). در تیمار ۵ میلی‌گرم عصاره گرده بین زمان‌های ۵ و ۲۴ ساعت و زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری دیده نشد. اثر متقابل تیمار و زمان از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0.001$).

جدول ۶: اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبور عسل بر غلظت مالون‌دی‌آلدئید اسپرم قوچ ($10^4 \times 100$ سلول اسپرم در هر میلی‌لیتر)

زمان (ساعت)	شاهد	۵mg/ml	۱۰mg/ml	۱۵ mg/ml	ویتامین E	DMSO	P-value
۵	$5/19^A \pm 0/53$	$4/41^A \pm 0/31$	$5/12^A \pm 0/26$	$5/29^A \pm 0/46$	$4/25^A \pm 0/36$	$5/43^A \pm 0/34$	0.0837
۲۴	$9/12^{aB} \pm 0/34$	$5/08^{cAB} \pm 0/42$	$6/70^{bB} \pm 0/31$	$7/85^{abB} \pm 0/41$	$4/71^{cA} \pm 0/26$	$8/70^{aB} \pm 0/36$	<0.0001
۴۸	$10/75^{aC} \pm 0/36$	$5/56^{dB} \pm 0/20$	$7/37^{cC} \pm 0/55$	$8/82^{bcC} \pm 0/33$	$5/68^{dB} \pm 0/31$	$9/79^{abC} \pm 0/20$	<0.0001
۷۲	$11/66^{aD} \pm 0/31$	$6/28^{cC} \pm 0/36$	$8/40^{bD} \pm 0/25$	$9/62^{bD} \pm 0/37$	$6/40^{cC} \pm 0/26$	$11/30^{aD} \pm 0/28$	<0.0001

a..b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی‌مولار).

حروف بزرگ بالا نویسی شده (A-D) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در زمان‌های مختلف است.

ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی

با توجه به جدول ۷ اسپرم پس از یخ‌گشایی به طور معنی‌داری در تیمار ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت ($P < 0.05$). تیمار ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین درصد جنبایی اسپرم پس از یخ‌گشایی را نشان داد ($P < 0.05$). تیمار ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر تفاوت معنی‌دار با تیمار ویتامین E نشان دادند ($P < 0.05$). پس از یخ‌گشایی درصد زنده‌مانی در تیمار ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود ($P < 0.05$) و تیمار ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر تفاوت معنی‌دار با ویتامین E نشان دادند ($P < 0.05$). درحالی‌که تیمار ۵ میلی گرم در میلی لیتر با ویتامین E تفاوت معنی‌داری نداشت. سلامت غشای اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی در تیمار ۱۵ میلی گرم عصاره گرده بیشترین و تیمارهای شاهد و DMSO کمترین درصد را نشان دادند. بهترین درصد ریخت‌شناسی اسپرم پس از یخ‌گشایی در تیمار ۱۵ میلی گرم عصاره گرده دیده شد. در حالی که تیمار شاهد با تیمار DMSO هیچ گونه اختلاف معنی‌داری نداشتند. فعالیت میتوکندری در تمامی تیمارها نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.001$). تیمار ۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره گرده توانست پس از یخ‌گشایی کمترین مقدار مالون دی‌آلدئید را تولید کند و بیشترین مقدار مالون دی‌آلدئید مربوط به تیمارهای شاهد و DMSO بود ($P < 0.001$).

جدول ۷: اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبورعسل بر فراسنجه‌های اسپرم قوچ پس از انجماد-یخ‌گشایی

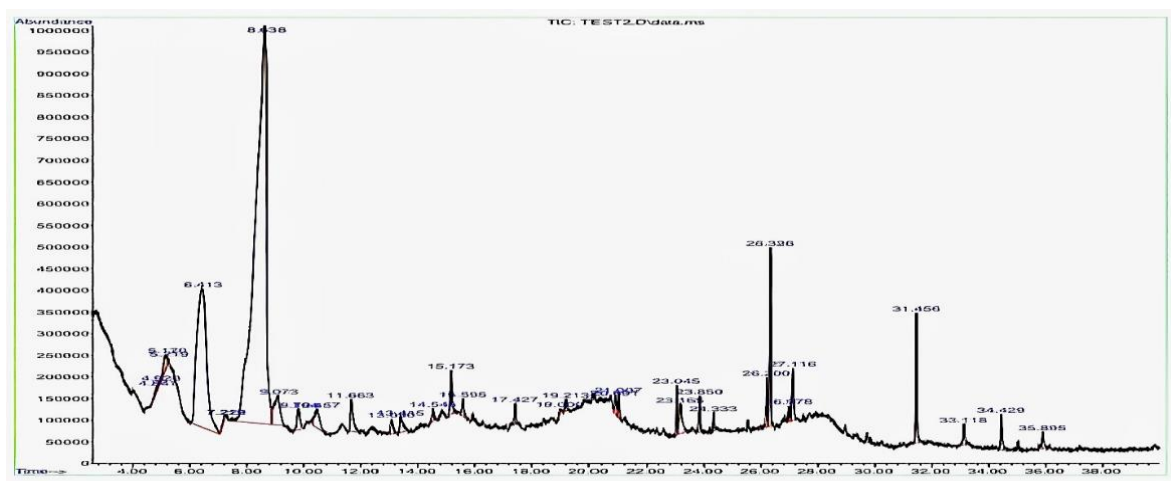
تیمارها

P-value	DMSO	ویتامین E	۱۵ mg/ml	۱۰ mg/ml	۵ mg/ml	شاهد	صفات (%)
<۰.۰۰۰۱	۳۲/۷۵ ^d ± ۱/۴۹	۶۰/۷۵ ^b ± ۰/۸۵	۶۸/۷۵ ^a ± ۱/۳۷	۴۵/۲۵ ^c ± ۰/۸۵	۶۰/۵ ^b ± ۲/۱۰	۳۱ ^d ± ۱/۲۹	زنده‌مانی
<۰.۰۰۰۱	۶۸/۵ ^{cd} ± ۱/۵۵	۷۹/۵ ^{ab} ± ۱/۰۴	۸۳/۲۵ ^a ± ۱/۱۰	۷۴/۷۵ ^{bc} ± ۱/۲۵	۷۸ ^{ab} ± ۲/۵۴	۶۷ ^d ± ۲/۰۸	ریخت‌شناسی
<۰.۰۰۰۱	۳۲/۲۵ ^c ± ۱/۴۹	۵۵ ^{abc} ± ۲/۰۴	۶۳ ^a ± ۱/۶۸	۴۳ ^{bc} ± ۱/۵۸	۵۰/۷۵ ^{ab} ± ۰/۸۵	۳۱ ^c ± ۱/۲۹	سلامت غشا
<۰.۰۰۰۱	۱۹/۹۱ ^{cd} ± ۰/۶۳	۴۰/۳۷ ^b ± ۰/۳۸	۴۹/۵۲ ^a ± ۱/۶۵	۲۴/۶۶ ^c ± ۰/۵۳	۳۶/۴۳ ^b ± ۱/۷۳	۱۶/۳۳ ^d ± ۱/۱۵	جنبایی
<۰.۰۰۰۱	۱۸/۲۵ ^b ± ۱/۱۰	۲۷ ^a ± ۲/۴۲	۳۰ ^a ± ۱/۵۸	۳۰/۲۵ ^a ± ۱/۴۹	۳۳/۲۵ ^a ± ۱/۴۹	۱۹/۲۵ ^b ± ۰/۸۵	فعالیت میتوکندری
<۰.۰۰۰۱	۷۶/۰۹ ^a ± ۲/۵۴	۴۸/۶۷ ^c ± ۰/۸۵	۶۳/۶۵ ^b ± ۰/۶۷	۶۱/۵۷ ^b ± ۲/۲۲	۴۷/۷۱ ^c ± ۱/۰۶	۷۳/۷۳ ^a ± ۱/۹۰	غلظت مالون دی‌آلدئید (nmol/mL)

a..b: حروف نامشابه در هر سطر به منزله تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$). (DMSO: ۵ میکرولیتر، ویتامین E: ۰/۱ میلی‌مولار).

تحلیل عصاره متانولی گرده زنبورعسل با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS)

ترکیبات شناسایی شده در عصاره متانولی گرده زنبورعسل با روش GC-MS در جدول ۷ ارائه شده است.



نگاره ۱: کروماتوگرام GC_MS عصاره متانولی گرده زنبورعسل

جدول ۸: ترکیبات شناسایی شده در عصاره متانولی گرده زنبورعسل به روش GC-MS

Retention time (min)	سطح زیر منحنی (%)	مواد شناسایی شده	تعداد ترکیبات
۴/۸۴۴	۰/۲۶	3-Thiophenemethanol	۱
۴/۹۲۲	۰/۱۶	3-Methylpiperazine-2,5-dion	۲
۵/۱۷۱	۱/۵۳	4,6-Dihydroxy-2-methyl pyrimidine	۳
۵/۲۱۷	۰/۱۲	6-Methoxy-2-cyclohexen-1-one	۴
۶/۴۱۱	۱۸/۳۱	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	۵
۷/۲۱	۰/۱۴	5-Hydroxymaltol	۶
۹/۰۷۲	۵/۷۹	Methyl 3-hydroxydecanoate	۷
۹/۷۹۴	۱/۹۹	2-Methoxy-4-vinyl phenol	۸
۱۰/۴۵۸	۲/۹	4-Phenylbut-3-ynylaminc	۹
۱۱/۶۶۲	۲/۹	5-Acetyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizin	۱۰
۱۳/۰۸۹	۱/۱۷	1,3,5-Trimethyl-2-octadecyclohexane	۱۱
۱۳/۴۱۵	۱/۶۳	2,1,3-Benzothiadiazole	۱۲
۱۴/۴۵۷	۰/۸۴	3-Acetylphenoxazoline	۱۳
۱۵/۱۷۴	۲/۴	N-(4-fluorophenyl)cyclohexane carboxamide	۱۴
۱۵/۵۹۵	۳/۷۴۱	Lauric acid	۱۵
۱۷/۴۲۶	۱/۰۵	Thiazolo[3,2-a]pyridinium, 8-hydroxy-2,5-dimethyl-, hydroxide, inner salt	۱۶
۱۸/۹۹۸	۲/۵۹۱	Trans-4-methoxy cinnamic acid	۱۷
۱۹/۲۱۱	۰/۶۲	2-Methoxyadamantane	۱۸
۲۰/۸۹۲	۱/۴۶	9-Methylenetricyclo[3.3.2]decan-2,6-dion	۱۹
۲۱/۰۰۶	۱/۴۶	Yomogi alcohol	۲۰
۲۳/۰۴۶	۱/۹۹	Methyl palmitate	۲۱
۲۳/۱۶۵	۵/۹۵۱	3,4-Dimethoxycinnamic acid	۲۲
۲۳/۸۵۰	۳/۳۱	Palmitic acid	۲۳
۲۴/۳۳۲	۱/۲۶۱	Cis-(Z)-alpha-Bisabolene epoxide	۲۴
۲۶/۲	۲/۶۵	Linoleic acid, methyl ester	۲۵
۲۶/۳۲۵	۹/۷۳۱	Methyl linolenate	۲۶

۲۶/۹۷۸	۳/۶۲۱	Allo-inositol	۲۷
۲۷/۱۱۹	۳/۲۴۱	α -Linolenic acid	۲۸
۳۱/۴۵۶	۱۰/۸۲	Pinostrobin chalcone	۲۹
۳۳/۱۱۷	۱/۲۹	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	۳۰
۳۴/۴۲۹	۴/۵۸۱	4H-1-Benzopyran-4-one, 5-hydroxy-7-methoxy-2-phenyl	۳۱
۳۵/۸۹۳	۰/۹۳	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-3-methylene	۳۲

بحث

بر اساس تحلیل عصاره متانولی کرده با روش GC-MS، مشخص شد که ۵۷/۳۷۶ از عصاره متانولی کرده زنبور عسل شامل ترکیباتی چون اسیدهای چرب، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها است. این ترکیبات به واسطه خواص بیولوژیکی متنوع خود، می‌توانند نقشی موثری در بهبود کیفیت اسپرم ایفا کنند. میزان فلاونوئیدکل موجود در عصاره متانولی کرده حدود ۱/۶۵۹۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم اندازه‌گیری شد. به منظور مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره، از ویتامین E به عنوان آنتی‌اکسیدان مرجع استفاده گردید. ویتامین E قادر است انواع رادیکال‌های آزاد نظیر سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل را خنثی کرده و با جلوگیری از پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای اسپرم، از کاهش تحرک نهایی آن جلوگیری کند (Sinclair, 2000).

در میان ترکیبات شناسایی شده، DDMP به عنوان یکی از محصولات واکنش میلارد گلوکز، با ساختار خاص خود به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی مطرح است. مطالعات نشان داده‌اند که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد، از آغاز یا ادامه واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداتیو جلوگیری کرده و از این طریق تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند؛ فرایندی که منجر به حفاظت از غشای سلولی و حفظ کیفیت اسپرم می‌شود (Chen et al., 2021). از جمله ترکیبات شناسایی شده در عصاره، دو ترکیب Pinostrobin chalcone، 4H-1-Benzopyran-4-one و 5-hydroxy-7-methoxy-2-phenyl، از دسته فلاونوئیدها و مشتقات چالکون‌ها بودند که در مجموع حدود ۱۵/۴۰۱ درصد از ترکیب عصاره را تشکیل دادند. پینوستروبین یک فلاونول با آثار بیولوژیکی متعددی مانند خواص ضدویروسی، ضدباکتری و ضدقارچی است (Kanchanapiboon et al., 2020; Sopanaporn et al., 2020; Gurung et al., 2022). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این ترکیب با کاهش آسیب ناشی از مواجهه با ریزپلاستیک‌های پلی‌استایرن، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تنظیم هورمون‌های مرتبط با تولیدمثل، همچنین کاهش آپوپتوز، کیفیت اسپرم را بهبود می‌بخشد (Ijaz et al., 2023). همچنین، اسید لوریک که یکی از اسیدهای چرب غالب موجود در عصاره و ترکیب عمده روغن نارگیل محسوب می‌شود، خاصیت ضد میکروبی قوی در برابر باکتری‌های گرم مثبت، برخی قارچ‌ها و ویروس‌ها دارد (Dayrit, 2015). تجویز این اسید با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مدل‌های حیوانی، منجر به بهبود شاخص‌های تولیدمثل از جمله کیفیت اسپرم، کاهش تنش اکسیداتیو و تنظیم هورمون‌های باروری در موش‌های دیابتی شده است (Anur et al., 2023).

آلوانوزیتول (Allo-inositol) نیز که یکی از ایزومرهای اینوزیتول‌ها محسوب می‌شود، متعلق به گروه کربوهیدرات‌های الکلی است و به دلیل نقش‌های آنتی‌اکسیدانی و متابولیکی، در حفظ سلامت سلول‌های زایشی حائز اهمیت است. این ترکیب به عنوان پیام‌رسان ثانویه در مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی نقش داشته و در فرایندهای تنظیم کلسیم داخل سلولی و نیز در عملکرد تولیدمثلی مؤثر است (De Luca et al., 2021).

نتایج حاصل از آزمایش‌ها نشان داد که در شرایط نگهداری کوتاه‌مدت، غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین تأثیر مثبت را بر فراسنجه‌های اسپرم از جمله کاهش معنادار غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) داشت. این در حالی بود که تیمار با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر، بیشترین نقش را در کاهش افت کیفیت اسپرم در ساعت ۷۲ ایفا کرد، به گونه‌ای که درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی طبیعی، زنده‌مانی و فعالیت میتوکندری در این گروه در بالاترین سطح نسبت به سایر تیمارها باقی ماند. همچنین، غلظت ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین اثر را در بهبود سلامت غشا در ساعت ۲۴ و افزایش فعالیت میتوکندری در ساعت ۴۸ نشان داد. در شرایط پس از انجماد نیز هر سه غلظت عصاره (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر) نسبت به گروه کنترل به طور معناداری موجب بهبود فراسنجه‌های

کیفی اسپرم شدند. در این میان، تیمار ۵ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین اثر را در حفظ فعالیت میتوکندری و کاهش سطح MDA داشت. کاهش سطح MDA نشان دهنده کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و بهبود وضعیت اکسیداتیو سلول‌هاست که در حفظ انرژی و عملکرد اسپرم نقش دارد. به نظر می‌رسد این ترکیبات با جلوگیری از آسیب به ساختار غشا، حمایت از عملکرد میتوکندری و حفظ تولید ATP، موجب افزایش طول عمر و کیفیت اسپرم در طول دوره نگهداری می‌شوند. یکپارچگی غشای اسپرم، به عنوان یکی از شاخص‌های کلیدی در ارزیابی توان باروری، به شدت تحت تأثیر عوامل اکسیداتیو قرار دارد (Yousif et al., 2024). یافته‌های این مطالعه با نتایج پژوهش Al-Amery و Banana (2020) همخوانی دارد؛ آن‌ها نیز افزایش تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم قوچ را در اثر افزودن عصاره‌های آبی و الکلی گرده زنبور عسل در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند. این هم‌راستایی، بیانگر اثربخشی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در گرده زنبور عسل، مستقل از نوع حلال استخراج، در بهبود پارامترهای اسپرم در شرایط سرد است. این ترکیبات با پایداری ساختارهای سلولی، حفظ ریخت‌شناسی و عملکرد طبیعی اسپرم، آثار مثبتی در مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو دارند (Agarwal et al., 2014). فعالیت میتوکندری، که مستقیماً با تولید انرژی و تحرک اسپرم مرتبط است، در تیمارهای حاوی عصاره بهتر حفظ شده و از کاهش ATP و آسیب‌های ساختاری ناشی از ROS پیشگیری شده است (Amaral et al., 2013). مکمل‌سازی جیره با گرده زنبور عسل در خروس‌های بالغ موجب بهبود قابل توجه در ویژگی‌های فیزیکی منی، از جمله حجم انزال، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی اسپرم، و کاهش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی گردید. به‌ویژه با وجود تفاوت‌هایی که در گونه‌های جانوری (مرغ در برابر قوچ)، روش مصرف (خوراکی در مقابل افزودن به رقیق‌کننده اسپرم)، و نوع عصاره مورد استفاده وجود دارد، در هر دو مطالعه‌ای که بررسی شد، آثار مثبت گرده زنبور عسل بر کیفیت اسپرم مشهود بود. این همخوانی می‌تواند نشان‌دهنده آثار عمومی ترکیبات زیست‌فعال موجود در گرده زنبور عسل، به‌ویژه فلاونوئیدها و اسیدهای چرب، در کاهش تنش اکسیداتیو و ارتقاء شاخص‌های عملکرد تولیدمثلی در گونه‌های مختلف باشد (Abuoghaba et al., 2018).

در پژوهش حاضر، تیمار ۵ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره متانولی گرده زنبور عسل باعث کاهش قابل توجه سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) شد که این کاهش نشان‌دهنده اثر محافظتی عصاره در برابر تنش اکسیداتیو است. این اثر محافظتی در طول دوره نگهداری و پس از انجماد مشهود بود و نشان می‌دهد که این تیمار توانسته است پایداری ساختار سلولی اسپرم را حفظ کند. به نظر می‌رسد این غلظت با فراهم کردن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مؤثر، بدون ایجاد دوز بالای سایر ترکیبات زیست‌فعال مانند اسیدهای چرب یا فنول‌ها، توانسته است تعادل سلولی را حفظ و از بروز آثار منفی احتمالی جلوگیری کند (Kothari & Seshadri, 2010).

غلظت پایین‌تر از عصاره به احتمال زیاد شرایط بهینه‌ای برای محافظت از اسپرم فراهم کرده است که می‌تواند دلیل اثربخشی بیشتر آن در کاهش سطح MDA باشد. همچنین در این غلظت پایین، به‌ویژه ۵ میلی گرم در میلی لیتر، میزان زنده‌مانی اسپرم نیز بهتر حفظ شد که این امر احتمالاً به دلیل کاهش آسیب‌های اکسیداتیو و فراهم آمدن شرایط مطلوب‌تر برای فرایندهای متابولیک سلولی است. فلاونوئیدهای موجود در عصاره با مهار اکسیداسیون لیپیدها و حفظ ساختار غشای سلولی، نقش مؤثری در افزایش یکپارچگی غشا و بهبود زنده‌مانی اسپرم‌ها ایفا می‌کنند (Chen et al., 2020).

در مورد آثار غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده زنبور عسل (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم، عدم تفاوت معنی‌دار میان تیمارها در شرایط مایع نشان می‌دهد که دامنه غلظت‌های به کار رفته در این مطالعه در محدوده‌ای قرار داشته که آثار مفید خود را بدون ایجاد سمیت سلولی اعمال کرده‌اند. این می‌تواند به ویژگی‌های خاص ترکیبات موجود در عصاره، مانند فلاونوئیدها، اسیدهای چرب و مشتقات آن‌ها مربوط باشد که در این دامنه دوز به‌طور مثبت بر تعادل سلولی تأثیر گذاشته و موجب ایجاد تداخل منفی نمی‌شوند. مطابق گزارش ییلدیز و همکاران (Yildiz et al., 2013)، مصرف مکمل گرده زنبور عسل در شرایط تنش‌زا موجب کاهش شاخص‌های تنش اکسیداتیو و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی در حیوانات می‌شود. در پژوهش حاضر نیز افزودن عصاره متانولی گرده به رقیق‌کننده منی موجب بهبود قابل توجه کیفیت اسپرم پس از یخ‌گشایی شد. در این بین، تیمار ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر آثار مطلوب‌تری بر جنبایی، زنده‌مانی، فعالیت غشای پلاسمایی و ریخت‌شناسی اسپرم نسبت به سایر تیمارها نشان داد. به نظر می‌رسد این تیمار، با توجه به غلظت بالاتر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، توانسته با کاهش تنش اکسیداتیو و محافظت از غشای اسپرم، از بروز ناهنجاری‌های ثانویه نظیر دم حلقه‌ای، جداشدگی سر از دم و خمیدگی قطعه میانی جلوگیری کند و ساختارهای سلولی را در برابر تنش

ناشی از انجماد تقویت کند. بنابراین، اثر حفاظتی این غلظت در حفظ ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم آشکار شده است. در مقابل، تیمار ۵ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین بهبود را در فعالیت میتوکندری و کاهش سطح MDA در شرایط پس از انجماد نشان داد. این یافته احتمالاً ناشی از تأثیر محافظتی آنتی اکسیدان‌ها در این غلظت است، بدون اینکه فشار متابولیکی اضافی ایجاد شود. کاهش کمتر سطح MDA در تیمارهای ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر ممکن است به دلیل بروز تنش اکسیداتیو معکوس ناشی از تخریب لیپیدهای غشایی باشد.

عصاره مورد استفاده در این مطالعه حاوی ۳۹/۸۵ درصد اسیدهای چرب است که برخی از آن‌ها خواص آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی دارند. اسیدهای چرب نقش حیاتی در ساختار و عملکرد اسپرم ایفا می‌کنند، از جمله در سیالیت غشا، واکنش آکروزومی، تحرک و زنده‌مانی سلول. همچنین با کاهش تنش اکسیداتیو و تأمین انرژی، این اسیدها می‌توانند پایداری اسپرم را در شرایط نگهداری و انجماد افزایش دهند. ترکیباتی نظیر اسید سینامیک و مشتقات چالکون نیز با خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی خود می‌توانند نقش محافظتی ایفا کنند (Díaz et al., 2016). مطالعات متعدد اثر مثبت اسیدهای چرب غیراشباع بر یکپارچگی DNA، ظرفیت آنتی اکسیدانی و کاهش سطح تنش اکسیداتیو اسپرم را نشان داده‌اند (Huang et al., 2016; Kiernan et al., 2013). رابطه میان افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش تحرک اسپرم توسط آیتکن و ساویر (Aitken & Sawyer, 2003) تأیید شده است؛ به گونه‌ای که تولید بیش‌ازحد پراکسید هیدروژن منجر به کاهش ATP و در نتیجه کاهش تحرک اسپرم می‌شود. چون میتوکندری نقش کلیدی در تولید انرژی دارد، حضور اسیدهای چرب غیراشباع مانند لینولنیک و آلفا لینولنیک اسید در غلظت‌های پایین‌تر می‌تواند باعث حفظ عملکرد بهینه این اندامک حیاتی بدون اعمال فشار متابولیکی اضافی شود. همچنین رابطه‌ای مستقیم بین یکپارچگی غشا و فعالیت میتوکندری وجود دارد؛ به گونه‌ای که بهبود یکپارچگی غشای سلول موجب افزایش عملکرد میتوکندری می‌شود (Partyka et al., 2012).

ترکیبات فنولیک، به‌ویژه فلاونوئیدها، می‌توانند با پوشش‌دهی لیپیدهای غشایی از آن‌ها محافظت کرده و از تولید بیش‌ازحد رادیکال‌های آزاد جلوگیری کنند، از این طریق روند پراکسیداسیون لیپیدها را مهار کرده و پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع را محدود سازند (Blokhina et al., 2003).

در نهایت، در تیمارهای حاوی عصاره، افزایش معنی‌دار جنبایی، تعداد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی طبیعی و کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید (به عنوان شاخص سنجش پراکسیداسیون لیپیدی) نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. این نتایج نشان‌دهنده رابطه معنادار بین پراکسیداسیون لیپیدی و ویژگی‌های ریخت‌شناسی و تحرک اسپرماتوزوئید است (MAIA & Bicudo, 2009). به نظر می‌رسد که فلاونوئیدها با مهار پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید، تأثیر مثبتی بر تحرک و ریخت‌شناسی اسپرماتوزوئید طی دوره نگهداری دارند (Lima & Abdalla, 2001). هر سه غلظت عصاره، با فراهم کردن سطوح متفاوتی از ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی، به‌طور موفقیت‌آمیزی موجب بهبود کیفیت اسپرم در شرایط مختلف (سرما و انجماد) شدند؛ به‌ویژه اینکه هر غلظت، بسته به میزان و نوع ترکیبات موجود، تأثیرات متفاوتی بر فراسنجه‌های خاص سلولی داشته است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره متانولی گرده زنبورعسل با خواص آنتی اکسیدانی خود، تأثیر مثبتی بر کیفیت اسپرم قوچ در شرایط ذخیره‌سازی مایع و انجماد دارد. ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره، از جمله فلاونوئیدها، اسیدهای چرب و ترکیبات فنولی، بهبود قابل توجهی در فراسنجه‌های اسپرم مانند جنبایی، زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی، فعالیت میتوکندری و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی ایجاد کردند. در میان غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گرده، غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر با حفظ آثار مثبت آنتی اکسیدانی و بدون ایجاد فشار متابولیکی اضافی، بهترین نتیجه را در حفظ کیفیت اسپرم نشان داد و بنابراین پیشنهاد می‌شود. با این حال، برای درک دقیق‌تر آثار آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها و سایر ترکیبات زیست‌فعال گرده زنبورعسل بر کیفیت اسپرم، به‌ویژه در شرایط فراوری منی، نیاز به مطالعات و تحقیقات بیشتری است.

References

1. Agarwal, A., Durairajanayagam, D., & Du Plessis, S. S. (2014). Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, 1-19. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-112>
2. Aitken, R. J., & Sawyer, D. (2003). The human spermatozoon—not waving but drowning. *Advances in male mediated developmental toxicity*, 85-98. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9190-4_8
3. Aksoy, Y., Aksoy, H., Altinkaynak, K., Aydin, H. R. & Ozkan, A. (2006). Sperm fatty acid composition in subfertile men. Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids. *Sciencedirect*, 75(2): 75-79. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.05.002>
4. Allai, L., Benmoula, A., da Silva, M. M., Nasser, B., & El Amiri, B. (2018). Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*, 192, 6-17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.014>
5. Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani Nashtaei, M., Khodarahmian, M., & Nekoonam, S. (2016). The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and tissue banking*, 17, 745-756. <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9566-5>
6. Al-Amery, K. S., & Banana, H. J. (2020). Effect of adding aqueous and alcoholic extract of bee pollen on semen characteristics of Awassi ram semen stored at 5° C. *Biochemical & Cellular Archives*, 20(1). . <https://doi.org/10.35124/bca.2020.1.723>
7. Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91(2), 179-194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
8. Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
9. Chen, S., Fang, L., Xi, H., Guan, L., Fang, J., Liu, Y., Wu, B., & Li, S. (2012). Simultaneous qualitative assessment and quantitative analysis of flavonoids in various tissues of lotus (*Nelumbo nucifera*) using high performance liquid chromatography coupled with triple quad mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 724, 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.02.047>
10. Chen, Z., Xi, G., Fu, Y., Wang, Q., Cai, L., Zhao, Z., Liu, Q., Bai, B., & Ma, Y. (2021). Synthesis of 2, 3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one from maltol and its taste identification. *Food Chemistry*, 361, 130052. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130052>
11. Das, A. B., Goud, V. V., & Das, C. (2019). Phenolic compounds as functional ingredients in beverages. In *Value-added ingredients and enrichments of beverages* (pp. 285-323): Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816687-1.00009-6>
12. Dayrit, F. M. (2015). The properties of lauric acid and their significance in coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2562-7>
13. De Luca, M. N., Colone, M., Gambioli, R., Stringaro, A., & Unfer, V. (2021). Oxidative stress and male fertility: role of antioxidants and inositols. *Antioxidants*, 10(8), 1283. <https://doi.org/10.3390/antiox10081283>
14. Díaz, R., Torres, M., Bravo, S., Sanchez, R., & Sepúlveda, N. (2016). Determination of fatty acid profile in ram spermatozoa and seminal plasma. *Andrologia*, 48(6), 723-726. <https://doi.org/10.1111/and.12506>
15. Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 407-421). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H)
16. Evans, G., & Maxwell, W. C. (1987). Salamons' artificial insemination of sheep and goats.
17. Fry, C. J., & Peterson, C. L. (2001). Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Current Biology*, 11(5), R185-R197. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00090-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00090-2)
18. Gholami, H., Chamani, M., Towhidi, A., & Fazeli, M. H. (2011). Improvement of semen quality in holstein bulls during heat stress by dietary supplementation of omega-3 fatty acids. *International journal of fertility & sterility*, 4(4), 160.
19. Gurung, A. B., Ali, M. A., Al-Hemaid, F., El-Zaidy, M., & Lee, J. (2022). In silico analyses of major active constituents of fingerroot (*Boesenbergia rotunda*) unveils inhibitory activities against SARS-CoV-2 main protease enzyme. *Saudi journal of biological sciences*, 29(1), 65-74. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.053>

20. Hancock, J. (1952). The morphology of bull spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, 29(3), 445-453. <https://doi.org/10.1242/jeb.29.3.445>
21. Haydak, M. H. (1970). Honey bee nutrition. *Annual review of entomology*, 15(1), 143-156. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.15.010170.001043>
22. Huang, A., Isobe, N., Obitsu, T., & Yoshimura, Y. (2016). Expression of lipases and lipid receptors in sperm storage tubules and possible role of fatty acids in sperm survival in the hen oviduct. *Theriogenology*, 85(7), 1334-1342. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.020>
23. Ijaz, M. U., Shahzadi, S., Hamza, A., Azmat, R., Anwar, H., Afsar, T., Shafique, H., Bhat, M. A., Naglah, A. M., & Al-Omar, M. A. (2023). Alleviative effects of pinostrobin against cadmium-induced renal toxicity in rats by reducing oxidative stress, apoptosis, inflammation, and mitochondrial dysfunction. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1175008. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1175008>
24. Johnson, L. V., Walsh, M. L., & Chen, L. B. (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(2), 990-994. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.2.990>
25. Kanchanapiboon, J., Kongsu, U., Pattamadilok, D., Kamponchaidet, S., Wachisunthon, D., Poonsatha, S., & Tuntoaw, S. (2020). Boesenbergia rotunda extract inhibits Candida albicans biofilm formation by pinostrobin and pinocembrin. *Journal of Ethnopharmacology*, 261, 113193. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113193>
26. Kiernan, M., Fahey, A., & Fair, S. (2013). The effect of the in vitro supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(6), 947-954. <https://doi.org/10.1071/RD12204>
27. Leja, M., Mareczek, A., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J., & Czekońska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food chemistry*, 100(1), 237-240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.047>
28. Lenzi, A., Gandini, L., Maresca, V., Rago, R., Sgro, P., Dondero, F., & Picardo, M. (2000). Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. *Molecular human reproduction*, 6(3), 226-231. <https://doi.org/10.1093/molehr/6.3.226>
29. Lima, E., & Abdalla, D. S. P. (2001). Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci*, 37(3), 293-303.
30. Linford, E., Glover, F.A., Bishop, C. & Stewart, D.L. (1976). The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bulls. *Reproduction and Fertility*, 47: 283-291. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0470283>
31. MAIA, M. d. S., & Bicudo, S. (2009). Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão.
32. Maxwell, W., & Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 613-638. <https://doi.org/10.1071/RD9930613>
33. Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N.-K., & Zawawi, N. (2020). Botanical origin and nutritional values of bee bread of stingless bee (*Heterotrigona itama*) from Malaysia. *Journal of Food Quality*, 2020(1), 2845757. <https://doi.org/10.1155/2020/2845757>
34. Nemati, Z., Sattari, M., Karimi, A., Besharati, M., & Kamrani, N. (2022). Improving of frozen-thawed sperm quality in commercial broiler breeder roosters challenged with dexamethasone using diet vitamin E supplementation. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 14(1), 109-120. <https://doi.org/10.22067/IJASR.2021.68725.1007>
35. Partyka, A., Łukaszewicz, E., & Niżański, W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, 77(8), 1497-1504. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.006>
36. Raeeszadeh, M., Karimfar, B., Amiri, A. A., & Akbari, A. (2021). Protective Effect of Nano-Vitamin C on Infertility due to Oxidative Stress Induced by Lead and Arsenic in Male Rats. *Journal of Chemistry*, 2021(1), 9589345. <https://doi.org/10.1155/2021/9589345> (in persian)
37. Revell, S., & Mrode, R. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2), 77-86. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)90055-8)
38. Salamon, S., & Maxwell, W. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3-4), 185-249. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01327-i](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-i)

39. Rafeie, F., Abdoli, R., Hossein-Zadeh, N.G. et al. (2023). Interaction networks and pathway analysis of genetic resistance to gastrointestinal nematodes in sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 55, 34. <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03448-5>
40. Rodríguez-Pólit, C., Gonzalez-Pastor, R., Heredia-Moya, J., Carrera-Pacheco, S. E., Castillo-Solis, F., Vallejo-Imbaquingo, R., Barba-Ostria, C., & Guamán, L. P. (2023). Chemical properties and biological activity of bee pollen. *Molecules*, 28(23), 7768. <https://doi.org/10.3390/molecules28237768>
41. Šarić, A., Balog, T., Sobočanec, S., Kušić, B., Šverko, V., Rusak, G., Likić, S., Bubalo, D., Pinto, B., & Reali, D. (2009). Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, 47(3), 547-557. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.12.007>
42. Schuster, R., Holzer, W., Doerfler, H., Weckwerth, W., Viernstein, H., Okonogi, S., & Mueller, M. (2016). *Cajanus cajan*—a source of PPAR γ activators leading to anti-inflammatory and cytotoxic effects. *Food & function*, 7(9), 3798-3806. <https://doi.org/10.1039/c6fo00689b>
43. Shahin, M. A., Khalil, W. A., Saadeldin, I. M., Swelum, A. A.-A., & El-Harairy, M. A. (2020). Comparison between the effects of adding vitamins, trace elements, and nanoparticles to shotor extender on the cryopreservation of dromedary camel epididymal spermatozoa. *Animals*, 10(1), 78. <https://doi.org/10.3390/ani10010078>
44. Silva, P., & Gadella, B. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958-978. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
45. Sinclair, S. (2000). Male infertility: nutritional and environmental considerations. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 5(1), 28-38.
46. Sinha, M., Sinha, A., Singh, B., & Prasad, R. (1996). The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal Reproduction Science*, 41(3-4), 237-243. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(95\)01450-0](https://doi.org/10.1016/0378-4320(95)01450-0)
47. Sopanaporn, J., Suksawatamnuay, S., Sardikin, A., Lengwittaya, R., Chavasiri, W., Miyakawa, T., & Yompakdee, C. (2020). Pinostrobin suppresses the Ca²⁺-signal-dependent growth arrest in yeast by inhibiting the Swe1-mediated G2 cell-cycle regulation. *FEMS yeast research*, 20(4), foaa026. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa026>
48. Wang, H., Gao, X. D., Zhou, G. C., Cai, L., & Yao, W. B. (2008). In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food chemistry*, 106(3), 888-895. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.068>
49. Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60, 481-492. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3)
50. Wojdyło, A., Oszmianski, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
51. Xu, X., Sun, L., Dong, J., & Zhang, H. (2009). Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon dioxide. *Innovative food science & emerging technologies*, 10(1), 42-46. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.08.004>
52. Yanishlieva, N. V., & Marinova, E. M. (1996). Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 203, 220-223. <https://doi.org/10.1007/bf01192867>
53. Yıldız, O., Can, Z., Saral, Ö., Yuluğ, E., Öztürk, F., Aliyazıcıoğlu, R., Canpolat, S., & Kolaylı, S. (2013). Hepatoprotective potential of chestnut bee pollen on carbon tetrachloride-induced hepatic damages in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 461478. <https://doi.org/10.1155/2013/461478>
54. Yonis, M., & Hassan, A. (2023). The Effect of adding bee pollen on the sexual efficiency of quail males. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, 8(1), 32-37. <https://doi.org/10.21608/javs.2022.164168.1180>
55. Yousif, A. I., Abd-Elaziz, M. A. & Shehabeldin, A. M. (2024). Nano-oleic Acid in Tris-Extender: Effects on Bull Sperm Cryopreservation, Fertility, and Post-thaw Antioxidant Status. *Journal of Sustainable Agricultural and Environmental Sciences*, 3(4): 9-18. <https://doi.org/10.21608/jsaes.2024.299701.1091>

Introduction

Artificial insemination (AI) is a widely used technique in animal breeding that utilizes both fresh and frozen-thawed semen. Sperm preservation is crucial in various fields, including AI, species conservation, and clinical applications (Watson, 1995). The use of frozen-thawed ram semen, in particular, helps overcome geographical limitations, supports the conservation of endangered breeds, and contributes to biodiversity preservation (Leboeuf *et al.*, 1998).

A major challenge in sperm preservation is oxidative stress, which arises during the freezing process (Koopers *et al.*, 2008). Oxidative stress negatively impacts sperm quality by inducing lipid peroxidation, protein damage, and DNA fragmentation. These effects collectively reduce sperm functionality and overall semen quality (Aitken *et al.*, 2016).

Antioxidants are compounds that mitigate oxidative stress by neutralizing free radicals and reactive oxygen species (ROS), thereby preventing oxidative cellular damage (Maestri *et al.*, 2006). Consequently, antioxidants have been extensively studied as protective agents in sperm preservation (Scheibmeir *et al.*, 2005). Among the various antioxidant compounds, those of natural origin, such as bee pollen, have garnered particular interest. Bee pollen is rich in polyphenols and flavonoids, both of which are powerful natural antioxidants. Flavonoids, in particular, possess redox properties that enable them to effectively scavenge free radicals and prevent the oxidation of lipids, proteins, and other cellular components (Rodriguez-Polite *et al.*, 2023).

This study aimed to investigate the effects of different concentrations of methanolic bee pollen extract on the quality of Zel ram sperm after both liquid storage and cryopreservation.

Materials and Methods

Semen was collected twice a week from four adult Zel rams using an artificial vagina. After the initial evaluation, ejaculates were pooled to eliminate individual variation. The pooled semen was diluted in a Tris-egg yolk extender containing 0 (control), 5, 10, or 15 mg/mL methanolic bee pollen extract. Additional treatments included 0.1 mM vitamin E (positive control) and 5 μ L DMSO (solvent control).

Samples were stored at 4°C for 0, 24, 48, and 72 hours and then frozen in straws filled with extender containing 6.5% glycerol. After 14 days of storage in liquid nitrogen (−196°C), samples were thawed at 37°C for 30 seconds.

Post-thaw assessments included sperm motility (visual observation), viability (Eosin-Nigrosin staining), plasma membrane integrity (Hypo-Osmotic Swelling Test), morphology (Hancock solution), mitochondrial activity (Rhodamine 123), and lipid peroxidation levels (measured by malondialdehyde, MDA). Data were analyzed using a completely randomized design in SAS (version 9.2) with the General Linear Model (GLM), and treatment means were compared using Tukey's test ($P < 0.05$).

Results and Discussion

Bee pollen is rich in flavonoids, phenolic compounds, and fatty acids, contributing to its potent antioxidant properties and its protective role against oxidative stress in sperm cells (Yıldız *et al.*, 2013; Agarwal *et al.*, 2014). This study investigated the effects of methanolic bee pollen extract on ram sperm quality during short-term cold storage and after cryopreservation. Significant improvements were observed in sperm appearance, viability, morphology, membrane integrity, mitochondrial activity, and reduced MDA concentration at 24, 48, and 72 hours in treated samples compared to the control group ($P < 0.05$).

Among the tested concentrations, 5 mg/mL consistently showed the most favorable outcomes, demonstrating the highest motility and mitochondrial activity at 24 hours, superior membrane integrity, motility, morphology, and viability at 48 hours, and sustained improvement in motility, membrane integrity, and viability at 72 hours. Additionally, this concentration maintained the lowest

MDA levels across all time points, indicating strong protection against lipid peroxidation and oxidative damage (Chen *et al.*, 2020; Blokhina *et al.*, 2003).

While the 10 mg/mL concentration effectively improved sperm morphology at 24 and 72 hours and preserved mitochondrial activity at 72 hours, the 15 mg/mL extract exhibited the highest membrane integrity at 24 hours and the greatest mitochondrial activity at 48 hours. After 10 days of cryostorage, all concentrations (5, 10, and 15 mg/mL) positively influenced post-thaw sperm parameters. However, the 15 mg/mL extract yielded the best results in terms of post-thaw viability, membrane integrity, morphology, and overall survival, whereas the 5 mg/mL concentration maintained the highest mitochondrial activity and lowest MDA levels, emphasizing its strong antioxidant capacity. These findings are consistent with previous reports on the effectiveness of bee pollen's bioactive compounds, regardless of extraction solvent, in preserving sperm quality under oxidative stress (Al-Amery & Banana, 2020).

Conclusion

Methanolic bee pollen extract at concentrations of 5, 10, and 15 mg/mL significantly improved the post-cold storage and post-thaw semen quality of Zel rams. Among these concentrations, the 5 mg/mL concentration demonstrated the most favorable outcomes in terms of sperm motility, mitochondrial activity, and protection against oxidative damage, with a lower risk of cytotoxicity. Therefore, the 5 mg/mL concentration is recommended as an effective and safe natural additive for semen extenders in sperm cold storage and cryopreservation.

مجله علمی پژوهشی