



تولیات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۶

صفحه‌های ۲۴۴-۲۳۳

مقایسه تاثیر آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ زیتون با ویتامین‌های C و E بر شاخص‌های کیفی اسپرم گاو

شهین مظاهری^۱، علی کیانی^{۲*}، آرش خردمند^۳، مسعود علیرضایی^۴

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد- ایران.

۲. دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد- ایران.

۳. دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد- ایران.

۴. دانشیار گروه علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد- ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۰۵

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۰۷

چکیده

در این تحقیق اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ زیتون در مقایسه با ویتامین‌های C و E در اسپرم سرد شده گاو در طی مدت ۴۸ ساعت نگهداری در شرایط دمایی پنج درجه سانتیگراد مقایسه شد. اسپرم از قسمت دم اپیدیدیم بیضه ۱۰ رأس گاو نر نژاد هولشتاین دورگ با میانگین سنی سه تا پنج سال جمع‌آوری و با افزودن رقیق‌کننده تخم‌مرغ و سترات سدیم حاوی عصاره برگ زیتون (در سه غلظت نیم، یک و دو میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و ویتامین‌های E و C (هرکدام با غلظت دو میلی‌گرم در میلی‌لیتر) رقیق شدند. افزودن عصاره برگ زیتون به رقیق‌کننده، تحرک اسپرم را کاهش داد ($P < 0.05$). سلامت غشا اسپرم گاو استفاده از ویتامین E بالاتر از سایر تیمارها بود ($P < 0.05$). میزان پراکسیداسیون چربی‌ها در تیمار حاوی دو میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره برگ زیتون کمتر از سایر تیمارها بود ($P < 0.05$). نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن عصاره برگ زیتون به رقیق‌کننده اسپرم در طی مدت ۴۸ ساعت نگهداری در شرایط دمایی پنج درجه سانتیگراد علیرغم کاهش میزان اکسیداسیون لیپیدی موجب کاهش تحرک اسپرم گاو می‌شود و بنابراین ترکیب مناسبی برای استفاده در رقیق‌کننده‌های اسپرم گاو نمی‌باشد.

کلیدواژه‌ها: اسید تیوباریتوریک، اولتوروپین، اسپرم، پراکسیداسیون، گاو

مقدمه

در غشای سلول اسپرم اسیدهای چرب به فسفولیپیدهای غشاء متصل هستند و دو عمل عمده یعنی حفظ یکپارچگی ساختار غشاء و تأمین سوسترای قابل اکسیداسیون برای اسپرم را بر عهده دارند [۱۱]. اسپرم گاو نر در مقایسه با سایر پستانداران دارای اسیدهای چرب غیراشباع بیشتر و کلسترول کمتر می‌باشد که آن را بیشتر مستعد فرایند پراکسیداسیون لیپیدی می‌کند [۱۵]. از آنجا که اسپرم گاو دارای نسبت بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع می‌باشد، لذا حساسیت به شوک سرمایی در آن زیاد است. از طرف دیگر نسبت بالای غیر اشباع بودن پیوندهای فسفولیپیدی، آسیب غشای اسپرم را به دلیل اکسیداسیون ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن طی فرآوری مایع منی افزایش می‌دهد. سلول‌های اسپرم طی روند اسپرماتوژنز حجم عمده‌ای از سیتوپلاسم خود را از دست داده، بنابراین در مقایسه با سلول‌های سوماتیکی دارای مواد آنتی‌اکسیدان کمتری هستند و چنانچه پلاسمای مایع اسپرمی که حاوی انواع زیادی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی است، از آن جدا شود شرایط بسیار نامساعد برای سلول‌ها ایجاد می‌شود که پیامد آن هجوم رادیکال‌های آزاد خواهد بود.

رادیکال‌های آزاد مولکول‌هایی هستند که آخرین لایه الکترونی آنها تکمیل نبوده و به همین دلیل به لحاظ شیمیایی فعال‌تر از دیگر مولکول‌ها می‌باشند. این رادیکال‌ها سبب پراکسیداسیون چربی، آسیب به DNA و پروتئین‌های اسپرم شده و در نهایت منجر به مرگ سلول اسپرم می‌شوند. مکانیسم آسیبی القاء شده به وسیله رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر غشای اسپرم‌ها، پراکسیداسیون چربی‌ها نام دارد که با استرس اکسیداتیو در اثر عواملی مانند نگهداری در سرما ایجاد می‌شود. پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم باعث آسیب‌دیدگی غشای سلول اسپرم و متعاقب آن

کاهش تحرک، زنده ماندن، اختلال در سیگنال‌های خارج و داخل سلولی، افزایش ناهنجاری مورفولوژیکی اسپرم، آسیب‌دیدگی DNA و کاهش موفقیت فرایند لقاح و معیوب شدن عملکردهای سلولی می‌شود [۵]. بنابراین در نگهداری اسپرم حتی در دماهای پائین، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها ضروری است.

برگ درخت زیتون حاوی غلظت بالایی از آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله اولئوروپئین می‌باشد که یک ترکیب فنلی است [۱۳ و ۱۰]. عصاره برگ زیتون شامل مواد قندی، مواد رزینی، موم، کلروفیل، تانن، ساپونین‌ها، اسید گالیک، مانیت و سه نوع الکل به نام‌های اولئاس ترول، اولئاس ترانول و هموولئاس ترانول می‌باشد. ترکیباتی نظیر اولئوروپئین، هیدروکسی تیروزول و اولروپئوزید می‌توانند ترکیبات رادیکال‌های آزاد را جمع کنند و از اکسیداسیون شیمیایی LDL جلوگیری کنند [۱۷]. میزان ترکیبات فنلی عصاره برگ زیتون برابر با $0.33 \pm 0.196/6$ میلی گرم در هر گرم از عصاره براساس میزان اسید گالیک بعنوان استاندارد می‌باشد [۱۶]. ترکیبات فنلی عصاره برگ زیتون شامل اولئوروپئین (۳۵۶ میلی گرم در گرم)، تیروزول (۳/۷۳ میلی گرم در گرم)، هیدروکسی تیروزول (۴/۸۹ میلی گرم در گرم) و کافئیک اسید (۴۹/۴۱ میلی گرم در گرم) می‌باشد [۶]. اولئوروپئین مهمترین ترکیب فنلی برگ زیتون است. مشخص شده که میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ زیتون تقریباً دو برابر چای سبز و چهار برابر بیشتر از ویتامین C است [۱۲].

علی‌رغم اینکه عصاره برگ زیتون دارای مقادیر زیادی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است ولی اطلاعات کمی در ارتباط با خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ زیتون در بهبود خصوصیات سلول اسپرم گاو وجود دارد. از طرف دیگر تأثیر عصاره برگ زیتون در حفاظت از اسپرم در شرایط استرس اکسیداتیو ناشی از نگهداری در سرما

تولیدات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۶

مقایسه تاثیر آنتی اکسیدانی عصاره برگ زیتون با ویتامین های C و E بر شاخص های کیفی اسپرم گاو

میلی لیتر ویتامین E و رقیق کننده حاوی ۰/۵ یک و دو میلی گرم در میلی لیتر عصاره برگ زیتون بودند. عصاره مورد استفاده به صورت پودر فریز شده بوده که پس از اندازه گیری براحتی در داخل سالین نرمال حل شد. مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر اسپرم به هریک از رقیق کننده ها اضافه شد. سپس نمونه ها در دمای پنج درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. درصد تحرک اسپرم، سلامت غشاء و غلظت مواد واکنش دهنده با تیوباربتوریک اسید بعنوان شاخصی برای میزان پراکسیداسیون غشایی در ساعات صفر، شش، ۲۴ و ۴۸ اندازه گیری شدند.

جهت ارزیابی تحرک اسپرم، مقدار ۱۰ میکرو لیتر از هر تیمار توسط میکرو پیپتور برداشته و روی لام ریخته و سپس لامل روی آن قرار داده شد. با استفاده از میکروسکوپ نوری (CX31 الیمپوس، توکیو، ژاپن) با درشت نمایی ۴۰ تحرک اسپرم ها بررسی شد. تخمین درصد حرکت اسپرم ها بر اساس مشاهده حرکات در چهار نقطه متفاوت از لام و با شمارش حداقل ۱۰۰ اسپرم انجام شد [۲۱].

جهت ارزیابی سلامت غشای اسپرم از آزمون HOS (تورم در محیط پر فشار) استفاده شد. به این منظور مقدار ۱۰ میکرو لیتر از اسپرم به ۰/۴ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت پنج دقیقه داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس درصد اسپرم های دارای دم خمیده (به عنوان غشای سالم) با استفاده از میکروسکوپ نوری و بزرگ نمایی ۴۰ محاسبه شدند. اسپرم های دارای دم خمیده، تحت عنوان HOS مثبت در نظر گرفته شدند [۲۰]. برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از روش اندازه گیری اسید تیوباربتوریک استفاده شد [۲۲]. در این روش ۸۰ میکرو لیتر از محلول بالایی نمونه ها (پلاسمای اسپرم) با ۲۰ سی سی آب دوبار تقطیر و ۲۰ سی سی سرم

نامشخص است. هدف از این تحقیق، مقایسه اثرات حفاظتی و آنتی اکسیدانی عصاره برگ زیتون با ویتامین های E و C، بر تحرک اسپرم، سلامت غشاء و پراکسیداسیون چربی غشای سلول اسپرم گاو نگهداری شده در دمای پنج درجه سانتی گراد بود.

مواد و روش ها

عصاره الکلی برگ زیتون از برگ های درخت زیتون (وارته *Olea europaea Sevilano*) شهرستان خرم آباد تهیه شد. عصاره گیری در مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی (لرستان، ایران) انجام گرفت. نمونه های اسپرم از بیضه های ۱۰ رأس گاو نژاد هولشتاین دورگ با میانگین سنی سه تا پنج سال و در پنج هفته پیاپی (هر هفته دو نمونه بیضه) از کشتارگاه صنعتی گلشن شهرستان خرم آباد تهیه شدند. بیضه ها در سریعترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شده و سپس تا زمان آماده سازی نمونه ها در بن ماری نگهداری می شدند. سپس دم اپی دیدیم با قیچی بریده شده و پس از جداسازی چربی و بافت های اضافه آن، در داخل دو سی سی سرم فیزیولوژی گرم خرد شده و جهت آزاد سازی بیشتر اسپرم ها از قطعات خرد شده دم اپی دیدیم، نمونه ها بمدت ۱۵ دقیقه در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. بدنبال آن نمونه های اسپرم بداخل محیط رقیق کننده حاوی زرده تخم مرغ - سیترات ۲/۹ درصد (به نسبت یک به دو) منتقل شدند. زرده تخم مرغ (Cat No:K93438984)، سیترات سدیم (Cat No:A686099327) و اسید آسکوربیک از شرکت مرک آلمان و ویتامین E از شرکت داروسازی اسوه (تهران، ایران) تهیه شدند.

شش تیمار آزمایشی عبارت بودند از رقیق کننده بدون افزودن آنتی اکسیدان (شاهد) رقیق کننده حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین C، رقیق کننده حاوی دو میلی گرم در

تولیدات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۶

$$y_{ij} = \mu + T_i + M_j + EM_{ij} + e_{ij} \quad (\text{رابطه ۱})$$

که در آن μ ، میانگین کل؛ T_i ، اثر ثابت i امین تیمار؛ M_j ، اثر ثابت j امین زمان؛ EM_{ij} ، اثر متقابل تیمار و زمان و e_{ij} ، اثر خطای آزمایش است.

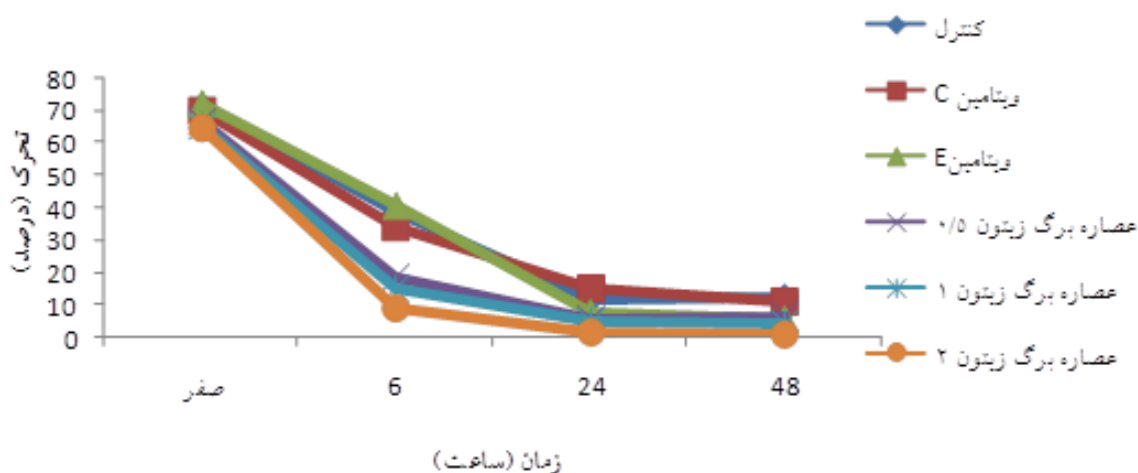
نتایج و بحث

تحرك اسپرم ها با افزایش زمان نگهداری کاهش یافت ($P < 0/05$ ؛ شکل ۱). تحرك اسپرم ها در تیمارهای مختلف در ساعت صفر نگهداری تفاوتی نداشتند. تحرك اسپرم در شش، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از نگهداری، در تیمارهای حاوی عصاره برگ زیتون کمتر از گروه شاهد و ویتامین ها بود ($P < 0/05$).

تحرك اسپرم ها در تیمارهای حاوی عصاره برگ زیتون سایر تیمارها کمتر بود ($P < 0/05$). میزان تحرك اسپرم در تیمارها با غلظت های متفاوت عصاره برگ اختلاف معنی داری با هم نداشتند (شکل ۲).

فیزیولوژی رقیق شد و در بن ماری ۳۷ درجه به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. سپس ۷۸۰ میکرولیتر محلول یک درصد تیوباریبوتیک اسید و ۶۰۰ میکرولیتر محلول اسیدی تری کلرو استیک (۶/۶ میلی لیتر اسید کلریدریک و ۱۲/۵ گرم تری کلرو استیک اسید در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد) به نمونه اضافه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی گراد جوشانده شد. پس از ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد سرد شد و در x طول موج ۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریوژ شد. میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (52000UV Model; WPA, Cambridge, UK) و به صورت نانومول در میلی لیتر بیان شد.

داده ها در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی (رابطه ۱) و با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ رویه GLM تجزیه و میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح پنج درصد مقایسه شدند.

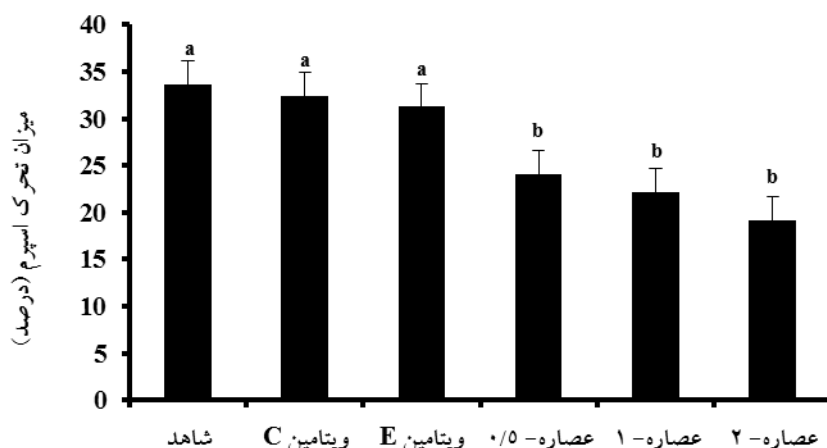


شکل ۱. تحرك در اسپرم گاو حاوی عصاره برگ زیتون (با غلظت های ۰/۵، یک و دو میلی گرم در میلی لیتر)، ویتامین E و ویتامین C در زمان های مختلف نگهداری در دمای پنج درجه سانتیگراد

تولیدات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۶

مقایسه تاثیر آنتی اکسیدانی عصاره برگ زیتون با ویتامین های C و E بر شاخص های کیفی اسپرم گاو



شکل ۲. میانگین ۴۸ ساعته درصد تحرک اسپرم

تیمار شاهد: نمونه اسپرم بدون افزودن آنتی اکسیدان، ویتامین C: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین C، ویتامین E: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین E و سه تیمار عصاره-0/5، عصاره-1 و عصاره-2 که به ترتیب حاوی 0/5، یک و دو میلی گرم در میلی لیتر عصاره برگ زیتون. تفاوت میانگین ها با حروف غیرمشابه معنی دار است ($P < 0/05$).

سایرین می تواند مربوط به روش استفاده از عصاره باشد. در این پژوهش عصاره برگ زیتون به طور مستقیم به اسپرم اضافه شد در حالیکه در آزمایش های صورت گرفته با رت این عصاره به موش های صحرایی خوراندند شد. به عنوان نمونه در مطالعه ای نشان داده شد که خوراندن عصاره برگ زیتون به رت ها سبب افزایش تحرک اسپرم ها می شود [۱]. لذا اثرات عصاره برگ زیتون بر تحرک اسپرم گاو ممکن است به دلیل افزودن مستقیم این عصاره به اسپرم رخ داده باشد.

عصاره برگ زیتون شامل ترکیبات مختلفی بوده که مهمترین آنها اولئوروپتین بعنوان یک ماده آنتی اکسیدانی می باشد. اما تفاوت مطالعه حاضر با مطالعات دیگران، افزودن مستقیم این عصاره بداخل نمونه های اسپرم است. درحالی که در مطالعات دیگر این عصاره به حیوانات خوراندند شده است، لذا سایر ترکیبات فنلی داخل عصاره توسط کبد سم زدایی می شوند. اما در اضافه کردن مستقیم عصاره به اسپرم، این سم زدایی انجام نمی شود و لذا احتمالاً نتایج بدست آمده مبنی بر کاهش تحرک اسپرم متعاقب

برگ های زیتون دارای متابولیت های ثانویه ای چون تانن، ساپونین، استروئید، آلکالوئید، استرول غیراشباع و ترپن است. علاوه بر این تحقیقات نشان داده که الئونولیک اسید (موجود در عصاره برگ زیتون) در شرایط آزمایشگاهی می تواند از تحرک اسپرم موش جلوگیری کند و اثرات زیان آوری روی تولیدمثل جنس نر داشته باشد. در مطالعه ای ثابت شد الئونولیک اسید دارای عمل سینرژیک با اثرات اسپرم کشی ساپونین است [۹]. مطالعه حاضر نشان داد که افزودن عصاره برگ زیتون به رقیق کننده اسپرم گاو میزان تحرک اسپرم را کاهش می دهد. مطالعات انجام شده بر روی موش صحرایی نتایج متفاوتی را نشان داده است [۱]. در پژوهش دیگری عصاره هیدروالکلی زیتون در غلظت های ۵۰، ۱۵۰ و ۴۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سبب کاهش وزن بیضه چپ، هورمون تستوسترون، تعداد و تحرک اسپرم در رت گردید [۱۴].

در مطالعه ای دیگر گزارش شده است که غلظت ۰/۴ میلی لیتر عصاره زیتون تأثیری بر تحرک و غلظت اسپرم نداشت [۱۹]. یکی از دلایل تفاوت نتایج طرح حاضر با

تولیدات دامی

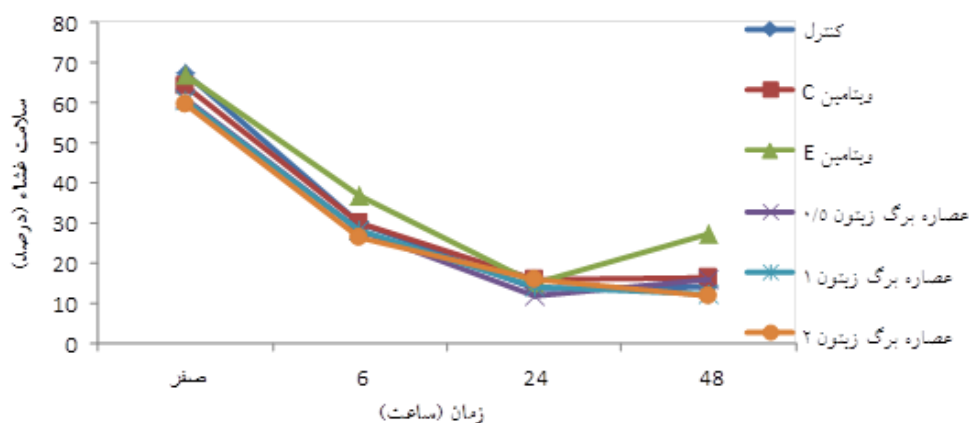
دوره ۱۹ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۶

بین تیمارها مشاهده نشد. در ساعت ۴۸ نگهداری، سلامت غشای اسپرم در رقیق‌کننده حاوی ویتامین E از سایر تیمارها بالاتر بود ($P < 0/05$).

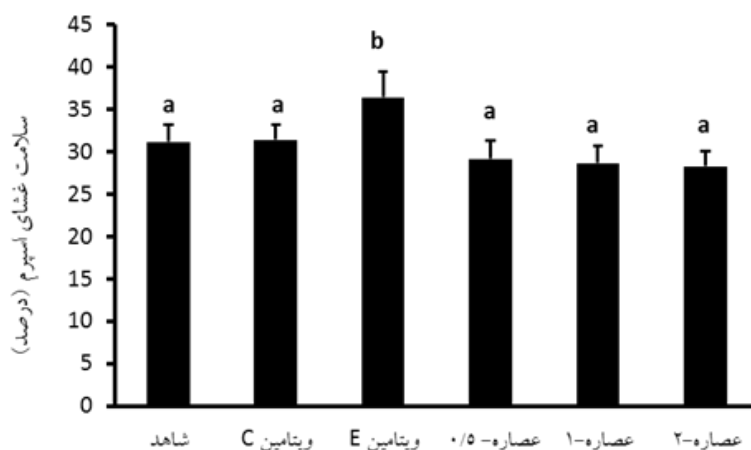
سلامت غشای اسپرم در تیمارهای حاوی عصاره برگ زیتون تفاوتی با این صفت در رقیق‌کننده شاهد و با رقیق‌کننده حاوی ویتامین C نداشت (شکل ۴). درحالی‌که تیمار حاوی ویتامین E توانست سلامت غشاء را نسبت به دیگر تیمارها افزایش دهد ($P < 0/05$).

استفاده از عصاره برگ زیتون به همین دلیل باشد. در همین راستا تحقیق حاضر نشان داد که افزودن مستقیم عصاره برگ زیتون به اسپرم‌ها برخلاف سایر آنتی‌اکسیدان‌های دیگر روش مطلوبی نبوده و دارای اثرات منفی بر روی تحرک اسپرم‌ها می‌باشد.

سلامت غشای اسپرم با افزایش زمان نگهداری در همه تیمارها به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$)، شکل ۳). اما در ساعت‌های صفر، شش و ۲۴ تفاوت معنی‌داری



شکل ۳. میزان سلامت غشاء در اسپرم گاو حاوی عصاره برگ زیتون (با غلظت های ۰/۵، یک و دو میلی گرم در میلی لیتر) و ویتامین E و C در زمان های مختلف نگهداری در دمای پنج درجه سانتیگراد



شکل ۴. درصد سلامت غشای اسپرم

تیمار شاهد: نمونه اسپرم بدون افزودن آنتی‌اکسیدان، ویتامین C: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین C، ویتامین E: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین E و سه تیمار عصاره-۰/۵، عصاره-۱ و عصاره-۲ که به ترتیب حاوی ۰/۵، یک و دو میلی لیتر عصاره برگ زیتون. a-c: تفاوت میانگین‌ها با حروف غیرمشابه معنی‌دار است ($P < 0/05$).

تولیدات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۶

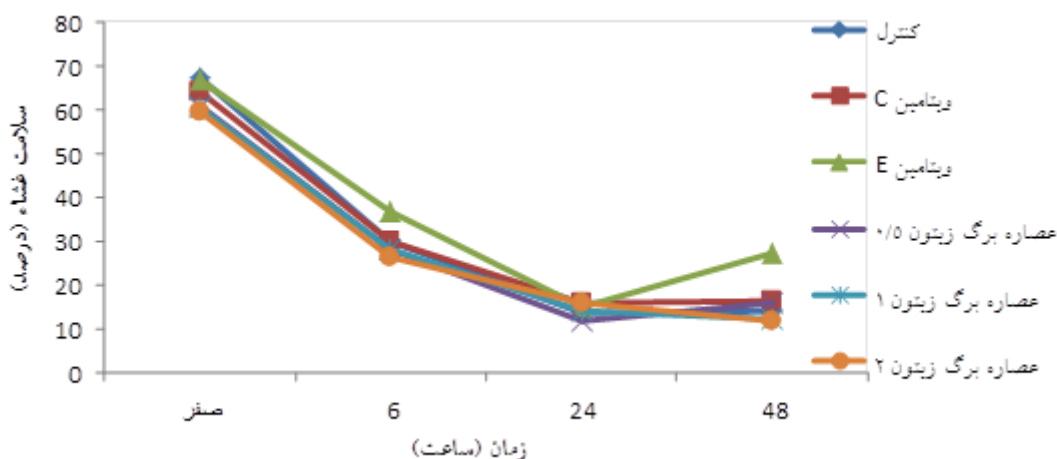
مقایسه تاثیر آنتی اکسیدانی عصاره برگ زیتون با ویتامین های C و E بر شاخص های کیفی اسپرم گاو

علاوه بر این اولئوروپتین باعث پیشگیری از استرس اکسیداتیو شده و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می دهد و باعث افزایش تحرک اسپرم، حفظ تمامیت غشاء و به دنبال آن افزایش قابلیت زنده ماننی اسپرم می شود [۱].

غلظت مواد واکنش دهنده با تیوباربتوریک اسید در زمان های مختلف در دوره ۴۸ ساعته نگهداری در شکل ۵ نشان داده شده است. در زمان های صفر، شش و ۲۴ ساعت پس از نگهداری، غلظت مواد واکنش دهنده با تیوباربتوریک اسید در رقیق کننده حاوی دو میلی گرم عصاره برگ زیتون کمتر از سایر رقیق کننده ها بود ($P < 0/05$).

سلامت غشای اسپرم در تیمارهای حاوی عصاره برگ زیتون تفاوتی با این صفت در رقیق کننده شاهد و با رقیق کننده حاوی ویتامین C نداشت (شکل ۴). در حالی که تیمار حاوی ویتامین E توانست سلامت غشاء را نسبت به دیگر تیمارها افزایش دهد ($P < 0/05$).

سلامت غشای اسپرم در تیمارهای حاوی عصاره برگ زیتون، تفاوت معنی داری با تیمار شاهد و ویتامین C نداشت در حالی که تیمار ویتامین E توانست سلامت غشاء را در ۴۸ ساعت پس از نگهداری نسبت به دیگر تیمارها افزایش دهد. سردسازی و انجماد، تغییر فازهای لیپیدی غشاء را در اسپرم تحریک می کند و به تغییر پایداری و ساختار غشاء می انجامد که با صدمه به اسپرم و کاهش توانایی باروری همراه است. تولید بیش از اندازه رادیکال های آزاد به موجب افزایش پراکسیداسیون چربی های غشای اسپرم می شود [۱۸]. از دست دادن یکپارچگی غشاء باعث افزایش نفوذپذیری غشاء و توانایی نداشتن در تنظیم غلظت های درون سلولی یون های درگیر در کنترل حرکات اسپرم می شود [۵]. نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو ناشی از اتانول در بیضه موش صحرایی ممکن است با ترکیب فنولیک زیتون (اولئوروپتین) به وسیله اثرات آنتی اکسیدانی و متوقف کردن استرس اکسیداتیو به طور موفقیت آمیز درمان شود.

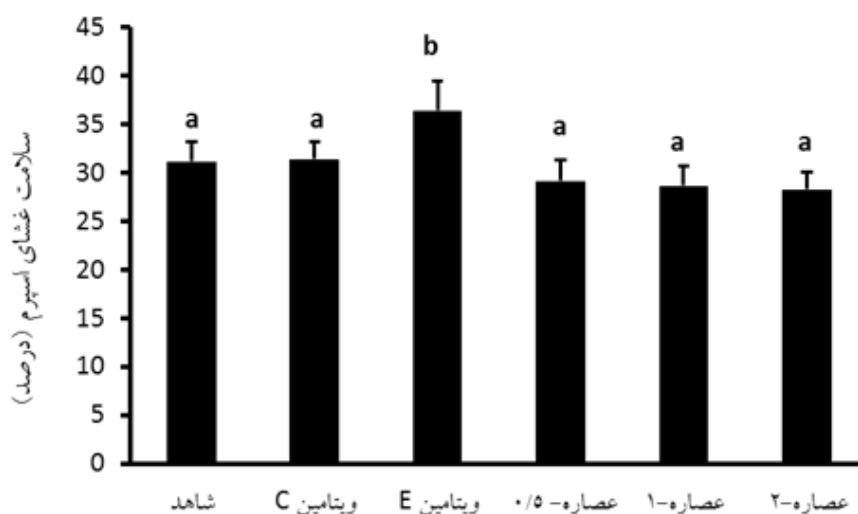


شکل ۳. میزان سلامت غشاء در اسپرم گاو حاوی عصاره برگ زیتون (با غلظت های ۰/۵، یک و دو میلی گرم در میلی لیتر) و ویتامین E و C در زمان های مختلف نگهداری در دمای پنج درجه سانتیگراد

تولیدات دائمی

دوره ۱۹ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۶

شهین مظاهری، علی کیانی، آرش خردمند، مسعود علیرضایی



شکل ۴. درصد سلامت غشای اسپرم

تیمار شاهد: نمونه اسپرم بدون افزودن آنتی اکسیدان، ویتامین C: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین C، ویتامین E: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین E و سه تیمار عصاره-۰/۵، عصاره-۱ و عصاره-۲ که به ترتیب حاوی ۰/۵، یک و دو میلی گرم در میلی لیتر عصاره برگ زیتون. تفاوت میانگین ها با حروف غیرمشابه معنی دار است ($P < 0/05$).

طور موفقیت آمیز درمان شود. علاوه بر این اولئوروپئین باعث پیشگیری از استرس اکسیداتیو شده و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می دهد و باعث افزایش تحرک اسپرم، حفظ تمامیت غشاء و به دنبال آن افزایش قابلیت زندهمانی اسپرم می شود [۱].

غلظت مواد واکنش دهنده با تیوباربتوریک اسید در زمان های مختلف در دوره ۴۸ ساعته نگهداری در شکل ۵ نشان داده شده است. در زمان های صفر، شش و ۲۴ ساعت پس از نگهداری، غلظت مواد واکنش دهنده با تیوباربتوریک اسید در رقیق کننده حاوی دو میلی گرم عصاره برگ زیتون کمتر از سایر رقیق کننده ها بود ($P < 0/05$).

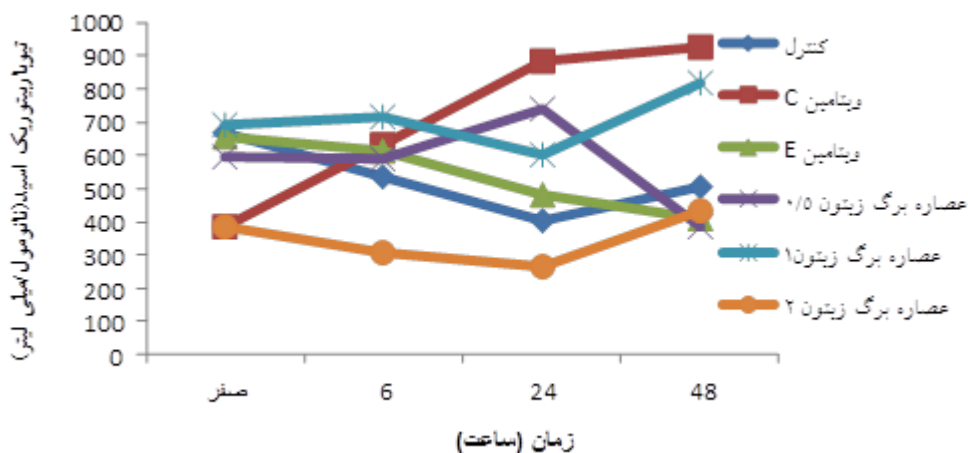
غلظت مواد واکنش دهنده با تیوباربتوریک اسید در تیمارها در شکل ۶ نشان داده شده است. غلظت مواد واکنش دهنده با تیوباربتوریک اسید در تیمار حاوی دو میلی گرم عصاره برگ زیتون در مقایسه با سایر تیمارها کمتر بود ($P < 0/05$).

سلامت غشای اسپرم در تیمارهای حاوی عصاره برگ زیتون، تفاوت معنی داری با تیمار شاهد و ویتامین C نداشت در حالی که تیمار ویتامین E توانست سلامت غشاء را در ۴۸ ساعت پس از نگهداری نسبت به دیگر تیمارها افزایش دهد. سردسازی و انجماد، تغییر فازهای لیپیدی غشاء را در اسپرم تحریک می کند و به تغییر پایداری و ساختار غشاء می انجامد که با صدمه به اسپرم و کاهش توانایی باروری همراه است. تولید بیش از اندازه رادیکال های آزاد به موجب افزایش پراکسیداسیون چربی های غشای اسپرم می شود [۱۸]. از دست دادن یکپارچگی غشاء باعث افزایش نفوذپذیری غشاء و توانایی نداشتن در تنظیم غلظت های درون سلولی یون های درگیر در کنترل حرکات اسپرم می شود [۵]. نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو ناشی از اتانول در بیضه موش صحرایی ممکن است با ترکیب فنولیک زیتون (اولئوروپئین) به وسیله اثرات آنتی اکسیدانی و متوقف کردن استرس اکسیداتیو به

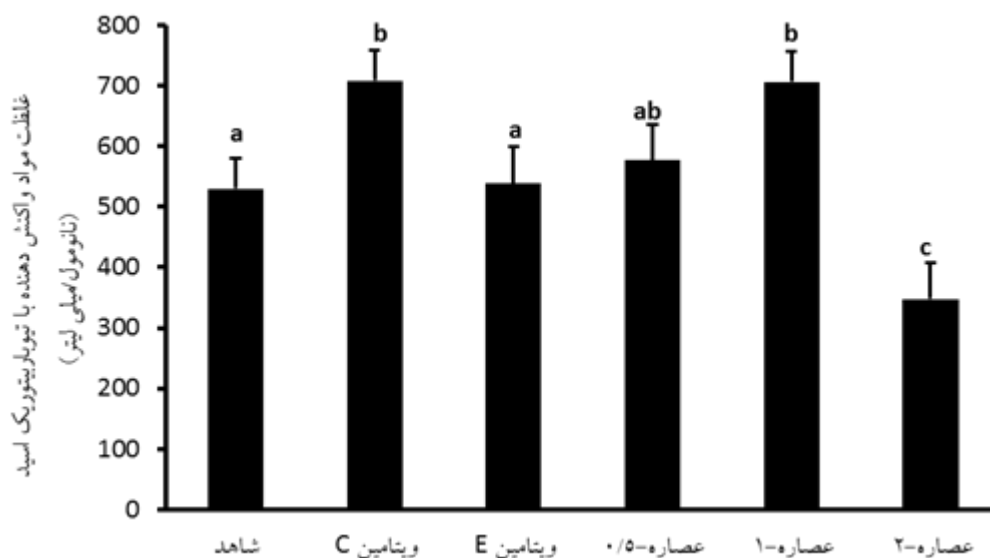
تولیدات دائمی

دوره ۱۹ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۶

مقایسه تاثیر آنتی اکسیدانی عصاره برگ زیتون با ویتامین های C و E بر شاخص های کیفی اسپرم گاو



شکل ۵. غلظت مواد واکنش دهنده با تیوباربتوریك اسید (نانومول در میلی لیتر) در تیمارهای حاوی عصاره برگ زیتون (با غلظت های ۰/۵ و ۱ و ۲ میلی گرم در میلی لیتر)، ویتامین E و ویتامین C در زمان های مختلف نگهداری در دمای پنج درجه سانتیگراد



شکل ۶. غلظت مواد واکنش دهنده با تیوباربتوریك اسید (نانومول بر میلی لیتر) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید

تیمار شاهد: نمونه اسپرم بدون افزودن آنتی اکسیدان، ویتامین C: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین C، ویتامین E: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین E و سه تیمار عصاره-۰/۵، عصاره-۱ و عصاره-۲ که به ترتیب حاوی ۰/۵ یک و دو میلی گرم در میلی لیتر عصاره برگ زیتون تفاوت میانگین ها با حروف غیرمشابه معنی دار است ($P < 0.05$).

توليدات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۶

منابع

1. Alirezaei M, Kheradmand A, Heydari R, Tanideh N, Neamati Sh and Rashidipour, M (2012a) Oleuropein protects ethanol-induced oxidative stress and modulates sperm quality in the rat testis. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 5: 205–211.
2. Alirezaei M, Dezfoulian O, Neamati Sh, Rashidipour M, Tanideh N and Kheradmand A (2012b) Oleuropein prevent ethanol-induced gastric ulcers via elevation of antioxidant enzyme activities in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry* 68: 583-592.
3. Alirezaei M, Dezfoulian O, Kheradmand A, Neamati Sh, Khonsari A and Pirzadeh A (2012c) Hepatoprotective effects of purified oleuropein from olive leaf extract against ethanol- induced damages in the rat. *Iranian Journal of Veterinary Research* 13: 3- 40.
4. Andrreadou I, Iliodromitis EK, Micors E, Constantinou M, Agalias A and Magiatis P (2006) The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidant, and hypolipitemic effects in anesthetized rabbits. *Journal of Nutrition* 136: 13-19.
5. 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. *Journal of Molecular and Morphological Review* 55: 282–288.
6. Esmaeili-Mahani S, Rezaeezadeh-Roukerd M, Esmaeilpour K, Abbasnejad M, Rasoulian B, Sheibani V, Kaeidi A and Hajjalizadeh Z (2010) Olive (*Olea europaea L.*) Leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 132: 200-205.

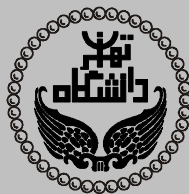
در پژوهش حاضر افزودن دو میلی گرم عصاره برگ زیتون در صفر، شش و ۲۴ ساعت پس از نگهداری توانست شاخص پراکسیداسیون چربی را کاهش دهد. این کاهش ممکن است به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و همچنین بالا بودن میزان ترکیبات فنولی در عصاره برگ زیتون باشد. مطالعات با موش صحرایی نشان داده است که غلظت ۰/۴ میلی لیتر عصاره زیتون تأثیری بر تحرک و غلظت اسپرم نداشت ولی توانست سطوح مالون‌دی‌آلدئید سرمی را کاهش دهد [۲۰].

در پژوهش دیگری، عصاره برگ زیتون توانست باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم خروس در دمای چهار درجه سانتیگراد شود [۷] که این نتایج با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. از طرفی خوراندن عصاره برگ زیتون در رت‌ها باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و پیشگیری از پراکسیداسیون لیپیدی در بافت کبد و معده موش صحرایی شده است [۳و۲]. گزارش شده است که عصاره برگ زیتون باعث کاهش معنی‌دار در غلظت مالون‌دی‌آلدئید سرم خون خرگوش شد [۴]. در مطالعه دیگری عصاره برگ زیتون سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در ناحیه کورتکس مغز رت‌ها شد [۸]. بنابراین با توجه به تحقیقات انجام گرفته به نظر می‌رسد کاهش TBARS به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و پاک‌کنندگی رادیکال‌های آزاد توسط عصاره برگ زیتون باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن عصاره برگ زیتون به رقیق‌کننده اسپرم در طی مدت ۴۸ ساعت نگهداری در شرایط دمایی پنج درجه سانتی‌گراد علیرغم کاهش میزان اکسیداسیون لیپیدی موجب کاهش تحرک اسپرم گاو می‌شود و بنابراین ترکیب مناسبی برای استفاده در رقیق‌کننده‌های اسپرم گاو نمی‌باشد.

تولیدات دامی

7. Jalali SM, Mohammady M and Roostaei M (2013) Effect of Olive leaf extract on lipid peroxidation male sperm during storage at 4 °C. National Congress of New Technologies in Animal Sciences. 20 -21 Nov., Islamic Azad University, Isfahan. Iran.
8. Khanjani Jelodar S and Bigdeli, M R (2013) Effect of Olive Leaf Extract on the behavioral signs of huntington's disease and antioxidant enzymatic activity in the rat brain. *Physiology and Pharmacology* 17: 328-338.
9. Kumar S, Biswas S, Mandal D, Roy HN, Chakraborty S, Kabir SN, Banerjee S and Mondal NB (2007) *Chenopodium album* seed extract: a potent sperm-immobilizing agent both in vitro and in vivo. *Contraception* 75: 71–78.
10. Lujan RJ, Rodriguez JML and Castro MDL (2006) Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography* 108: 76-82.
11. Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P and Noble R (2005) Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 63: 411-421.
12. Malo L, Gil R, Cano F and Martínez I (2011) Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology* 75: 1735–1741.
13. Mohame R, Pineda M, and Aguilar M (2007) Antioxidant capacity of extracts from wild and crop plants of mediterranean region. *Journal of Food Science* 72: 59-63.
14. Najafizadeh P, Dehghani F, Panjehshahi M and Hamzei Taj S (2013) The effect of a hydro-alcoholic extract of olive fruit on reproductive argons in male sprague-dawley rat. *Iranian Journal of Reproduction Medicine* 11: 293-300.
15. O'Flaherty C, de Lamirande E and Gagnon C (2006) Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free Radical Biology and Medicine* 40: 1045-1055.
16. Rafieil Z, Jafari SM, Alami M and Khomeiri M (2012) Evaluation of antimicrobial activity of olive leaf extracts by ELISA method. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 28: 12-22.
17. Ranalli A, Contento S, Lucera L, Di Febo M, Marchegiani D and Di Fonzo V (2006) Factors affecting the contents of iridoidoleuropein in olive leaves (*Olea europaea L.*). *Agricultural and Food Chemistry* 54: 434-40.
18. Sharma RK and Agarwal, A (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48: 835-850.
19. Sherif W, Mansour I, Sibghatullah S, Sree H, Mueen A and Khaleel ARN (2013) Sensibility of male rats' fertility against olive oil, *Nigella sativa* oil and pomegranate extract. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 3: 563-568.
20. Sliwa L and Macura B (2005) Evaluation of cell membrane integrity of spermatozoa by hypoosmotic swelling test - "water test" in mice after intra peritone aldaidzein administration. *Archives of Andrology* 51: 443-448.
21. Sonmez M, Turk G and Yuce A (2005) The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and male Wistar rats. *Theriogenology* 63(7):2063-72.
22. Subbarao KV, Richardson JS and Ang LC (2010) Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *Journal of Neurochemistry* 55: 342-345.



Journal of
Animal Production

(College of Abouraihan – University of Tehran)

Vol. 19 ■ No. 1 ■ Spring 2017

Comparison of the antioxidant effect of olive leaf extract with vitamins C and E on bovine sperm quality

Shahin Mazaheri¹, Ali Kiani^{2*}, Arash Kheradmand³, Masoud Alirezaei⁴

1. Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Lorestan University, Khoramabad, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Sciences, Lorestan University, Khoramabad, Iran (Corresponding author³)
3. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Lorestan University, Khoramabad, Iran
4. Associate Professor, Department of Basic Sciences, Lorestan University, Khoramabad, Iran

Received: February 26, 2016

Accepted: May 25, 2016

Abstract

In this study antioxidant effects of olive leaf extract (OLE) in comparison to vitamin C and E on chilled-stored (at 5 °C) bovine sperm was evaluated. The sperm samples collected from epididymis of ten Holstein bovine testis with 3-5 years old, and were diluted with egg yolk and sodium citrate containing 0.5, 1.0 and 2.0 mg/ml of OLE as well as 2 mg/ml vitamin E and C. Addition of OLE significantly reduced sperm motility ($P<0.05$). Vitamin E significantly improved sperm membrane integrity compared to the other groups ($P<0.05$). TBARS in 2 mg/ml of OLE treatment was significantly less than that in other treatments ($P<0.05$). The results showed that addition of OLE to bovine sperms stored at 5°C for 48 h negatively affected sperm motility despite of a decrease in lipid peroxidation, and therefore, it is not suitable extender to be used for bovine spermatozoa.

Keywords: Bovine; Lipid peroxidation; Oleuropein; Sperm; Thiobarbituric acid reactive substances