دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

تأثیر عصاره اتانولی مریم گلی سهندی به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی بر پارامترهای کیفی اسپرم منجمد-یخ گشایی شده گاو هلشتاین

رامین فرهادی[۱]، حسین دقیق کیا[۲] و ایرج اشرفی[۳]

۱ و ۳- کارشناس ارشد و دانشجوی دکتری، دانشگاه تبریز
۲ - دانشیار، دانشگاه تبریز، (نویسنده مسوول: daghighkia@tabrizu.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۳۰

چکیده

استرس اکسیداتیو طی فرآیند انجماد-یخ‌گشایی اسپرم به وجود آمده و باعث کاهش تحرک، زنده‌مانی، عملکردهای غشایی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و در نهایت باروری سلول‌های اسپرم می‌شود. گیاه مریم گلی سهندی به دلیل داشتن ترکیبات فنولیک، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و دی‌ترپن‌های فنولیک دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. هدف این پژوهش بررسی تأثیر عصاره گیاه مریم گلی سهندی به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی بر کیفیت اسپرم منجمد- یخ گشایی شده گاو هلشتاین بود. در این پژوهش از سه رأس گاو هلشتاین دو بار در هفته توسط واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شده و انزال‌ها به نسبت مساوی برای از بین بردن اثرات فردی دام با هم مخلوط شدند. سطوح مختلف عصاره گیاه مریم گلی سهندی (صفر، ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی‌لیتر در دسی لیتر محلول رقیق‌کننده) که بر اساس آزمایشات قبلی تعیین سطوح انتخاب شده بودند، به رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم مرغ- سیترات افزوده شد. نمونه‌ها بعد از طی مراحل سردسازی و پر شدن در پایوت‌ها، در بخار ازت منجمد شده و تا زمان ارزیابی در ازت مایع نگهداری شدند. بدنبال یخ گشائی نمونه‌های منی، پارامترهای تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء و پراکسیداسیون چربی، مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج ارزیابی نشان داد که افزودن سطح ۲ و ۴ میلی‌لیتر در دسی لیتر عصاره باعث بهبود معنی‌دار کلیه صفات تحرک و افزودن ۴ میلی‌لیتر در دسی لیتر عصاره این گیاه باعث بهبود معنی‌دار صفات زنده‌مانی و یکپارچگی غشایی اسپرم‌ها را بعد از فرآیند انجماد-یخ گشایی نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های تیماری شد (P<۰/۰۵). افزودن ۴ میلی‌لیتر در دسی لیتر عصاره غلظت مقدار مالون دی آلدهید را نسبت به سایر گروه‌ها کاهش داد، با این وجود تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. همچنین افزودن سطوح ۱۶ و ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر به‌طور معنی‌داری اثر منفی بر تمامی صفات ارزیابی شده داشت (P<۰/۰۵).

واژه‌های کلیدی: استرس اکسیداتیو، اسپرم، مریم گلی سهندی، آنتی اکسیدان طبیعی، انجماد- یخ گشایی

مقدمه

انجماد اسپرم دام‌های برتر و تلقیح مصنوعی با گسترش مواد ژنتیکی با ارزش حتی در گله‌های کوچک موجب پیشرفت ژنتیکی می‌شود (۱۸). در طول فرآیند انجماد-یخ گشایی منی، تنش‌های فیزیکی و شیمیایی در غشای اسپرم بوجود آمده و باعث می‌شود که کیفیت، زنده مانی، تحرک، توان باروری اسپرم‌ها کاهش یابد، این آسیب‌ها با تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد بخصوص گونه‌های اکسیژن واکنشی[۱] و پراکسیداسیون فسفولیپیدها در غشای سلول اسپرم همراه است (۱۴،۱۳). با وجود اینکه سطوح فیزیولوژیک اکسیژن واکنشی در عمل لقاح برای واکنش آکروزومی، فعال‌سازی اسپرم‌ها، افزایش تحرک و ظرفیت‌پذیری اسپرم‌ها ضروری است (۳،۲) ولی استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی و سامانه زیستی مهارکننده رادیکال‌های آزاد، هنگام فرآوری اسپرم به وجود آمده و باعث تخریب دیواره سلولی و کل ترکیبات ساختمانی سلول اسپرم می‌شود (۲۰،۱۰). اسپرم‌ها دارای سازوکار آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی است اما مقدار آن کافی نبوده و برای فرآوری اسپرم نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدان با منشأ خارجی می‌باشد (۹). همچنین سلول اسپرم دارای غلظت‌های بالای اسیدهای چرب غیراشباع هستند که به بروز واکنش پراکسیداسیون لیپید[۲] حساس بوده و منجر به کاهش تحرک، باروری، یکپارچگی غشایی و تغییرات سوخت‌وساز اسپرم می شود (۲۲،۱۱).

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که ساخت رادیکال‌های آزاد بویژه گونه‌های اکسیژن واکنشی را کنترل، خنثی، متوقف و یا با فعالیت آنها مقابله می‌کنند (۳۱). افزودن آنتی‌اکسیدان به رقیق‌کننده منی می‌تواند تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی را کاهش داده و اسپرم‌ها را از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت کند (۲۵). امروزه به دلیل مشکلات ایمنی، ترکیبات سمی و سرطان‌زای موجود در برخی آنتی آکسیدان‌های سنتتیک (بتاهیدروکسی تولوئن[۳]، بوتیلانید هیدروکسی آنیزول[۴]، پروپیل گالات[۵] و غیره) و

1- Reactive Oxygen Species
2- Lipid Per oxidation
3-Butylated Hydroxy Toluete
4- Butylated hydroxy Anyzol
5- Propyl gallate

Archive of SID
www.SID.ir

صرفه اقتصادی، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفته است (۲۴). خاصیت آنتی اکسیدانی گیاهان به طور عمده به ترکیبات فنولیک، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و دی‌ترپن‌های فنولیک مربوط می شود (۳۳). ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدها به دلیل خواص اکسید و احیاءکنندگی، دهنده گروه هیدروکسیل و خصوصیت شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی، دارای نقش مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد بخصوص گونه‌های اکسیژن واکنشی تجزیه پراکسیدها هستند (۲۶).

گیاه مریم گلی از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) بوده و ۱۷ گونه از حدود هزار گونه این گیاه، مختص ایران است. یکی از گونه‌های شناخته شده این گیاه، مریم گلی سهندی است که بومی منطقه سهند آذربایجان شرقی می‌باشد. خاصیت آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانی آن تأیید شده است و در طب سنتی جهت درمان عفونت‌های باکتریایی، قارچی و رفع سوء هاضمه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۳). فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه مریم گلی سهندی بخاطر وجود ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها می‌باشد که اثر آنتی اکسیدانی آن مرتبط با نوع و میزان این ترکیبات است (۳۰،۱۶). هدف این مطالعه بررسی تأثیر سطوح مختلف عصاره گیاه مریم گلی سهندی به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ گشایی شده گاو هلشتاین بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در مرکز اصلاح نژاد دام غرب و شمال‌غرب کشور واقع در استان آذربایجان شرقی- روستای شیخ حسن در محدوده زمانی اردیبهشت ۱۳۹۱ تا شهریور ۱۳۹۲ انجام گرفت. در این بررسی گیاه مریم گلی سهندی از اطراف منطقه سهند واقع در استان آذربایجان شرقی در اردیبهشت ماه ۱۳۹۱ جمع‌آوری شده و در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تعیین گونه شد. این گیاه به مدت ۱۰ روز در سایه خشک و سپس با آسیاب برقی (شرکت آسیاب طوس مشهد، ایران) پودر شد. مقدار ۵۰ گرم از پودر گیاه وزن شده و با ۳۵۰ میلی‌لیتر الکل اتانول به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. بعد از فیلترکردن با کاغذ صافی، روی تفاله باقیمانده ریخته‌شده و سه بار مراحل خیساندن و فیلتر کردن تکرار شد تا عصاره کاملا استخراج شود. الکل محلول حاصل شده بوسیله دستگاه تقطیر در خلاء (شرکت هایدولف، آلمان) تبخیر عصاره غلیظ حاصل شده و تا زمان اجرای آزمایش در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شد. در زمان اجرای آزمایش مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل و مورد استفاده قرار گرفت. برای سهولت حل‌شدن عصاره مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول توئین[1] ۸۰ افزوده شد (۱۵).

جمع‌آوری منی از سه رأس گاو هلشتاین (با شرایط محیطی، تغذیه‌ای و نگهداری یکسان) با استفاده از واژن مصنوعی دو بار در هفته اسپرم‌گیری شد. برای از بین بردن اثرات فردی دام‌های نر، به تعداد مساوی از سلول‌های اسپرم هر سه رأس دام نر در هر تکرار آزمایشی مخلوط و استفاده شدند. تمام اجزای واژن مصنوعی بمدت حداقل یک ساعت در دمای $40^{\circ}C$ گرم شدند. دمای داخلی واژن مصنوعی $42^{\circ}C$-۴۵ بود و همچنین برای سهولت دخول آلت‌تناسلی دام نر، سطح داخلی واژن با وازلین آغشته شده بود. نمونه‌های منی جمع‌آوری شده بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب گرم (شرکت IMV، فرانسه) $34^{\circ}C$ قرار داده شدند. نمونه‌ها از نظر حجم، رنگ، عدم آلودگی به ادرار و خون، غلظت و تحرک پیش رونده بررسی شده و نمونه‌های منی دارای رنگ کرمی تیره، حجم بین ۵-۱۲میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از یک میلیارد اسپرم در هر یک میلی‌لیتر نمونه منی و تحرک پیش‌رونده بالاتر از ۷۰ درصد در این تحقیق استفاده شد. غلظت اسپرم به وسیله دستگاه فتومتر (شرکت IMV، فرانسه) و درصد تحرک پیش‌رونده با سیستم کاسا (ساخت شرکت هوشمند فن‌آور تهران، ایران) تعیین شد (۱۷).

رقیق‌کننده مورد استفاده بر پایه سیترات-زرده تخم‌مرغ بود که در آن ۱۰۰ میلی‌لیتر این محلول حاوی ۲۵ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ، ۶۷/۱۶۷۵ میلی‌لیتر محلول حاوی ۲/۹٪ سیترات، ۷ میلی‌لیتر گلیسرول، ۰/۵ میلی‌لیتر جنتامایسین ۵٪، ۰/۳ میلی‌لیتر لینکواسپکتین (۵٪ لینکومایسین + ۱۰٪ اسپکتینومایسین) و ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر تایلوزین ۵٪ بود. رقیق‌کننده به دو بخش A و B تقسیم شد که به نوع A ۳٪ گلیسرول و به نوع B ۱۱٪ گلیسرول اضافه شد. نوع A به دمای $35^{\circ}C$ و نوع B به دمای $5^{\circ}C$ منتقل شد (۶). pH رقیق‌کننده حدود ۶/۹ تنظیم شد. در دمای $35^{\circ}C$ عصاره گیاه مریم گلی سهندی که از قبل هم دما شده بود در سطوح مختلف (۰، ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی‌لیتر در دسی لیتر محلول رقیق‌کننده A) افزوده شد. با توجه به اینکه مطالعه قبلی در این مورد وجود نداشت لذا انتخاب این سطوح بر اساس آزمایشات تعیین سطوح قبل از اجرای این پژوهش صورت گرفت.

پس از ارزیابی اولیه، نمونه‌های منی با غلظت ۵۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر محلول رقیق کننده، به فالکون‌های حاوی سطوح مختلف عصاره و رقیق‌کننده A اضافه شده و سپس نمونه‌ها به دمای $5^{\circ}C$ منتقل شدند. بعد از تثبیت در دمای $5^{\circ}C$، رقیق‌کننده B (حاوی ۱۱٪

1- Tween 80

Archive of SID

www.SID.ir

گلیسرول) که قبلاً هم دما شده بود، به فالکون‌ها اضافه شد تا غلظت نهایی گلیسرول به ۷٪ برسد. نمونه‌ها بعد از تثبیت در این دما در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتر پر و بسته‌بندی شدند. پایوت‌ها روی راک چیده شده و به دستگاه نیمه اتوماتیک انجماد اسپرم (شرکت MC، آلمان) که قبلا در دمای $-50^{\circ}C$ تنظیم شده بود، منتقل شدند. پایوت‌ها به مدت دو دقیقه در دمای $-50^{\circ}C$ ماندند و در ادامه شیب انجماد به گونه‌ای تنظیم شد که دمای داخل دستگاه در عرض ۱۴ دقیقه از دمای $-50^{\circ}C$ به $-150^{\circ}C$ رسید (حدود $-7^{\circ}C$ درجه در هر دقیقه). سپس پایوت‌ها توسط گوبلت‌های علامت‌گذاری شده به تانک ازت مایع (دمای $-196^{\circ}C$) انتقال یافته و تا زمان یخ گشایی در این دما نگهداری شدند (۵).

به‌منظور ارزیابی پارامترهای تحرک اسپرم، بعد از یخ‌گشایی، فراسنجه‌های تحرک‌کلی (TM)[1]، تحرک پیش رونده (PM)[2]، میانگین سرعت در مسیر (VCL)[3]، سرعت در مسیر منحنی (VAP)[4]، سرعت در مسیر مستقیم (VSL)[5]، جنبایی عرضی سر (ALH)[6] و خطی بودن جنبایی (LIN)[7] ارزیابی شدند. ابتدا نمونه‌ها یخ‌گشایی شده و جهت سازگاری با محیط و بازگشت آب درون‌سلولی، بمدت ۵ دقیقه در دمای $37^{\circ}C$ گرم‌خانه‌گذاری (شرکت IMV، فرانسه) شدند. سپس ۵ میکرولیتر از نمونه روی لام از قبل گرم شده (در دمای $37^{\circ}C$) قرار داده و بعد از پوشش با لامل، روی صفحه گرم میکروسکوپ قرار داده شد. از هر نمونه حداقل ۱۰ زمینه (بخش) بطور کاملا تصادفی انتخاب و تعداد ۲۰۰ اسپرم به وسیله سیستم کاسا با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× آنالیز شد.

برای ارزیابی درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها، از تست رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین[8] استفاده شد. برای این کار ابتدا ۵ میکرولیتر از نمونه منی با ۵ میکرولیتر رنگ (ائوزین ۱۶/۷ گرم/ لیتر آب مقطر، نیگروزین ۱۰۰ گرم/ لیتر آب مقطر، بافر سیترات ۲۹ گرم/ لیتر آب مقطر) روی لام به آرامی مخلوط و با لام دیگری گسترش تهیه شد. جهت خشک کردن، نمونه گسترش یافته به مدت سه دقیقه در دمای $37^{\circ}C$ قرار گرفت. تعداد ۲۰۰ اسپرم بوسیله میکروسکوپ نوری و روغن ایمرسیون با بزرگنمایی ۱۰۰۰× آنالیز شد. اسپرم‌هایی که بطورکلی و جزئی رنگ قرمز مایل به بنفش به خود گرفته بودند مرده و اسپرم‌هایی که رنگ به خود نگرفته بودند زنده محسوب شدند (۸).

برای سنجش یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول اسپرم از تست HOST استفاده شد. برای این منظور ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه منی به آرامی با ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک هم دما (حاوی ۹ گرم/ لیتر فروکتوز، ۴/۹ گرم/ لیتر سیترات سدیم) مخلوط شده و بمدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم ($37^{\circ}C$) قرار گرفت. سپس مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه مخلوط شده و روی لام از پیش هم دما شده قرار گرفته و با لامل پوشانده شد. لام روی صفحه گرم میکروسکوپ فازکنتراست (ساخت شرکت Nikon، ژاپن) قرار داده شد. تعداد ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ۴۰۰× شمارش و درصد اسپرم با دم متورم و تاب‌خورده (طبیعی) تعیین و به‌عنوان درصد پاسخ به محلول هیپواسموتیک ثبت شد (۲۸،۱۲).

برای تعیین شاخص پراکسیداسیون لیپید اقدام به اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید[9] با استفاده از اندازه‌گیری واکنش تیوباربیتوریتیک اسید شد. معمولا در دمای $95^{\circ}C$ و شرایط اسیدی یک مولکول مالون‌دی‌آلدهید با دو مولکول تیوباربیتوریتیک اسید[10] واکنش داده و کمپلکس صورتی رنگی را بوجود می‌آورد. ابتدا پایوت‌ها در آب حاوی $37^{\circ}C$ بمدت ۴۰ ثانیه یخ‌گشایی شدند. بلافاصله پس از افزودن ۱ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۹ درصد، نمونه‌ها با دور ۳۵۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سه بار با بافر سیترات شستشو و مجددا سانتریفیوژ شدند. در نهایت محلول رویی دور ریخته شده و رسوب باقیمانده اسپرم‌ها در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شدند و تا زمان انجام تست نمونه‌ها در فریزر (دمای $-80^{\circ}C$) نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید ابتدا نمونه‌ها در دمای $37^{\circ}C$ یخ‌گشایی شدند. مقدار۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه برداشته و به هریک یک میلی‌لیتر محلول حاوی ۲۰ درصد تری‌کلریدریک اسید و ۰/۵درصد تیوباربیتوریتیک اسید اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای $95^{\circ}C$ حرارت داده شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها بعد از سرد شدن در داخل یخ، به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (شرکت بهداد، ایران) شدند (ده هزار دور در دقیقه). در نهایت عدد جذب مالون‌دی‌آلدهید محلول رویی هر یک در طول موج ۵۳۲ بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (شرکت PG Instrument، انگلستان) خوانده شده و واحد آن بر حسب نانومول در دسی‌لیتر نوشته شد (۲۷).

این مطالعه با ۷ تیمار و در ۵ تکرار انجام شد. داده‌های به‌دست آمده برای فراسنجه‌های درصد تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی ابتدا به صورت آرک سینوس تبدیل و سپس تجزیه واریانس آنها به‌وسیله رویه مختلط نرم‌افزار SAS (۹.۱.۳) آنالیز شد. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید نیز توسط این رویه آنالیز شد. اثرات تیمار به عنوان اثرات ثابت و اثرات تکرار آزمایشی به عنوان اثرات تصادفی در نظر گرفته شد. برای مقایسه

1- Total Motility
2- Progressive Motility
3- Curvilinear velocity (micron/sec)
4- Average path velocity (micron/sec)
5- Straight – line velocity (micron/sec)
6- Lateral head displacement (micron)
7- Linearity (%) (LIN= VSL/VCL×100)
8- Eosin-nigrosin stain
9- Malondialdehyde
10- Tiobarbitoretic Acid

Archive of SID

www.SID.ir

میانگین تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۵ از میانگین حداقل مربعات استفاده شد.

نتایج و بحث

تأثیرات سطوح مختلف عصاره مریم‌گلی سهندی بر پارامترهای تحرک در جدول ۱ نشان داده شد. بیشترین درصد تحرک کلی و تحرک پیش‌رونده بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی در رقیق‌کننده حاوی سطح ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره مریم گلی سهندی به دست آمده است (P<۰/۰۵). برای صفات سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر میانگین و تحرک عرضی سر، رقیق‌کننده حاوی سطوح ۲ **و** ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره عملکرد بالایی نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های تیماری داشت (P<۰/۰۵). رقیق‌کننده حاوی سطح ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره صفت سرعت در مسیر منحنی تحرک را نسبت به گروه شاهد بطور معنی‌داری بهبود داده بود (P<۰/۰۵). بهترین عملکرد برای صفت خطی بودن تحرک در رقیق‌کننده حاوی سطوح ۴ و ۸ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره مشاهده شد (P<۰/۰۵). در مورد تمامی پارامترهای تحرک افزودن سطوح ۱۶ و ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره مریم گلی سهندی به رقیق کننده اثر منفی داشته و ویژگی‌های تحرکی اسپرم‌ها را کاهش داده بودند. همچنین برای تمامی پارامترهای تحرکی سایر سطوح باهم تفاوت معنی‌داری نداشتند.

داده‌های حاصل از آنالیز اثرات سطوح مختلف عصاره مریم‌گلی سهندی روی زنده‌مانی اسپرم‌ها در جدول ۲ نشان داده شد. نتایج نشان داد که درصد زنده‌مانی رقیق‌کننده حاوی ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره مریم گلی سهندی نسبت به گروه شاهد و بقیه گروه‌های تیماری بالاتر بود (P<۰/۰۵). با این وجود سطوح ۱۶و ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره بطور معنی‌داری زنده مانی اسپرم‌ها را کاهش داده بودند (P<۰/۰۵). درصد زنده‌مانی سایر گروه‌های تیماری تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند.

نتایج حاصل از آنالیز اثرات سطوح مختلف عصاره مریم گلی سهندی روی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها در جدول ۲ نشان داده شد. افزودن ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره مریم گلی سهندی به رقیق کننده توانست یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها را بعد از انجماد و یخ‌گشایی نسبت به سایر گروه‌های تیماری بهبود دهد (P<۰/۰۵). اثر مثبت افزودن عصاره به رقیق‌کننده در سطوح ۲ و ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر مشاهده شده و با افزایش سطوح عصاره، درصد یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها رو به کاهش بود. به‌طوریکه افزودن سطوح ۱۶ و ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر کاملاً تأثیر منفی روی این صفت داشتند.

نتایج بررسی سطوح مختلف عصاره مریم گلی سهندی در کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدهید در جدول ۲ درج شده است. غلظت مالون‌دی‌آلدهید در رقیق‌کننده حاوی سطح ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره مریم‌گلی سهندی بعد از انجماد و یخ‌گشایی کمترین بود اما در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود. همچنین مشخص شد که غلظت مالون‌دی‌آلدهید در رقیق‌کننده حاوی ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره، بالاترین مقدار بوده و نسبت به سایر گروه‌های تیماری معنی‌دار بود که نشان‌دهنده اثر منفی سطوح بالای عصاره در رقیق‌کننده می‌باشد (P<۰/۰۵). عملکرد سایر گروه‌های تیماری تفاوت معنی‌داری با همدیگر نداشتند.

استفاده از اسپرم منجمد شده نقش بسیار مهمی در پیشرفت برنامه‌های اصلاح نژادی، تولید آزمایشگاهی رویان[1] (یا باروری آزمایشگاهی) و تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم[2] داشته و برای دست‌یابی به مزایای زیاد تلقیح مصنوعی، ذخیره‌سازی منی برای بلند مدت امری ضروری است (۷). با این وجود تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن واکنشی در طول فرآیند انجماد-یخ‌گشایی موجب پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلول اسپرم، کاهش تحرک، کاهش زنده‌مانی، افزایش ناهنجاری‌ها در قطعه میانی، کاهش ظرفیت‌پذیری اسپرم و واکنش آکروزومی زود هنگام، آسیب دیدگی DNA و تمامی ترکیبات سلولی اسپرم‌ها از قبیل لیپیدها، پروتئین‌ها، قندها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (۹،۴،۱). در این مطالعه افزودن عصاره مریم گلی سهندی به رقیق‌کننده موجب بهبود پارامترهای کیفی منی (پارامترهای تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی) بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی در مقایسه با گروه شاهد شده و اسپرم‌ها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت کرده است. همچنین حضور عصاره این گیاه در ترکیب رقیق‌کننده توانست غلظت مالون‌دی‌آلدهید را تا حدودی کاهش دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اثرات مفید عصاره این گیاه در سطوح پایین (۲ و ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر) بود و افزایش سطوح عصاره برای هر کدام از پارامترها تأثیر منفی داشتند که می‌تواند به علت تغییرات اسمزی، pH و بهم خوردن تعادل ترکیبات رقیق‌کننده باشد، زیرا بهم خوردن میزان گلیسرول و زرده تخم‌مرغ که از عوامل محافظت‌کننده انجمادی و نگهدارنده اسپرم‌ها از شوک سرمایی در طول فرآیند انجماد محسوب می‌شوند، بسیار مهم بوده و در نتیجه زنده‌مانی، تحرک و عملکردهای اسپرم‌ها با خطر مواجه می‌شود (۱۹).

1- In Vitro Fertilization
2- Intra-Cytoplasmic Sperm Injection

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مقایسه پارامترهای تحرک اسپرم منجمد شده گاو هلشتاین در بین سطوح مختلف عصاره مریم گلی سهندی (میلی‌لیتر در دسی‌لیتر محلول رقیق‌کننده)

صفات	گروه شاهد	۲ml	۴ml	۸ml	۱۲ml	۱۶ml	۲۰ml
تحرک کل (٪)	۵۶/۵۷^{bc}±۶/۵۰*	۶۷/۷۲^{ab}±۶/۸۱	۷۴/۹۴^{ab}±۶/۱۲	۶۵/۴۸^{ab}±۱۰/۹۸	۵۲/۳۹۶^{c}±۱۱/۰۰	۴۰/۲۵^{d}±۹/۴۰	۳۴/۹۴^{d}±۸/۷۲
تحرک پیشرونده (٪)	۴۹/۱۹^{bc}±۴/۲۵	۵۷/۸۳^{ab}±۵/۷۴	۶۵/۸۰^{a}±۷/۰۹	۵۶/۸۹^{ab}±۹/۲۴	۴۳/۹۵^{cd}±۱۲/۵۴	۳۳/۲۹^{de}±۷/۱۳	۲۶/۷۵^{e}±۴/۲۵
سرعت در مسیر میانگین (µm/sec)	۴۲/۳۴^{bc}±۰/۹۹	۵۵/۳۳^{ab}±۳/۴۳	۵۷/۵۷^{a}±۶/۳۵	۵۰/۴۶^{ab}±۵/۵۲	۴۵/۹۴^{bc}±۱۰/۰۱	۳۷/۷۶^{cd}±۸/۰۵	۳۰/۹۶^{d}±۴/۳۸
سرعت در مسیر منحنی (µm/sec)	۲۹/۱۱^{bc}±۱/۴۷	۳۵/۷۶^{ab}±۳/۲۵	۳۹/۴۹^{a}±۷/۴۲	۳۵/۲۰^{ab}±۵/۴۰	۲۹/۳۷^{bc}±۷/۷۵	۲۲/۲۱^{cd}±۶/۴۴	۱۸/۴۴^{d}±۴/۱۸
سرعت در مسیر مستقیم (µm/sec)	۲۷/۷۷^{bc}±۳/۰۹	۳۶/۳۷^{a}±۳/۹۴	۳۸/۸۷^{a}±۵/۹۹	۳۳/۳۰^{ab}±۳/۷۶	۲۷/۲۱^{bc}±۷/۰۳	۲۱/۳۵^{cd}±۵/۹۱	۱۶/۷۵^{d}±۳/۹۶
تحرک عرضی سر (µm)	۱/۹۵^{bc}±۰/۰۷	۲/۴۴^{a}±۰/۱۹	۲/۴۵^{a}±۰/۳۱	۲/۲۴^{ab}±۰/۲۷	۲/۰۷^{bc}±۰/۲۶	۱/۸۹^{c}±۰/۲۹	۱/۸۷^{c}±۰/۲۳
خطی بودن تحرک (٪)	۵۴/۵۸^{bc}±۳/۷۵	۵۴/۵۲^{ab}±۴/۴۵	۵۸/۶۱^{a}±۵/۱۳	۵۸/۴۴^{a}±۴/۳۵	۴۸/۷۳^{b}±۶/۹۷	۴۱/۲۶^{c}±۶/۱۵	۴۰/۲۸^{c}±۶/۴۱

*: حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح است (P<۰/۰۵) *: انحراف معیار اعداد (SE)

جدول ۲- مقایسه صفات زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و تولید مالون دی‌آلدئید اسپرم منجمد شده گاو هلشتاین در بین سطوح مختلف عصاره مریم‌گلی سهندی (میلی‌لیتر در دسی‌لیتر محلول رقیق‌کننده)

صفات	گروه شاهد	۲ml	۴ml	۸ml	۱۲ml	۱۶ml	۲۰ml
زنده مانی (٪)	۶۶/۲۸^{bc}±۱/۹۵	۷۳/۶۶^{ab}±۷/۲۵	۷۹/۲۷^{a}±۴/۲۹	۷۱/۰۴^{abc}±۸/۸۷	۶۲/۰۱^{c}±۹/۵۳	۵۰/۹۹^{d}±۶/۶۹	۴۸/۰۵^{d}±۵/۰۲
یکپارچگی غشای پلاسمایی (٪)	۶۳/۴۰^{bc}±۳/۵۹	۷۱/۴۹^{ab}±۶/۷۳	۷۷/۷۴^{a}±۴/۶۳	۶۹/۱۰^{ab}±۹/۲۶	۵۷/۱۰^{c}±۱۰/۵۹	۴۷/۳۴^{d}±۷/۲۷	۴۴/۴۹^{d}±۶/۹۵
غلظت مالون‌دی‌آلدئید (nmol/dl)	۱۸/۱۶^{bc}±۱/۰۸	۱۷/۱۱^{c}±۰/۶۳	۱۶/۸۶^{c}±۰/۴۷	۱۷/۲۵^{c}±۱/۳۷	۱۷/۴۵^{c}±۰/۵۴	۱۹/۱۳^{ab}±۱/۰۱	۱۹/۶۷^{a}±۱/۰۳

*: حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح است (P<۰/۰۵).

Archive of SID

www.SID.ir

اطلاعات محدودی در مورد اثرات آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی (گیاهی) در فرآوری اسپرم حیوانات اهلی وجود دارد. اخیرا مشخص شد که افزودن عصاره آبی گیاه رزماری تأثیر بالقوه‌ای روی پارامترهای تحرک و درصد زنده‌مانی اسپرم خوک داشته و غلظت مالون‌دی‌آلدئید تولیدی که از عوامل اکسیداسیونی مخرب بشمار می‌رود، را بطور معنی‌داری کاهش داد (۲۴). استفاده از عصاره آبی رادیولا ساکرا به منی خوک توانست پارامترهای کیفی منی را بعد از فرآیند انجماد در وضعیت بهتری نگه داشته و یک فعالیت قوی پاکسازی رادیکال آنیون سوپراکسید را از خود نشان دهد (۳۵). در مطالعه‌ای دیگر افزودن عصاره آبی رزماری به منی بز توانست پارامترهای کیفی منی را بعد از فرآیند انجماد بهبود بخشد (۳۴). از آنجاییکه ماده موثره گیاه رزماری و رادیولا ساکرا به‌طور عمده اسید رزمارینیک و اسید کارنوسیک گزارش شده، گیاه مریم‌گلی سهندی نیز عمدتا حاوی این دو ترکیب است. بهمین خاطر نتایج حاضر با نتایج آنها مقایسه شد. نتایج افزودن عصاره مریم‌گلی سهندی به رقیق‌کننده و اثر آن بر فراسنجه‌های تحرک، زنده‌مانی و تست یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در این مطالعه با نتایج مطالعه مالو و همکاران (۲۴)، زنگانه و همکاران (۳۴) و ژائو و همکاران (۳۵) مطابقت داشت. اما نتیجه اثر افزودن عصاره این گیاه بر کاهش غلظت MDA با نتایج مطالعات ذکر شده مطابقت نداشت ولی نتیجه اثر عصاره مریم گلی سهندی بر کاهش غلظت MDA مطابقت نداشت که علت آن می‌تواند مقدار ترکیبات فنولیک و تنوع آب و هوائی باشد. البته لازم به ذکر است است که گونه حیوانی، نوع رقیق‌کننده و روش انجماد مطالعه حاضر با مطالعات مورد مقایسه تفاوت داشت. از مطالعه حاضر در کل این طور به نظر می‌رسد که استفاده از گیاه مریم گلی سهندی که حاوی ترکیبات پلی فنولیک متعددی است، به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در جهت حفاظت اسپرم‌ها از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو مفید بوده و احتمالا می‌تواند جایگزین برخی آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک شود. با این وجود جهت اثبات تأثیر آنتی‌اکسیدانی این گیاه در راستای فرآوری اسپرم نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند تا از همکاری صمیمانه کلیه پرسنل مرکز اصلاح نژاد دام غرب و شمال غرب کشور بویژه آقایان مهندس انوری و مهندس غفاری که امکان اجرای این پژوهش را فراهم کردند کمال تشکر و قدردانی را بنمایند.

منابع

1. Agarwal, S. and A.V. Rao. 2000. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. Canadian Medical Association Journal, 163: 739-744.
2. Agarwal, A., K.P. Nallella, S.S. Allamaneni and T.M. Said. 2004. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reproductive Biomedicine Online, 8: 616-27.
3. Aitken, R.J., H.M. Fisher, N. Fulton, E. Gomez, W. Knox and B. Lewis. 1997. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. Molecular Reproduction and Development, 47: 468-482.
4. Alvarez, J.G., J.C. Touchstone, L. Blasco and B.T. Storey. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. Journal Andrology, 8: 338-348.
5. Ashrafi, I., H. Kohram, H. Naijian, M. Bahreini and H. Mirzakhani. 2011. Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. BMC Research Notes 4: 547. doi: 10.1186/1756-0500-4-547.
6. Ashrafi, I., H. Kohram and F. Farrokhi Ardabili. 2013. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. Animal Reproduction Science, 139: 25-30.
7. Bailey, J.L., J.F. Bilodeau and N. Cormier. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. Journal Andrology, 21:1-7.
8. Balestri, F., M. Giannecchini, F. Sgarrella, M.C. Carta, M.G. Tozzi and M. Camici. 2007. Purine and pyrimidine nucleosides preserve human astrocytoma cell adenylate energy charge under ischemic conditions. Neurochemestry International, 50: 517-523.
9. Bansal, A.K. and G.S. Bilaspuri. 2011. Impacts of oxidative strees and antioxidants on semen functions. Veterinary Medicine International, 1-7. doi: 10.4061/2011/686137.
10. Bilodeau, J.F., S. Chatterjee, M.A. Sirard and C. Gagnon. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Molecular Reproduction and Development, 55: 282-288.
11. Bucak, M.N. and N. Tekin. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. Small Rumin Research, 73: 103-108.
12. Buckett, W.M., M.J. Luckas, I.A. Aird, R.G. Farquharson, C.R. Kingsland and D.I. Lewis-Jones. 1997. The hypo-osmotic swelling test in recurrent miscarriage. Fertility and Sterility, 68: 506-509.

Archive of SID

www.SID.ir

13. Chatterjee, S., E. de Lamirande and C. Gagnon. 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. Molecular Reproduction and Development, 60: 498-506.
14. Chaverio, A., L. Machado, A. Frijters, B. Engel and H. Woelders. 2006. Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. Theriogenology, 65: 1875-1890.
15. Dehghan, G., A. Shafiee, M. Ghahremani, S. Ardestani and M. Abollahi. 2007. Antioxidant potential of various extract from ferula szovitsiana in relation to their phenolic content. Pharmaceutical Biology, 45: 691-699.
16. Esmaeili, M.A., A. Sonboli, M.R. Kanani and S. Heibatollah. 2009. Salvia sahendica prevents tissue damages induced by alcohol in oxidative stress conditions: Effect on liver and kidney oxidative parameters. Journal of Medicinal Plants Research, 3: 276-283.
17. Gil, J., N. Lundeheim, L. Soderquist and H. Rodriiuez-Martinez. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theri ogenology, 59: 1241-1255.
18. Gillan, L. and W.M. Maxwell. 1999. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. Journal of Reproduction and Fertility, Supplement. 54: 271-283.
19. Evans, G., W.M.C. Maxwell and S. Salamon. 1987. Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney.
20. Fahy, G.M. 1986. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. Cryobiology, 23: 1-13.
21. Farber, J.L. 1994. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. Environmental Health Perspectives, Suppl, 10: 17-24.
22. Graaf, S.P., G. Evans, L. Gillan, M.M.P. Guerra, W.M.C. Maxwell and J.K.O. Brien 2007. The influence of anti-oxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. Theriogenology, 67: 217-227.
23. Lenzi, A., M. Picardo, L. Gandini, F. Lombardo, O. Terminali, S. Passi and F. Dondero. 1994. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. Human Reproduction, 9: 2044-2050.
24. Lotfipour, F., M. Samiee and H. Nazemiyeh. 2007. Evaluation of the antibacterial activity of Salvia sahendica and Phlomis caucasica. Pharmaceutical sciences, Journal of Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, 1: 29-34.
25. Malo, C., L. Gil, R. Cano, F. Martínez and I. Galé. 2011. Antioxidant effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology, 75: 1735-1741.
26. Makker, K., A. Agarwal and R. Sharma. 2009. Oxidative stress and male infertility. The Indian Journal of Medical Research, 129: 357-367.
27. Osawa, T. 1994. Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. In Uritani I, Garcia VV, Mendoza EM (EDs) Post harvest biochemistry of plant food-materials in the tropics. Japan Scientific Societies Press: Tokyo, Japan. 241-251.
28. Pinho, R.A., M.E. Andrades, M.R. Oliveia, A.C. Pirola, M.S. Zago, P.C. Silveira, F. Dal-Pizzol and J.C. Moreira. 2006. Imbalance in SOD/CAT activities in skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. Cell Biology International, 30: 848-853.
29. Revell, S.G. and R.A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science, 36: 77-86.
30. Rice-Evans, C., N.J. Miller and G. Paganga. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science, 2: 152-159.
31. Salehi, P., A. Sonboli, S.N. Ebrahimi and M. Yousefzadi. 2007. Antibacterial and Antioxidant actives of the essential oils and various extracts of salvia sahendica in different phonological stages. Chemistry of Natural Compounds; 43: 328-330.
32. Sikka, S.C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Frontiers in Bioscience, 1: e78-86.
33. Tuncer, P.B., M.N. Bucak, S. Büyükleblebici, S. Sarıözkan, D. Yeni, A. Eken, P.P. Akalın, H. Kinet, F. Avdatek and A.F. Fidan. 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. Cryobiology, 61: 303-307.
34. Velioglu, Y.S., G. Mazza, L. Gao and B.D. Oomah. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural Food and Chemistry, 46: 4113-4117.
35. Zanganeh, Z., M. Zhandi, A. Zare Shahneh, A. Najafi, M. Mahdi Nabi and A. Mohammadi-Sangcheshmeh. 2013. Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Ruminant Research, 114: 120-125.
36. Zhao, H.W., Q.W. Li, G.Z. Ning, Z.S. Han, Z.L. Jiang and Y.F. Duan. 2009. Rhodiola sacra aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen. Theriogenology, 71: 849-57.
37. Zupkó, I., J. Hohmann, D. Rédei, G. Falkay, G. Janicsák and I. Máthé. 2001. Antioxidant activity of leaves of Salvia species in enzyme dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. Planta Medica, 67: 366-368.

Archive of SID

www.SID.ir

The Effect of *Salvia Sahendica* Ethanolic Extract as Natural Antioxidant on Quality Parameters of Cryopreserved Holstein Bull Sperm

Ramin Farhadi[1], Hossein Daghigh Kia[2] and Iraj Ashrafi[3]

1 and 3- M.Sc. and PhD. Student, University of Tabriz
2- Associate Professor, University of Tabriz (Corresponding author: daghighkia@tabrizu.ac.ir)
Received: February 7, 2014 Accepted: April 19, 2014

Abstract

Oxidative stress during freezing-thawing reduces motility, viability, membrane functions, antioxidant capacity and finally sperm fertility. *Salvia sahendica* has antioxidant properties due to phenolic, flavonoids, phenolic acids and phenolic diterpenes compounds. The purpose of this study was to investigate the effect of *Salvia sahendica* extract as a natural antioxidant on quality of frozen-thawed Holstein bull sperms. In this study, semen samples were collected from three Holstein bulls twice a week using artificial vagina and ejaculates were pooled in order to eliminate the individual effects of bulls. Different levels of *Salvia sahendica* ethanol extract (0, 2, 4, 8, 12, 16 and 20 ml in dl diluent solution) (which determined based on previous tests) were added to diluents based on egg yolk-citrate. Following cooling and equilibration stage of semen samples, the samples were exposed to nitrogen vapor to be frozen and stored in liquid nitrogen until evaluation. Motility, viability, membrane integrity and the lipid peroxidation parameters of the samples were evaluated after thawing. The results of evaluation showed that, the addition of 2 and 4 ml/dl of *Salvia sahendica* extract improved motility parameters significantly and addition of 4 ml/dl extract improved viability and plasma membrane integrity of sperms significantly process compared to the control group following freeze-thawing process ($P < 0.05$). Addition of 4 ml/dl extract reduced malondialdehyde concentrations compared to the other groups, however, the differences were not statistically significant. Also, addition of 16 and 20 ml/dl extract had a significantly negative effect on all evaluated traits ($P<0.05$).

Keywords: Oxidative Stress, Sperm, *Salvia sahendica*, Natural Antioxidant, Freezing-thawing

Archive of SID

www.SID.ir