

استفاده از آنتی‌اکسیدان الاژیک اسید برای بهبود کیفیت اسپرم انجماد-یخ‌گشایی شده در قوچ نژاد قزل

زهرا بلوکی^۱ - حسین دقیق‌کیا^{۲*} - ابوذر نجفی^۳ - مهدیه مهدی‌پور^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۰۳

چکیده

هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدانی الاژیک اسید بر کیفیت اسپرم قوچ در طول فرآیند انجماد-یخ‌گشایی بود. در این مطالعه از ۵ قوچ نژاد قزل در ۵ تکرار (۲ بار در هفته) بوسیله واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شد. بمنظور حذف اثرات فردی هر دام نر، نمونه‌های منی پس از ارزیابی اولیه و در صورت داشتن شرایط یکسان، با هم مخلوط شدند. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: الاژیک اسید در چهار سطح ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار و گروه شاهد (بدون آنتی‌اکسیدان). رقیق‌کننده بر پایه تریس-لستین مورد استفاده قرار گرفت. انجماد نمونه‌های منی بدنبال دو ساعت سردسازی و تعادل‌سازی دما تا ۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. یخ‌گشایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. پارامترهای جنبایی کل، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء، میزان اسپرم‌های غیرطبیعی، پارامترهای جنبایی، میزان مالون‌دی‌آلدهید، ظرفیت‌تام آنتی‌اکسیدانی اسپرم، فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز بعد از یخ‌گشایی اندازه‌گیری شدند. آنالیز داده‌ها به کمک نرم‌افزار SAS انجام گرفت. یافته‌های این تحقیق بیانگر بهبود زنده‌مانی، تحرک اسپرم‌ها و ظرفیت‌تام آنتی‌اکسیدانی در چهار سطح ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار نسبت به گروه شاهد بود. فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، غلظت مالون‌دی‌آلدهید و یکپارچگی غشاء پلاسمایی در هیچ یک از سطوح تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. میزان اسپرم غیرطبیعی در سطح ۰/۵ میلی‌مولار کاهش یافت و در صفات سرعت در مسیرمنحنی، سرعت در مسیرمستقیم و خطی بودن حرکت اسپرم با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت. بطور کلی، سطح ۰/۵ میلی‌مولار نسبت به سایر گروه‌های تیماری مورد مطالعه، سبب بهبود کیفیت منی قوچ بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی شد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، الاژیک اسید، انجماد، قوچ.

مقدمه

مقایسه با سایر گونه‌ها دارای نسبت بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع و نسبت پایینی از کلسترول به فسفولیپید است. این امر باعث می‌شود که به دلیل تنش‌های اکسیداتیو و در نتیجه تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، اسپرم بیشترین آسیب‌ها را متحمل شوند. تنش‌های اکسیداتیو متعاقباً سبب اختلال در فعالیت و عملکرد اسپرم‌ها خواهند شد؛ که در نتیجه آن باعث از بین رفتن تحرک، یکپارچگی و توانایی لقاح آنها می‌شود (۲). یکی از فاکتورهای مهم کاهش‌دهنده کیفیت منی، گونه‌های فعال اکسیژن تولیدی حاصل از ترکیبات سلولی نظیر سوپر اکسید، هیدروژن پراکسید و لیپید هیدرو پراکسید است که از پرکسیداسیون لیپید غشایی اسپرم‌ها و اکسیژن‌های تک‌ظرفیتی تشکیل می‌شوند (۶). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی دام‌ها در زمان رقیق‌سازی، پایین آمده و به همین دلیل امروزه در رقیق‌کننده منی از آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده می‌شود تا همراه

به‌منظور بهره‌مندی از مزایای تلقیح مصنوعی، ذخیره‌سازی منی برای بلندمدت امری ضروری است؛ که بوسیله فرآیند انجماد^۴ محقق می‌شود. انجماد اسپرم فرآیندی است که باعث توقف فعالیت‌های متابولیکی اسپرم‌ها شده و در نتیجه امکان ذخیره‌سازی نامحدود و بدون کاهش معنی‌دار باروری را فراهم می‌آورد (۸). اسپرم قوچ در

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۲- استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۳- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

*- نویسنده مسئول: (Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.v1397i1.58308

4- Cryopreservation

شدند. سپس پایوت‌ها در ارتفاع ۴ سانتی‌متری بالای بخار ازت در مدت ۷ دقیقه منجمد شده و بدنال آن به تانک ازت مایع انتقال یافته و بمدت یک ماه در ازت مایع نگهداری شده بعد تست‌های مربوطه روی این نمونه‌ها انجام گرفت. نمونه‌های منی پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی از نظر زنده‌مانی، پارامترهای تحرک اسپرم، یکپارچگی غشاء، پراکسیداسیون لیپیدی (MDA)، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (GPx و SOD) مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند.

تعیین درصد زنده‌مانی

میزان اسپرم‌های زنده پس از یخ‌گشایی به روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین تعیین شدند (۱۹). بعد از یخ‌گشایی، روی لام، ۱۰ میکرولیتر منی را با ۲۰ میکرولیتر رنگ به آرامی مخلوط کرده و پس از تهیه گسترش و خشک شدن در دمای ۳۷°C، تعداد ۲۰۰ اسپرم بوسیله میکروسکوپ نوری و روغن ایمرسیون با بزرگنمایی ۴۰× شمارش و ارزیابی شدند. اسپرم‌هایی که بطور کلی یا جزئی رنگ قرمز مایل به بنفش داشتند را مرده و اسپرم‌هایی که رنگ به خود نگرفته بودند، زنده محسوب شده و بر اساس آن درصد زنده‌مانی تعیین شد.

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی

برای بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول اسپرم، پس از یخ‌گشایی نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰g سانتریوفیوژ شدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷°C انکوبه شدند. ۵ میکرولیتر از نمونه مخلوط شده، روی لام هم‌دما شده قرار داده و با لامل پوشانده شد. سپس لام را روی صفحه گرم میکروسکوپ فاز کنتراست قرار داده و تعداد ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ۴۰× شمارش شدند. اسپرم‌های با دم متورم و تاب خورده به عنوان اسپرم‌های با غشاء پلاسمایی سالم در نظر گرفته شدند (۳۶).

ارزیابی ریخت شناسی اسپرم

جهت تعیین اسپرم با ریخت طبیعی، ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی یخ‌گشایی شده به ۱۵۰ میکرولیتر از محلول هانکوک افزوده شد. یک قطره از مخلوط حاصله بر روی لام گذاشته و ۲۰۰ اسپرم را با کمک میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۴۰× شمارش کرده و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی محاسبه شد (۳۹).

ارزیابی تحرک اسپرم

بعد از یخ‌گشایی، پارامترهای تحرک کلی^۱، تحرک پیش‌رونده^۲،

با آنتی‌اکسیدان‌های موجود در پلاسمای منی، سبب بهبود کیفیت و عملکرد اسپرم بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی شوند (۸). آنتی‌اکسیدانی که استرس اکسیداتیو را کاهش دهد و جنبائی اسپرم را بهبود بخشد، می‌تواند برای مدیریت ناباروری نرها مناسب باشد (۹). آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که واکنش زنجیره‌ای اکسیداسیون را می‌شکنند، که بر این اساس باعث کاهش استرس اکسیداتیو می‌شوند (۲۵، ۲۲). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که جاروب کننده و مانع کننده تشکیل ROS یا بازدارنده فعالیت آنها هستند. انواع مختلفی از آنتی‌اکسیدان‌های بیولوژیکی و شیمیایی که به ROSها و پراکسیدازهای لیپیدی حمله می‌کنند، تا به امروزه تحت مطالعه قرار گرفته‌اند (۴۱).

الایزیک اسید ترکیبی است پلی‌فنلی که در چای سبز و دیگر منابع طبیعی از جمله انار، توت فرنگی، تمشک، گردو و پوست درخت اکالیپتوس یافت می‌شود. الایزیک اسید دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد آپوپتوزی است (۱۷) که می‌تواند اکسیداسیون سلولی را به تاخیر انداخته، مهار و یا جلوگیری کند و همینطور با جاروب کردن رادیکال‌های آزاد در نهایت سبب کاهش استرس اکسیداتیو شود (۴۴)، همچنین الایزیک اسید با مانع از حمله رادیکال‌های آزاد به سلول، باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های (Superoxide dismutase) (Catalase) CAT، SOD و (Glutathione) peroxidase GPx می‌شود (۲۱).

بر اساس اطلاعات موجود، تاکنون از الایزیک اسید در انجماد منی قوچ استفاده نشده است. هدف تحقیق حاضر بررسی اثرات سطوح مختلف الایزیک اسید، بعنوان آنتی‌اکسیدان در بهبود کیفیت اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۵ قوچ ۲ بار در هفته توسط واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شد. اسپرم‌ها از لحاظ حجم، غلظت و تحرک مورد ارزیابی اولیه قرار گرفته و در صورت داشتن کیفیت لازم برای مطالعه انتخاب شدند. در هر بار اسپرم‌گیری، برای از بین بردن تفاوت‌های فردی بین قوچ‌ها، منی آنها در مقادیر مساوی با یکدیگر مخلوط شدند. قبل از افزودن عصاره‌ها، خصوصیات کمی و کیفی نمونه‌های منی از قبیل حجم منی (۲۰/۷۵-۲ میلی‌لیتر)، غلظت (بیشتر از 3×10^6)، حرکت پیش‌رونده (بالتر از ۷۰٪) و اسپرم‌های با شکل غیرنرمال (کمتر از ۱۰٪) ارزیابی شدند. سطوح انتخابی آنتی‌اکسیدان براساس نتایج آزمایشات اولیه تعیین سطح مطلوب آن با بهره‌گیری از روش عمر و سویان (۲۰۱۶) صورت گرفت (۳۳). تیمارهای آزمایشی، الایزیک اسید در چهار سطح (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۱/۵) میلی‌مولار و تیمار شاهد (بدون آنتی‌اکسیدان) انتخاب گردید. پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها در پایوت پر

1- Total Motility (TM)

2- Progressive Motility (PM)

میلی‌مولار نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات احیا شده (NADPH)، یک واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر گلوکاتینون ردوکتاز و ۱ میلی‌مولار GSH^{10} بود. ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر مایع منی به ۰/۸ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه قبل از شروع واکنش در $25^{\circ}C$ انکوبه شد. علاوه بر این ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول H_2O_2 که غلظت نهایی آن در محیط ۰/۲۵ میلی‌مول بود، اضافه گردید. میزان جذب نوری در ۴۱۲ نانومتر و به مدت ۵ دقیقه با استفاده از اسپکتروفتومتر ثبت شد. فعالیت GSH-Px با واحد بین‌المللی IU/g بیان شد.

میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز

میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز نمونه‌های منی با بهره‌گیری از روش ویلیام و همکاران (۱۹۸۶) با استفاده از کیت Ransod شرکت رندوکس (RANDOX Laboratories Ltd., UK) مورد سنجش قرار گرفتند. نمونه‌های منی یخ‌گشایی شده به نسبت ۱ به ۵ در PBS (50 mM و 0.7 pH) رقیق شدند. سپس بافر سدیم کربنات (100 mM ، 10.0 pH)، ۰/۱ mM گزانتین، ۰/۲۵ mM نیترو تترازولوم آبی، ۰/۱ mM EDTA، گزانتین اکسیداز افزوده شده و در نهایت نمونه‌ها را در یک کووت کوچک مخلوط شدند. بطور کلی، در صورت وجود آنزیم SOD در نمونه رادیکال‌های سوپراکسید هیدروژن و O_2 تبدیل شده و از ایجاد رنگ قرمز فورمازان ممانعت می‌کند و فعالیت آنزیم SOD بوسیله درجه ممانعت از این واکنش تعیین می‌شود. یک واحد SOD باعث مهار ۵۰٪ سرعت احیاء Int و یا مهار ۵۰٪ از اکسیداسیون NADPH می‌شود.

روش آماری

این طرح با ۵ تیمار و در ۵ تکرار اجرا گردید. داده‌های بدست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی و بر اساس مدل آماری زیر و با استفاده از نرم افزار SAS (۹.۱.۳) و با استفاده از مدل خطی (GLM) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای تعیین معنی‌داری اثرات آنتی‌اکسیدان از آزمون مقایسه‌ای توکی استفاده شد و اختلاف در سطح ۰/۰۵ معنی دار گزارش شد. اثر تیمار بعنوان اثر ثابت در نظر گرفته شد.

$$Y_{ij} = \mu + \text{Treat}_i + e_{ij}$$

Y_{ij} = مشاهده i ام، μ = میانگین جمعیت، Treat_i = اثر تیمارها،

e_{ij} = اثر عوامل ناشناخته i ام

سرعت در مسیر میانگین^۱، سرعت در مسیر منحنی^۲، سرعت در مسیر مستقیم^۳، خطی بودن جنبایی^۴ ارزیابی شدند. جهت ارزیابی پارامترهای تحرک، نمونه‌های یخ‌گشایی شده به مدت ۳ دقیقه در دمای $37^{\circ}C$ حمام آب گرم، انکوبه شدند. ۵ میکرولیتر از نمونه روی لام از قبل گرم شده ($37^{\circ}C$) قرار داده و روی صفحه گرم میکروسکوپ حداقل ۱۰ فیلد بطور کاملاً تصادفی انتخاب و بوسیله سیستم CASA مدل 3.1 Video Test Sperm آنالیز شدند.

اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA)^۵

غلظت مالون‌دی‌آلدهید شاخصی از میزان پراکسیداسیون لیپیدی در نمونه‌های منی است که با استفاده از واکنش تیو باربیتوریتیک اسید اندازه‌گیری شد. معمولاً در دمای $95^{\circ}C$ و شرایط اسیدی، یک مولکول MDA با دو مولکول تیو باربیتوریتیک اسید (TBA)^۶ واکنش داده و کمپلکس صورتی رنگی را بوجود می‌آورد. برای سنجش میزان MDA ابتدا نمونه‌ها در دمای $37^{\circ}C$ یخ‌گشایی شده، سپس بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۱ mL محلول حاوی ۲۰ درصد تری‌کلریدریک اسید و ۰/۵ درصد تیو باربیتوریتیک اسید مخلوط شده و بمدت ۳۰ دقیقه در دمای $95^{\circ}C$ حرارت داده شدند. برای اندازه‌گیری غلظت MDA، با استفاده از اسپکتروفتومتری طول موج 532nm خوانده شد (۳۴).

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی اسپرم براساس روش TEAC^۷ (مهارکنندگی با آنتی‌اکسیدان‌های جاذب رادیکال کاتیون ABTS^۸ است) و از کیت Randox استفاده شد. ABTS با پراکسیداز پراکسیداز و H_2O_2 جهت تولید کاتیون ABTS انکوبه شده و رنگ پایدار آبی-سبز که حداکثر جذب نوری آن ۶۰۰ نانومتر است، تولید می‌کند که بوسیله اسپکتروفتومتر قابل اندازه‌گیری است (۳۱).

تست میزان فعالیت گلوکاتینون پراکسیداز

فعالیت GSH-Px با کمک روش لاورنس و بورک (۱۹۷۶) تعیین شد. مخلوط واکنش شامل ۵۰ میلی‌مولار پتاسیم فسفات (pH=7)، ۱ میلی‌مولار EDTA^۹، ۱ میلی‌مولار سدیم آزید (NaN₃)، ۰/۲

- 1- Curvilinear velocity (micrometer /sec) (VCL)
- 2- Average path velocity (micrometer /sec) (VAP)
- 3- Straight – line velocity (micrometer /sec) (VSL)
- 4- Linearity (%) (LIN= VSL/VCL×100)
- 5- Malondialdehyde
- 6- Tiobarbitoretic Acid
- 7- rolox equivalent antioxidant capacity
- 8- 2, 2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]
- 9- Ethylenediamine tetra-acetic acid

نتایج

اسپرم شد ($P < 0.05$). سطح ۰/۲۵ میلی‌مولار نیز باعث بهبود سرعت در مسیر منحنی نسبت به گروه کنترل شد (جدول ۱ و نمودار های ۱، ۲ و ۳). ظرفیت تام‌آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های حاوی تمامی سطوح آنتی‌اکسیدانی نسبت به گروه شاهد بهبود یافت ($P < 0.05$)، بعلاوه سطوح ۱ و ۱/۵ نسبت به ۰/۲۵ و ۰/۵ تاثیر بیشتری داشتند.

نتایج این پژوهش نشان داد استفاده از سطوح ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار الازیک اسید سبب بهبود پارامترهای زنده‌مانی و جنبایی کل شد ($P < 0.05$). علاوه بر این افزودن ۰/۵ میلی‌مولار سبب کاهش میزان اسپرم‌های غیرطبیعی شد و باعث بهبود میزان خطی بودن حرکت، سرعت در مسیر مستقیم و میانگین سرعت در مسیر

جدول ۱- تأثیر سطوح مختلف الازیک اسید بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

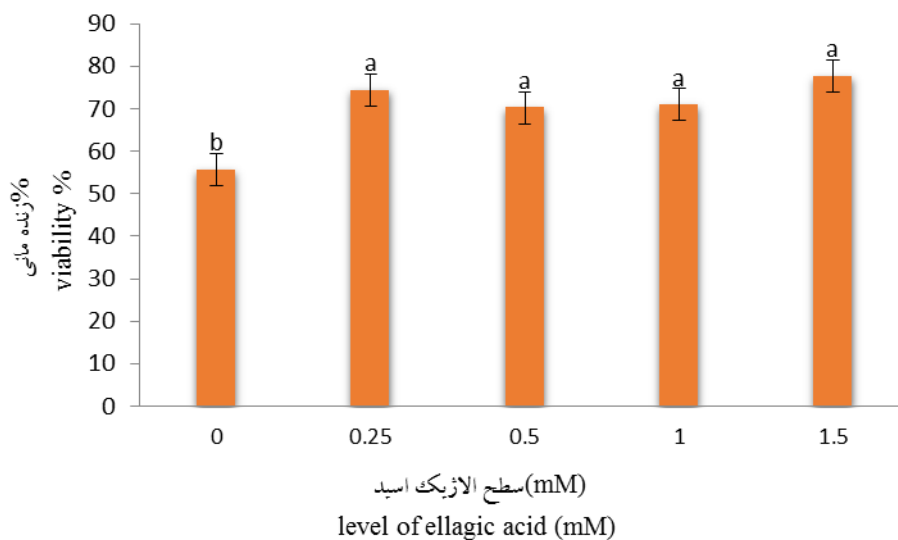
Table 1- The effect of different levels of Ellagic acid on sperm motility parameters after freezing-thawing process

| Sperm motility parameters | تیمارهای آزمایشی (Antioxidants) (mM/ml) | | | | | SEM | P-value |
|---------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------|---------|
| | Control | 0.25 | 0.5 | 1 | 1.5 | | |
| TM (%) | 48.2 ^b | 64.6 ^a | 60.8 ^a | 61.8 ^a | 66.5 ^a | 2.02 | 0.0001 |
| PM (%) | 18.6 | 27.0 | 26.8 | 23.2 | 29.3 | 3.41 | 0.2668 |
| VAP (μm/s) | 20.5 ^b | 34.6 ^{ab} | 36.4 ^a | 20.9 ^{ab} | 32.5 ^{ab} | 3.50 | 0.0175 |
| VSL (μm/s) | 15.5 ^b | 23.9 ^{ab} | 27.8 ^a | 19.8 ^{ab} | 22.3 ^{ab} | 2.36 | 0.0203 |
| VCL (μm/s) | 50.1 ^b | 73.8 ^a | 63.2 ^{ab} | 57.3 ^{ab} | 67.1 ^{ab} | 4.10 | 0.0073 |
| STR (%) | 76.8 | 71.6 | 76.9 | 82.3 | 68.3 | 3.76 | 0.1550 |
| LIN (%) | 30.9 ^b | 32.7 ^{ab} | 28.4 ^a | 34.5 ^{ab} | 33.6 ^{ab} | 2.54 | 0.0242 |

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P < 0.05$)

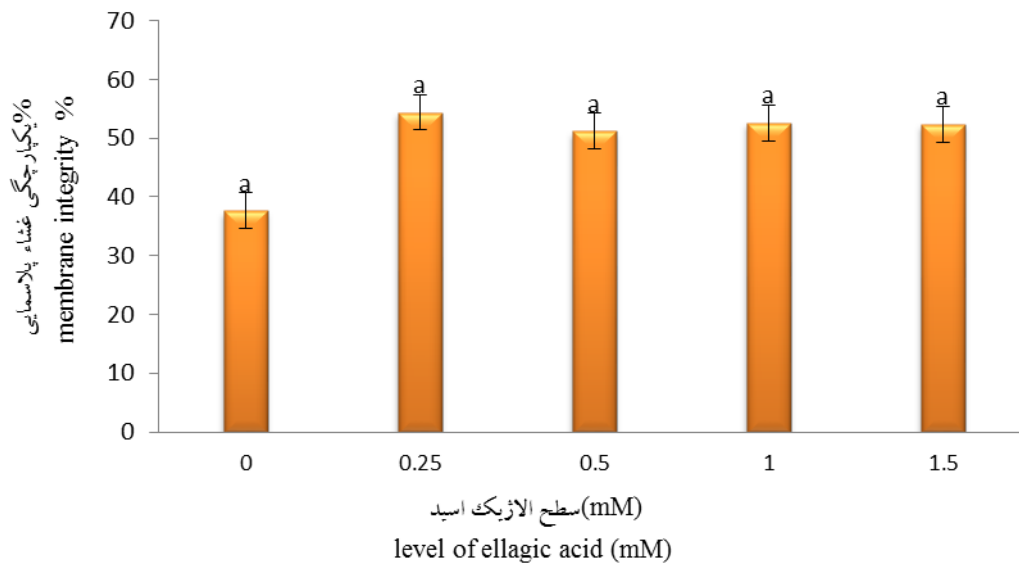
درصد تحرک کل (TM)، درصد تحرک پیشرونده (PM)، میانگین سرعت در مسیر (VAP)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL)، سرعت در مسیر منحنی (VCL)، راستی مسیر طی شده (STR)، درصد خطی بودن تحرک (LIN)

Means within same row with different superscripts are different ($P < 0.05$).



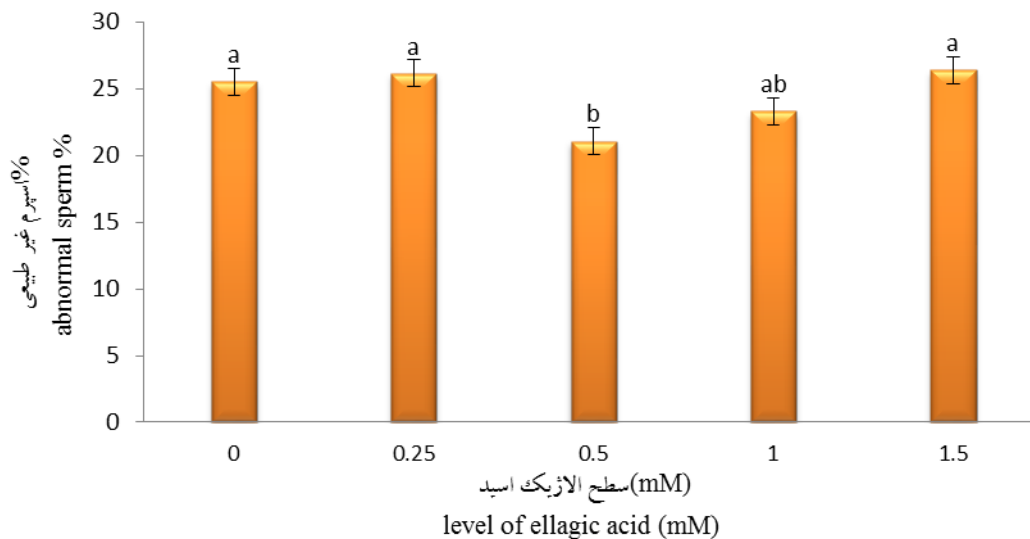
شکل ۱- مقایسه درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها در نمونه‌های با سطوح مختلف الازیک اسید

Figure 1- Comparison of the sperm viability percentage in samples with different levels of Ellagic acid



شکل ۲- مقایسه درصد یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها در نمونه‌های با سطوح مختلف الازیک اسید

Figure 2- Comparison of the percentage of sperm membrane integrity in samples with different levels of Ellagic acid



شکل ۳- مقایسه درصد اسپرم غیر طبیعی در نمونه‌های با سطوح مختلف الازیک اسید

Figure 3- Comparing the sperm abnormality percentage in samples with different levels of ellagic acid

استرس اکسیداتیو شوند که می‌توانند منجر به نابرابری اسپرم‌ها شوند (۴۶). مطالعات پیشین، اثرات مفید ناشی از افزودن آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک به رقیق‌کننده انجماد منی برای کاهش اثرات مضر ROS را ثابت کرده‌اند (۱۰). مطالعات در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که ترکیبات فنولیک می‌توانند بطور مستقیم رادیکال‌های آزاد سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، هیدروکسیل و پراکسیل را پاکسازی و جاروب کنند (۳۸).

در هیچ یک از گروه‌های تیماری تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز و مالون دی‌آلدهاید مشاهده نشد (جدول ۲)

بحث

محققان در تلاشند تا با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها بتوانند مانع از کاهش تحرک، افزایش مرگ و میر و آسیب به DNA در شرایط

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف الایژیک اسید بر آنزیم‌های گلوکوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و مالون‌دی‌آلدهید تولیدی پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

Table 2- The effect of different levels of ellagic acid on glutathione peroxidase, superoxide dismutase, total antioxidant capacity and malondialdehyde production after freezing-thawing process

| فراسنجه‌ها Parameters | تیمارهای آزمایشی (Antioxidants) (mM/ml) | | | | | SEM | P-value |
|--------------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|---------|
| | Control | 0.25 | 0.5 | 1 | 1.5 | | |
| GPx (IU/g protein) | 10.03 | 9.37 | 9.07 | 8.90 | 10.15 | 0.32 | 0.0962 |
| SOD (U/ml) | 101.00 | 118.33 | 109.00 | 108.00 | 106.00 | 8.88 | 0.7376 |
| TAC (nmol/ml) | 0.51 ^b | 2.14 ^a | 2.19 ^a | 3.04 ^a | 3.25 ^a | 0.27 | 0.0005 |
| MDA (mol/ml) | 39.55 | 39.26 | 21.13 | 28.36 | 17.01 | 6.65 | 0.1635 |

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P < 0.05$)

گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC)، مالون‌دی‌آلدهید (MDA)

Means within same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

زنده‌مانی و تحرک اسپرم باشد (۴۹ و ۴۱).

در یک بررسی استفاده از سیس پلاتین (Cisplatin) باعث رشد غیرطبیعی اسپرم خرگوش شد که احتمالاً ناشی از بلوکه شدن الایژیک اسید باشد (۴۴). در مطالعه‌ای خصوصیات آنتی‌آپوپتوتیک، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و بهبود دهنده سایر آسیب‌های وارده به اسپرم، الایژیک اسید، در درمان صدمات ناشی از آدریامایسین بیضه موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج بیانگر اثرات حفاظتی الایژیک اسید از پراکسیداسیون لیپیدی و آپوپتوز بیضه بود (۱۳). همین‌طور، سیکلو فسفامید سبب القا لیپید پراکسیداسیون شده و منجر به آسیب به ساختار اسپرم و بافت بیضه در خرگوش شد. تجویز ۲ میلی‌گرم بر کیلو گرم الایژیک اسید، اثر حفاظتی را اعمال کرد (۱۲). در مطالعه حاضر افزودن تمامی سطوح الایژیک اسید نتوانست سبب افزایش معنی‌دار یکپارچگی غشاء نسبت به گروه شاهد شود. در تحقیقی افزودن ۱ و ۲ میلی‌مولار از آنتی‌اکسیدان الایژیک اسید بر سردسازی منی قوچ باعث بهبود سلامت غشاء اسپرم شد (۳۴) که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی ندارد. احتمالاً این تفاوت ناشی از متفاوت بودن رقیق‌کننده بکار رفته یا سایر عوامل تأثیرگذار باشد. نتایج مطالعه حاضر مغایر با نتایج نجفی و همکاران (۲۰۱۴) می‌باشد که گزارش کردند استفاده از آنتی‌اکسیدان سبب افزایش یکپارچگی غشای اسپرم قوچ می‌شود (۳۴).

در پژوهش حاضر افزودن ۰/۵ میلی‌مولار الایژیک اسید باعث کاهش اسپرم‌های غیرنرمال شد. در مطالعه‌ای استفاده از عصاره انار در تغذیه موش‌ها باعث کاهش اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (7). از بین رفتن فعالیت غشایی اسپرم به سبب پراکسیداسیون لیپیدی در غشاء پلاسمایی اسپرم، دلیلی بر از بین رفتن سیالیت غشاء و فعالیت سلول خواهد بود (۴). به همین علت افزودن مواد محافظ انجماد و مواد دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی به رقیق‌کننده منی، می‌تواند سبب کم کردن اثر شوک سرمایی به اسپرم شود. در پژوهش حاضر افزودن الایژیک اسید سطح

اثرات آنتی‌اکسیدانی ترکیبات پلی‌فنولیک عمدتاً به خاصیت الکترونی دهنده‌گی این ترکیبات ارتباط داشته و می‌توانند با انتقال گروه هیدروکسیل از ساختمان خود به لیپیدها، آنها را از حمله رادیکال‌های آزاد و فرآیند لیپید پراکسیداسیون حفظ کنند. همچنین این ترکیبات قادر به ایجاد کمپلکس با یون‌های فلزی و مهار فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو و هیدرولیتیک هستند، در نتیجه می‌توانند فعالیت جذب یا مهار رادیکال‌های آزاد را از خود نشان دهند (۳۴). مطالعات نشان دادند که الایژیک اسید دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و یک ترکیب فنولی است (۴۴). علاوه بر این افزودن عصاره انار سبب بهبود صفات کیفی مایع منی شد (۲۸).

در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدان الایژیک اسید بر کیفیت اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد/یخ‌گشایی مورد بررسی قرار گرفت. الایژیک اسید بدلیل داشتن چهار گروه فنولیک که با یک ساختار بنزوفوران ترکیب شدند، دارای خاصیت جاروب‌کنندگی (گونه‌های فعال اکسیژن) ROS و (گونه‌های فعال نیتروژن) RNS است (۱۱)؛ که باعث کاهش اثر رادیکال‌های آزاد بر روی سلول اسپرم شده و همین‌طور با داشتن خاصیت ضدآپوپتوزی (۳۰) در نهایت باعث افزایش زنده‌مانی سلول اسپرم می‌شود. در مطالعه حاضر تمامی سطوح مورد بررسی سبب افزایش قدرت زنده‌مانی اسپرم‌ها و بهبود صفات مرتبط با تحرک اسپرم شد؛ که نتایج بدست آمده در این بررسی با نتایج سایر مطالعات همخوانی داشت (۷، ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۸). مطالعه ال-شیشتاوی و همکاران (۲۰۱۶) بر روی منی گاو نشان داد که استفاده از عصاره انار سبب بهبود تحرک در ۱۰ روز بعد از نگهداری آن شد و همین‌طور زنده‌مانی و تحرک بعد از یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. که نتایج این تحقیق با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت. با توجه به اینکه اسید الایژیک یک ترکیب فنولی است و دارای فعالیت‌های بیولوژیک متنوعی، از قبیل خاصیت قوی آنتی‌اکسیدانی (22) خواص آنتی‌موتازن، آنتی‌آپوپتوز است، اما قدرت بالای آن احتمالاً در نتیجه مهار رادیکال‌های آزاد OH^- و O^- است که منتج به افزایش

گلوکوتاتیون (GSH)، گلوکوتاتیون پراکسیداز (GSH-PX) و کاتالاز (CAT) در سطوح مختلف مورد استفاده عصاره انار بود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت ندارد (۴۴).

اسپریم‌ها دارای مکانیسم‌های متعدد دفاعی در برابر انواع گونه‌های اکسیژن فعال هستند. این مکانیسم‌ها شامل کاتالاز، اسید اوریک، تورین، گروه‌های تیول، اسید اسکوربیک و α -توکوفرول است، اما مهمترین آنها سوپراکسید دیسموتاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز و سیستم ردوکتاز گلوکوتاتیون می‌باشند، که احتمالاً الازیک اسید بر روی سایر عوامل بالا برنده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام به غیر از افزایش در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز موثر بوده است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به دست آمده از این بررسی موید آن است که استفاده از ۰/۵ میلی‌مولار الازیک اسید باعث بهبود پارامترهای مربوط به کیفیت اسپرم و کاهش فرآیند اکسیداتیو شد ($P < 0/05$). این در حالیست که غلظت‌های بالا نسبت به غلظت‌های پایین‌تر تاثیر کمتری بر بهبود کیفیت اسپرم داشتند.

MDA را نسبت به گروه شاهد بطور معنی‌داری کاهش نداد؛ در نتیجه سلامت غشاء پلاسمایی نیز در افزودن این آنتی‌اکسیدان در تمامی سطوح مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. نتایج پژوهش حاضر مغایر با نتایج مهدی پور همکاران (۲۰۱۶) می‌باشد که گزارش کردند استفاده از آنتی‌اکسیدان گیاهی باعث کاهش میزان MDA اسپرم قوچ قزل بعد از فرآیند انجماد می‌شود (۲۹). افزودن عصاره انار به محیط رقیق‌کننده منی خروس باعث افزایش اثرات محافظتی در برابر پراکسیداسیون لیپیدی در طول ذخیره‌سازی تا ۳۶ ساعت شده بود که با نتایج مطالعه ای حاضر مطابقت نداشت (۵).

علاوه بر این در پژوهش حاضر تمامی سطوح الازیک اسید سبب بهبود پارامترهای مربوط به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام نسبت به گروه شاهد شد، در حالیکه فعالیت سایر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی را افزایش نداد. مهدی پور و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که استفاده از آنتی‌اکسیدان گیاهی باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم بعد از یخ‌گشایی می‌شود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (۲۹). ترک و همکاران (۲۰۰۸) با افزودن عصاره انار به جیره موش‌های نر تاثیر آنرا در کیفیت اسپرم، تراکم سلول اسپرم، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سطح تستوسترون مورد مطالعه قرار داد، که نتایج بیانگر کاهش قابل ملاحظه میزان MDA و افزایش معنی‌دار فعالیت

منابع

- 1- Agarwal, A. and R. A. Saleh. 2002. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urologic Clinics of North America*, 29(4):817-827.
- 2- Aitken, R.J. 1994. Pathophysiology of human spermatozoa. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 6(2): 128-135.
- 3- Aitken, R. J., H. M. Fisher, N. Fulton, E. Gomez, W. Knox, B. Lewis, and S. Irvine. 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(4):468-482.
- 4- Aitken, R. J. and D. Sawyer. 2003. The human spermatozoon—not waving but drowning. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 518: 85-98.
- 5- Al-Daraji, H. J. 2015. The use of pomegranate juice for counteract lipid peroxidation that naturally occurred during liquid storage of roosters' semen. *Pharmacogn Commu*, 5(1): 70-76.
- 6- Alvarez, J. G. and B. T. Storey. 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 42(3): 334-346.
- 7- Amini Rad, O., M. A. Khalili and H. R. Soltani Gord Faramarzi. 2009. Influence of pomegranate juice on sperm parameters and fertility in mice. *Medical Journal of Hormozgan University*, 13(3): 182-188.
- 8- Bailey, J. L., J. F. Bilodeau and N. Cormier. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21(1): 1-7.
- 9- Bansal, A. K. and G. S. Bilaspuri. 2008. Effect of ferrous sulphate and ascorbic acid on motility, viability and lipid peroxidation of crossbred cattle bull spermatozoa. *Animal*, 2(1): 100-104.
- 10- Bilodeau, J. F., S. Blanchette, C. Gagnon and M. A. Sirard. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2): 275-86.
- 11- Bondet, V., W. Brand-Williams and C. Berset. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Food Science and Technology*, 30(6): 609-615.
- 12- Ceribasi, A. O., G. Turk, M. Sonmez, F. Sakin and A. Atessahin 2010. Toxic effect of cyclophosphamide on sperm morphology, testicular histology and blood oxidant-antioxidant balance, and protective roles of lycopene and ellagic acid. *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology*, 107(3): 730-736.

- 13- Çeribaşı A. O., F. Sakin, G. Türk, M. Sönmez and A. Ateşşahin. 2012. Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(7-8): 717–724.
- 14- Cocuzza, M., S. C. Sikka, K. S. Athayde, and A. Agarwal. 2007. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *International Brazilian Journal of Urology*, 33(5):603-621.
- 15- Daghigh Kia, H., R. Shahbaz zadeh and I. Ashrafi. 2015. Antioxidant effect of *Macrantha Satureja* extraction on microscopic and biochemical parameters of bull sperm after freeze -thawing process. *Animal Science Journal*, 28(108): 101-112.
- 16- Domínguez-Rebolledo, A. E., M. R. Fernández-Santos, A. Bisbal, J. L. Ros-Santaella, M. Ramón, M. Carmona, F. Martínez-Pastor and J. Garde. 2010. Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reproduction, Fertility, and Development*, 22(5): 856–70.
- 17- Dorai, T. and B. B. Aggarwal. 2004. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer letters*, 215(2): 129-140.
- 18- El-Sheshtawy, R. I., G. A. El-Sisy and W. S. El-Nattat. 2016. Effects of pomegranate juice in Tris-based extender on cattle semen quality after chilling and cryopreservation. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(4): 335-339.
- 19- Evans, G., W. M. C. Maxwell and S. Salamon. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths, Sydney, Boston.
- 20- Farhadi, R., H. Daghigh Kia and I. Ashrafi. 2015. The effect of *salvia sahendica* ethanolic extract as natural antioxidant on quality parameters of cryopreserved Holstein bull sperm. *Research on Animal Production*, 6(12): 79-86.
- 21- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1998. *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd ed.) Oxford University.
- 22- Hassoun, E. A., J. Vodhanel and A. Abushaban. 2004. The modulatory effects of ellagic acid and vitamin E succinate on TCDD-induced oxidative stress in different brain regions of rats after subchronic exposure. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 18(4): 196–203.
- 23- Jones, R., T. Mann, and R. Sherins. 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertility and sterility*, 31(5):531-537.
- 24- Khosrowbeygi, A. and N. Zarghami. 2007. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 77(2):117-121.
- 25- Kumar, H. and S. Mahmood. 2001. The use of fast acting antioxidants for the reduction of cow placental retention and subsequent endometritis. *Indian Journal of Animal Sciences*, 71: 650–653.
- 26- Lenzi, A., L. Gandini, M. Picardo, F. Tramer, G. Sandri, and E. Panfili. 2000. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. *Frontiers in Bioscience*, 5(1):1-15.
- 27- Maia Mda, S., S. D. Bicudo, C. C. Sicherle, L. Rodello and I. C. S. Gallego. 2010. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Animal Reproduction Science*, 122(1-2): 118–23.
- 28- Mansour, S. W., S. Sangi, S. Harsha, M. A. Khaleel and A. R. Ibrahim. 2013. Sensibility of male rats fertility against olive oil, *Nigella sativa* oil and pomegranate extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(7): 563-568.
- 29- Mehdipour, M., H. Daghigh kia, A. Najafi, H. Vaseghi Dodaran and O. Garcia-Alvarez. 2016. Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, 73, 297-303.
- 30- Mertens-Talcott, S. U. and S. S. Percival. 2005. Ellagic acid and quercetininteract synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer letters*, 218(2): 141-151.
- 31- Miller, J. K., E. Brzezinska-Slebodzinska and F. C. Madsen. 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*, 76(9): 2812–2823.
- 32- Najafi, A., H. Daghigh Kia, H. Mohammadi, M. H. Najafi, Z. Zanganeh, M. Sharafi, F. Martinez-Pastor and H. Adeldust. 2014. Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. *Cryobiology*, 69: 68-73.
- 33- Omur, A. D. and K. Coyan. 2016. Protective effects of the antioxidants curcumin, ellagic acid and methionine on motility, mitochondrial transmembrane potential, plasma membrane and acrosome integrity in freeze-thawed Merino ram sperm. *Veterinari Medicina*, 61(1): 10–16.

- 34- Omur, A., K. Cayan, C. Ozturk, S. Gungor and M. Bucak. 2014. The effects of curcumin, ellagic acid and methionine on post-thawed Merino rams sperm parameters. *The FASEB Journal*, 28(1): supplement 759.1.
- 35- Osawa, T. 1994. Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. In *Postharvest Biochemistry of plant Food-Materials in the Tropics*; Uritani, I, Garcia, V, Mendoza V. Japan Scientific Societies Press: Tokyo, Japan; 241–251.
- 36- Placer, Z. A., L. L. Cushman and B. C. Johnson. 1966. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyldialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16(2): 359–364.
- 37- Priyadarsini, K. I., S. M. Khopde, S. S. Kumar and H. Mohan. 2002. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7): 2200–6.
- 38- Revell, S. G. and R. A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2): 77–86.
- 39- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, P. G. Bolwell, P. M. Bramley and J. B. Pridham. 1995. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4): 375–383.
- 40- Salamon, S. and W. M. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3): 77-111.
- 41- Schäfer, S. and A. Holzmann. 2000. The use of transmigration and Spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 59(3-4): 201–211.
- 42- Seeram, N. P., L. S. Adams, S. M. Henning, Y. Niu, Y. Zhang, M. G. Nair and D. Heber. 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(6): 360–7.
- 43- Sikka, S. C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, 1.e78–e86.
- 44- Tavailani, H., M. T. Goodarzi, A. Vaisi-Raygani, S. Salimi, and T. Hassanzadeh. 2008. Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *International Braz Journal Urology*, 34(4):485-491.
- 45- Türk, G., A. Ateşşahin, M. Sönmez, A. O. Ceribaşı and A. Yüce. 2008. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertility and Sterility*, 89(5): 1474–148.1.
- 46- Turk, G., S. M. Sonmez, M. Aydin, A. Yuce, S. Gur, M. Yukselm E. H. Aksu and H. Aksoy. 2008. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clinical Nutrition*, 27(2): 289–296.
- 47- Vатtem, D. A. and K. Shetty. 2003. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using solid-state system. *Process Biochemistry*, 39(3): 367-379.
- 48- Verma, A., K. C. Kanwar. 1999. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian Journal of Andrology*, 1(3): 151-4.
- 49- Woolliams, J. A., G. Wiener, P. H. Anderson and C. H. Murray. 1983. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Research in Veterinary Science*, 34 (3): 253-256.
- 50- Zalata, A., T. Hafez, and F. Comhaire. 1995. Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Human Reproduction*, 10(6):1444-1451.



Use of the Ellagic Acid Antioxidant to Improve Quality of Freeze-Thawed Ghezel Sperm

Z. Blouky¹ - H Daghigh Kia^{2*} - A. Najafi³ - M. Mahdipour³

Received: 20-08-2016

Accepted: 24-06-2017

Introduction The highest damage to the sperm is caused by oxidative stress due to the production of reactive oxygen species (ROS). Semen cryopreservation causes some structural, biochemical and functional changes, which leads to various problems in sperm transport, survival and fertility rate in domestic animals. Also, sperm metabolism produces ROS, which is potentially harmful to the sperm plasma membrane integrity loss of motility. High concentrations of ROS have negative effects on sperm quality and increased degradation of DNA, lipid peroxidation and oxidative stress which inhibits sperm motility and changes in sperm infrastructure and finally the reduction of fertility.

Seminal plasma contains enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and catalase (CAT) which have an important role in the inhibition of the deleterious effects of ROS. Lipid peroxidation may be due to lack of coordination between SOD, GPX, and CAT in seminal plasma or deficiency of total antioxidant capacity of the cell. Ellagic acid is a polyphenol compound that can be found in green tea and other natural resources such as pomegranate, strawberry, raspberry, walnut and eucalyptus bark. Ellagic acid showed antioxidant and anti-apoptotic effects, it can delay or prevent cellular oxidation; ultimately reduce oxidative stress. Ellagic acid increases the activity of enzymes SOD, CAT and GPx by preventing free radical attack to cells. This research was conducted to evaluate the antioxidant effect of different levels of Ellagic acid on microscopic, biochemical parameters, antioxidant enzyme activities and total antioxidant capacity of ram semen after freezing-thawing process.

Materials and Methods Five Ghezel rams were used. Semen samples were collected twice a week using artificial vagina. In order to remove individual effects, the semen samples were pooled together. Different levels of ellagic acid (0.25, 0.5, 1, 1.5 mM) were added in diluent of tris-lecithin based. After processing and freezing, the samples were stored in liquid nitrogen until the time of evaluation. After thawing of semen samples, sperm motility parameters were evaluated using CASA system, viability by with Eosin-nigrosin staining, membrane integrity with a solution of hypo-osmotic, sperm abnormalities using a solution of Hancock, lipid peroxidation by measuring malondialdehyde and the seminal plasma antioxidant enzymes of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and total antioxidant capacity using the RANDOX Laboratories kit. The data were analyzed with SAS (9.1.3) software using GLM procedures.

Results and Discussion The results showed that the levels of 0.25, 0.5, 1 and 1.5 mM ellagic acid improved survival and total motility parameters ($P < 0.05$). Addition of 0.5 mM ellagic acid reduced abnormal sperm, but improved the linearity motion, straight line velocity and average path velocity of sperm ($P < 0.05$). Addition of 0.25 mM level improved the curvilinear velocity compared to the control group. Total antioxidant capacity was improved in all the treated compared to the control group ($P < 0.05$). Increasing TAC level in seminal plasma may have a significant role in sperm normality. No significant difference was found in the glutathione peroxidase activity and superoxide dismutase enzymes and malondialdehyde levels in treatments containing ellagic acid compared to the control group. Sperm have multiple mechanisms of defense against reactive oxygen species. These mechanisms include catalase, uric acid, taurine, thiols, ascorbic acid and α -tocopherol, but the superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductases are the most important ones. Apart from the increase in the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes, ellagic acid probably had an impact on other factors to increase the total antioxidant capacity. All levels of ellagic acid non-significantly increased the plasma membrane integrity compared to the control group. The loss of sperm plasma membrane activity due to the lipid peroxidation may lead to loss of membrane fluidity and cell activity (Aitken

1-MSc Graduated student, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2-Professor, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3-Ph.D. Student, Department of Animal Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(*-Corresponding Author Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir)

and Sawyer, 2003). For this reason, addition of cryoprotectants and antioxidants to the extender can reduce the effects of cold shock on sperm.

Conclusion The findings of this study showed that the diluent containing 0.5 mM ellagic acid significantly improved sperm parameters compared to other levels, after freezing-thawing process.

Keywords: Cryopreservation, Ellagic acid, Ram, sperm.