نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۵ شماره ۱/ سال۱۳۹۴

اثرعصاره اتانولی گیاه مرزنجوش بر فراسنجه‌های کیفی و غلظت مالون‌دی‌آلدهید اسپرم منجمد یخ‌گشایی شده گاو هلشتاین

رامین فرهادی[۱]، حسین دقیق‌کیا[۲]، علی حسین‌خانی[۲]، بابک قاسمی پناهی[۳]، غلامرضا دهقان[۴] و ایرج اشرفی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۲۸

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۲] دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۳] استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۴] دانشیار دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز
[۵] دانشجوی دکتری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: مراحل مختلف عمل‌آوری، نگهداری و انجماد منی، بدلیل ایجاد استرس‌های فیزیولوژیکی و شیمیایی در سطح غشای اسپرم، باعث کاهش کیفیت اسپرم منجمدیخ گشایی شده می‌شود. برای مقابله با این مشکل استفاده از آنتی-اکسیدان‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. **هدف**: هدف این مطالعه بررسی تأثیر عصاره گیاه مرزنجوش بعنوان آنتی-اکسیدان طبیعی، بر پارامترهای میکروسکوپی و بیوشیمیایی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاو هلشتاین بود. **روش کار**: در این تحقیق از ۳ رأس گاو هلشتاین، دو بار در هفته، توسط واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شده و جهت از بین بردن اثرات فردی دام‌ها، انزال‌ها در نسبت‌های مساوی با هم مخلوط شدند. سطوح مختلف عصاره گیاه مرزنجوش (۲، ٤، ۸، ۱۲، ۱٦، ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر محلول رقیق‌کننده) به رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم مرغ-سیترات افزوده شد. نمونه‌ها پس از طی مراحل سردسازی و تعادل، در معرض بخار نیتروژن مایع، منجمد و تا زمان ارزیابی در داخل ازت مایع نگهداری شدند. بعد از یخ‌گشایی، پارامترهای تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشا و پراکسیداسیون لیپید به ترتیب توسط سیستم کاسا، رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین، محلول هیپواسموتیک و اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدئید ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که افزودن سطح ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر از عصاره مرزنجوش باعث بهبود معنی‌دار پارامترهای تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها، بعد از فرآیند انجماد-یخ گشایی در مقایسه با گروه شاهد شده و نیز میزان پراکسیداسیون لیپید را نسبت به گروه شاهد بطور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کاهش داد. **نتیجه‌گیری نهایی**: بررسی ما تاثیر مثبت عصاره مرزنجوش در سطح ٤ میلی لیتر بر دسی لیتر بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ گشایی شده گاو را تایید می‌کند.

واژگان کلیدی: اسپرم، انجماد-یخ گشایی، آنتی‌اکسیدان گیاهی

مقدمه

به منظور دستیابی به مزایای تلقیح مصنوعی، ذخیره-سازی بلند مدت منی بصورت منجمد شده یک امر ضروری محسوب می‌شود. فرآیند انجماد با توقف فعالیت‌های متابولیکی اسپرم امکان ذخیره‌سازی طولانی مدت آنها را مهیا می‌کند (بیلی و همکاران ۲۰۰۰). در طول فرآیند انجماد-یخ‌گشایی منی، تنش‌های فیزیکی و شیمیایی در غشای اسپرم بوجود آمده و موجب کاهش کیفیت، زنده‌مانی، تحرک و قدرت باروری اسپرم‌ها می-شود؛ این آسیب‌ها با تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد بویژه گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)[1] و پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای سلول اسپرم، همراه است (چاترجی و همکاران ۲۰۰۱). استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین تولید ROS و سیستم بیولوژیکی کنترل کننده رادیکال‌های آزاد است که در طول فرآیند انجماد، موجب تخریب دیواره غشاء و کل ترکیبات ساختمانی اسپرم می‌شود (فاربر ۱۹۹٤ و بیلودائو و همکاران ۲۰۰۰). از طرف دیگر اسپرم پستانداران سرشار از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، فسفولیپیدها و استرول‌ها است که بسیار مستعد اثر انواع اکسیژن‌های فعال بوده و این امر سبب کاهش تحرک اسپرم، کاهش سریع ATP داخل سلولی و بوجود آمدن آسیب‌های ساختمانی می‌شود. بطورکلی اغلب اثرات مهم پراکسیداسیون لیپیدی در تمام سلول‌ها، اختلال در ساختار غشا و ارگانل‌های داخل سلولی و عملکرد آن (فرآیندهای انتقال، حفظ یون‌ها و شیب متابولیت‌ها، رسپتور واسطه انتقال پیام وغیره) را شامل می‌شود (لنزی و همکاران ۱۹۹٤). سلول اسپرم دارای مکانیسم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی است اما در فرآیند رقیق‌سازی نسبت آنتی‌اکسیدان‌های داخلی کاهش یافته و برای فرآوری اسپرم نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدان‌های با منشأ خارجی می‌باشد (بانسال و بیلاسپوری ۲۰۱۱). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که سنتز رادیکال‌های آزاد، بخصوص ROS را کنترل، خنثی، متوقف کرده و یا با فعالیت آنها مقابله می‌کنند (سیکا ۱۹۹٦). امروزه بدلیل مشکلات ایمنی، ترکیبات سمی و سرطان‌زای موجود در برخی آنتی‌آکسیدان‌های سنتتیک (بتاهیدروکسی تولوئن، بوتیلانید هیدروکسی آنیزول، پروپیل گالات و غیره) و صرفه اقتصادی، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفته است (مالو و همکاران ۲۰۱۱). خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان بطور عمده به ترکیبات فنولیک، فلاوونوئیدها، اسیدهای فنولیک و دی‌ترپن‌های فنولیک مربوط می‌شود (ولی اغلو و همکاران ۱۹۹۸). ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدها بدلیل خواص اکسید و احیاکنندگی، دهنده گروه هیدروکسیل و داشتن خصوصیت کیلات کنندگی یون‌های فلزی، نقش مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد بخصوص ROS و تجزیه پراکسیدها دارند (اوساوا ۱۹۹٤ و آرورا و همکاران ۱۹۹۸).

گیاه مرزنجوش (Origanum Vulgare) یک گیاه آروماتیک از خانواده نعناعیان است که عمدتا در شرق مدیترانه و آسیا یافت می‌شود. مطالعات پیشین خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریال این گیاه را اثبات کرده‌اند (اسکولا و همکاران ۲۰۰۸ و روفچائی و همکاران ۲۰۱۱). بسیاری از گیاهان بخصوص اعضای خانواده نعناعیان مانند مرزنجوش، مریم‌گلی، نعناع و آویشن حاوی مقادیر زیادی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از قبیل پلی‌فنول‌ها، ویتامین‌های C، E و کاروتنوئیدها هستند که این ترکیبات نقش بسیار مهمی در جذب و خنثی‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال، اکسیژن منفرد، سه‌گانه و تجزیه پراکسیدها ایفا می‌کنند (جوان مردیا و همکاران ۲۰۰۳، مالو و همکاران ۲۰۱۰ و کورسات و همکاران ۲۰۱۱). خواص آنتی‌اکسیدانی مرزنجوش اکثرا به وجود ترکیبات فنولیکی مانند اسید رزمارینیک، کوئرستین، کامفرول، کافئیک اسید و همولوگ‌های توکوفرول مربوط می‌شود که از ترکیبات قوی پاک کننده رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شوند (کیکوزاکی و ناکاتانی ۱۹۸۹ و سراتو و

[1] - Reactive oxygen species

همکاران ۲۰۰۰). هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه مرزنجوش به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی بر پارامترهای میکروسکوپی و بیوشیمیایی اسپرم گاو هلشتاین بعد از فرآیند انجماد-یخ گشایی بود.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری

نمونه‌های گیاه مرزنجوش از اطراف شهرستان کلیبر واقع در استان آذربایجان‌شرقی جمع‌آوری شده و در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تعیین گونه شدند. این گیاه را به مدت ۱۰ روز در سایه خشک کرده و سپس با آسیاب برقی پودر شد. مقدار ۵۰ گرم از پودر گیاه وزن شده و با ۳۵۰ میلی‌لیتر الکل اتانول بمدت ۲٤ ساعت خیسانده شد. بعد از فیلترکردن با کاغذ صافی، محلول حاصل بوسیله دستگاه تقطیر در خلاء در دمای ۷۵°C الکل تبخیر شده و ماده غلیظی تحت عنوان عصاره آنرا بدست آورده و تا زمان اجرای آزمایش در دمای ٤°C نگهداری شد. در زمان اجرای آزمایش ۳۰۰ میلی‌گرم از عصاره در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر شده حل کرده و مورد استفاده قرار گرفت. برای سهولت حل شدن عصاره، مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول توئین ۸۰ درصد به آن افزوده شد.

جمع آوری منی

در این تحقیق از سه رأس گاو هلشتاین که در شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسانی قرار داشتند، با استفاده از واژن مصنوعی و به تعداد دو بار در هفته اسپرم‌گیری شد. برای از بین بردن اثرات فردی دام‌های نر، مقادیر مساوی از نمونه‌های منی از هر سه رأس دام نر در هر تکرار آزمایشی با هم مخلوط شده و سپس مورد استفاده قرار گرفتند. قبل از انجام اسپرم‌گیری، تمام اجزای واژن مصنوعی بمدت حداقل یک ساعت در دمای ٤۰°c گرم شدند. دمای داخل مهبل مصنوعی ٤۲°c-٤۵ بوده و برای سهولت دخول آلت‌تناسلی دام نر، سطح داخلی مهبل با وازلین آغشته شده بود. پس از اسپرم-گیری نمونه‌های منی بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردیده و در حمام آب ۳۵°c قرار داده شدند. نمونه‌های منی از نظر حجم، رنگ، عدم آلودگی به ادرار و خون، غلظت و تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها بررسی شده و نمونه‌های منی با رنگ کرمی تیره، حجم ۱۰-۵ میلی‌لیتر، غلظت اسپرم بیش از یک میلیارد در هر میلی‌لیتر نمونه منی، درصد حرکت پیش‌رونده بالاتر از ۷۰، مورد استفاده قرار گرفتند (گیل و همکاران ۲۰۰۳). غلظت اسپرم‌ها توسط دستگاه فتومتر و درصد تحرک پیش رونده به کمک سیستم کاسا تعیین شدند.

تهیه رقیق کننده

در این تحقیق از رقیق‌کننده بر پایه سیترات-زرده تخم مرغ استفاده شد که ۱۰۰ میلی‌لیتر این رقیق‌کننده دارای: ۲۵ میلی‌لیتر زرده تخم مرغ، ٦۷/۱٦۷۵ میلی‌لیتر محلول سیترات (۲/۹۲٪)، ۷ میلی‌لیتر گلیسرول، ۵ میلی‌لیتر جنتامایسین، ۰/۳ میلی‌لیتر لینکوپکتین، ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر تایلوزین، بود. رقیق‌کننده به دو بخش A و B تقسیم شد؛ که به بخش A، ۳٪ گلیسرول و به بخش B، ۱۱٪ گلیسرول اضافه شد. نوع A به دمای ۳۵°c و نوع B به دمای ۵°c منتقل شدند. pH رقیق‌کننده حدود ٦/۹ بود. در دمای ۳۵°c عصاره گیاه مرزنجوش که از قبل هم دما شده بود، در سطوح مختلف (۰، ۲، ٤، ۸، ۱۲، ۱٦ و ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر محلول رقیق‌کننده A) افزوده شدند.

اعمال تیمار، سردسازی، مرحله تعادل، بسته‌بندی و انجماد

پس از ارزیابی اولیه، نمونه‌های منی با غلظت ۵۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده به لوله‌های فالکون‌های حاوی سطوح مختلف عصاره و رقیق کننده A اضافه شده و فالکون‌ها در داخل ظرف آب هم دما به دمای ۵°C منتقل شدند. بعد از سپری‌شدن زمان،

سردسازی و تعادل در دمای ۵°C، رقیق کننده B (حاوی ۱۱٪ گلیسرول) که قبلا هم دما شده بود، به فالکون‌ها اضافه شد تا غلظت نهایی گلیسرول به ۷٪ برسد. نمونه-ها بعد از تثبیت در این دما در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری پر و بسته‌بندی شدند. سپس پایوت‌ها روی راک چیده شده و به دستگاه نیمه‌اتوماتیک انجماد اسپرم که قبلا در دمای ۵۰°C- تنظیم شده بود، منتقل شدند. پایوت‌ها بمدت دو دقیقه در دمای ۵۰°C- قرار گرفته و در ادامه شیب انجماد به گونه‌ای تنظیم شد که دمای داخل دستگاه در عرض ۱٤ دقیقه از ۵۰°C- به ۱۵۰°C- رسید (حدود ۷°C- درجه در هر دقیقه). سپس پایوت‌ها به تانک ازت مایع (۱۹٦°C-) انتقال یافته و تا زمان یخ‌گشایی در این دما نگهداری شدند.

ارزیابی منی

ارزیابی تحرک اسپرم

بعد از یخ‌گشایی پایوت‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۳۷°C، پارامترهای تحرک کلی و پیش‌رونده، سرعت در مسیر میانگین، سرعت در مسیر منحنی، سرعت در مسیر مستقیم، جنبایی عرضی سر و جنبایی خطی ارزیابی شدند. جهت ارزیابی پارامترهای تحرک، ابتدا محتوای پایوت‌های یخ‌گشایی شده به میکروتویوب انتقال یافته و بمدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷°C انکوبه شدند. سپس ۵ میکرولیتر از نمونه روی لام از قبل گرم شده (۳۷°C) قرار داده و بعد از پوشاندن با لامل روی صفحه گرم میکروسکوپ قرار داده شد. از هر نمونه حداقل۱۰ فیلد بطور کاملا تصادفی انتخاب شده و تعداد ۲۰۰ اسپرم بوسیله سیستم‌کاسا با بزرگنمایی ۱۰۰× آنالیز شدند.

درصد زنده‌مانی اسپرم

این ارزیابی بوسیله روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین انجام گرفت. ابتدا ۵ میکرولیتر از نمونه منی با ۵ میکرولیتر رنگ (ائوزین ۱٦/۷ گرم/لیتر آب مقطر، نیگروزین ۱۰۰ گرم/لیتر آب مقطر، بافر سیترات ۲۹ گرم/لیتر آب مقطر) روی لام به آرامی مخلوط شده و با لام دیگری گسترش تهیه شد. نمونه گسترش یافته در مدت سه دقیقه در دمای ۳۷°C خشک شد. تعداد ۲۰۰ اسپرم بوسیله روغن ایمرسیون و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی۱۰۰۰× 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.

تست یکپارچگی غشای پلاسمایی (تست HOST)

برای بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول اسپرم از این تست استفاده شد. برای انجام آن ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه منی به آرامی با ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک هم دما (حاوی ۹ گرم/لیتر فروکتوز، ٤/۹ گرم/لیتر سیترات سدیم) مخلوط شده و بمدت ٦۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷°C انکوبه شد. سپس ۵ میکرولیتر از نمونه مخلوط شده روی لام از پیش هم دما شده قرار گرفته و با لامل پوشانده شده و روی صفحه گرم میکروسکوپ فاز کنتراست قرار داده شد. تعداد ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ٤۰۰× شمارش شده و درصد اسپرم‌های با دم متورم و تاب خورده (طبیعی) تعیین شده و به عنوان درصد پاسخ به محلول هیپواسموتیک ثبت شد.

اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA)[1]

غلظت مالون‌دی‌آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید در نمونه‌های منی است که با استفاده از واکنش تیوباربیتوریتیک اسید اندازه‌گیری می‌شود. معمولا در دمای ۹۵°C و شرایط اسیدی یک مولکول MDA با دو مولکول تیوباربیتوریتیک اسید واکنش داده و کمپلکس صورتی رنگی را بوجود می آورد. ابتدا پایوت‌ها در آب ۳۷°C بمدت ٦۰ ثانیه یخ گشایی شده و بلافاصله پس از افزودن ۱ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۹ درصد، نمونه‌ها با دور ۳۵۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و به تعداد سه بار با بافر سیترات شستشو و مجددا سانتریفیوژ شدند. در نهایت محلول رویی دور ریخته

[1]- Malondialdehyde

شده و رسوب باقیمانده اسپرم‌ها در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شده و تا زمان انجام تست، نمونه‌ها در فریزر (-۸۰°C) نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری غلظت MDA، ابتدا نمونه‌ها در دمای ۳۷°C یخ‌گشایی شدند. مقدار۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه را برداشته و با یک میلی‌لیتر محلول اسیدتری‌کلریدریک ۲۰٪ و ۰/۵ درصد تیوباربیتوریتیک اسید مخلوط کرده و به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ۹۵°C حرارت داده شدند. در مرحله بعد نمونه-ها بعد از سرد شدن در داخل یخ، بمدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت عدد جذب MDA محلول رویی هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شده و غلظت MDA بر حسب واحد نانومول در دسی‌لیتر ثبت گردید (پینهو و همکاران ۲۰۰٦).

آنالیز آماری

این مطالعه با ۷ تیمار و در ۵ تکرار انجام شد. بخاطر ماهیت درصدی داده‌های بدست آمده برای پارامترهای تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، پاسخ به محلول HOST، ابتدا برای این داده‌ها تبدیل Arcsin انجام داده و سپس بکمک نرم افزار SAS (۹,۱,۳) و بوسیله رویه GLM تجزیه واریانس انجام شد. داده‌های حاصل از تست اندازه‌گیری MDA نیز توسط این رویه آنالیز شدند. در این آنالیز اثرات تیمار به عنوان اثرات ثابت و اثرات تکرار آزمایشی به عنوان اثرات تصادفی در نظر گرفته شدند. برای مقایسه میانگین تیمارها نیز از میانگین های حداقل مربعات و آزمون دانکن استفاده شد. معیار برای معنی‌داری داده‌ها سطح ۵ درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی پارامترهای تحرک اسپرم‌ها

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها برای پارامترهای تحرک به همراه میانگین انحراف معیار آنها در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان داد که افزودن ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره مرزنجوش باعث بهبود صفات تحرک کل و تحرک پیش‌رونده نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). از طرف دیگر افزودن ١٦ و ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر باعث کاهش معنی‌دار این صفت نسبت به گروه‌های دیگر شد (P<۰/۰۵). برای صفات سرعت در مسیر میانگین، جنبایی عرضی سر، افزودن ۲، ٤ و ۸ میلی‌لیتر در دسی-لیتر از عصاره باعث بهبود این صفات نسبت به گروه شاهد شده و برای صفت سرعت در مسیر منحنی افزودن ۲ و ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر از عصاره باعث عملکرد بهتری نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). همچنین افزودن ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر از عصاره توانست صفت سرعت در مسیر مستقیم را نسبت به گروه شاهد بهبود بخشد (P<۰/۰۵). برای صفت درصد خطی بودن تحرک نیز مشخص شد که افزودن ٤ میلی-لیتر در دسی‌لیتر از عصاره باعث بهبود عملکرد نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). استفاده از سایر سطوح عصاره تأثیر معنی‌داری روی تمامی پارامترهای تحرک اسپرم نداشت.

بررسی زنده‌مانی اسپرم‌ها

نتایج حاصل از آنالیز اثرات سطوح مختلف عصاره مرزنجوش بر صفت زنده‌مانی در جدول ۲ آورده شده است. داده‌های جدول ۲ نشان می‌دهند که افزودن ۲ و ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره مرزنجوش باعث بهبود زنده‌مانی اسپرم‌ها نسبت به گروه شاهد شد در حالیکه افزودن ١٦ و ۲۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها را بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) کاهش داد. سایر سطوح نسبت به گروه شاهد تأثیر معنی‌داری نشان ندادند.

جدول۱- مقایسه پارامترهای تحرک اسپرم منجمد شده گاو هلشتاین در بین سطوح مختلف عصاره مرزنجوش (میلی‌لیتر در دسی‌لیتر رقیق کننده)

صفات	گروه شاهد	۲	٤	۸	۱۲	۱٦	۲۰
تحرک کل(٪)	٥٦/٥^{c}±٦/٥	٦٨/٧^{ab}±٤/٥	٧٢/٣^{a}±٧/٩	٥٩^{bc}±١١/٦	٤٩/٩^{cd}±١١/٧	٤٠/٦^{de}±٨/٦	٣٣/٥^{e}±٥/٥
تحرک پیش‌رونده(٪)	٤٩/١^{bc}±٤/٢	٥٧/١^{ab}±٥/٤	٦٤/٩^{a}±٥/٦	٤٩/٧^{bc}±٥/٧	٤١/١^{cd}±١٠/٦	٣٣/٥^{d}±٩/١	٢٤/١^{e}±٦/٤
سرعت در مسیر میانگین (µm/sec)	٤٢/٣^{b}±٠/٩	٥٢/٣^{a}±٣/٦	٥٢/٦^{a}±٤/٩	٥٠/١^{a}±٧/١	٤٢/٨^{b}±٩/٣	٣٦/٩^{bc}±٦/٣	٣٠/٤^{c}±٣/٥
سرعت در مسیر منحنی (µm/sec)	٢٩/١^{bcd}±١/٤	٣٧/٩^{a}±٥/٧	٤٠/١^{a}±٢/٦	٣٤/٢^{ab}±٣/٧	٢٨/٢^{cd}±٦/٤	٢٣/٢^{de}±٤/٢	١٧/٧^{e}±٣/١
سرعت در مسیر مستقیم (µm/sec)	٢٧/٧^{cd}±٣/١	٣٥/٣^{ab}±٦/٨	٣٧/٧^{a}±٣/٣	٣١/٦^{bc}±٣/٥	٢٥/٩^{cd}±٣/٥	٢٢/٩^{de}±٥/٨	١٨/١^{e}±٢/١
تحرک عرضی سر (µm)	١/٩^{b}±٠/١	٢/٤^{a}±٠/٢	٢/٤^{a}±٠/٣	٢/٢^{a}±٠/٢	٢/١^{ab}±٠/٢	١/٨^{b}±٠/٢	١/٨^{b}±٠/٢
خطی بودن تحرک(٪)	٥٤/٥^{bc}±٣/٧	٥٨/١^{ab}±٦/٤	٦٢/٣^{a}±١/١	٥٢/٤^{cd}±١/٧	٤٩^{de}±٤/٦	٤٦/٦^{e}±٠/٨	٣٨/٩^{f}±٢/٥

*حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ٥٪

جدول۲- مقایسه صفات زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و تولید مالون‌دی‌آلدئید اسپرم منجمد شده گاو هلشتاین در بین سطوح مختلف عصاره مرزنجوش (میلی‌لیتر در دسی‌لیتر محلول رقیق‌کننده)

صفات	گروه شاهد	۲	٤	۸	۱۲	۱٦	۲۰
زنده‌مانی (٪)	٦٦/٢^{cd}±١/٩	٧٣/٨^{ab}±٤/٨	٧٩/١^{a}±٦/٥	٦٩/١^{bc}±٦/٦	٦٠/١^{d}±٧/٧	٥٠/٩^{e}±٥/١	٤٦/١^{e}±٢/٦
یکپارچگی‌غشای‌پلاسمایی (٪)	٦٣/٤^{cd}±٣/٥	٧١/٩^{ab}±٤/١	٧٦/٤^{a}±٦/٦	٦٥/٣^{bc}±٧/٣	٥٧/١^{d}±٥/٥	٤٨/٢^{e}±٦/٢	٤١/٩^{e}±٤/٦
غلظت مالون‌دی‌آلدئید(nmol/dl)	١٨/٢^{ab}±١/١	١٧/٣^{bc}±١/٦	١٥/٦^{c}±٠/٧	١٨/٥^{ab}±١/٧	١٨/٨^{ab}±٢	٢٠/١^{a}±١/٦	٢٠/٢^{a}±١/٦

*حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ٥٪

بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی

داده‌های حاصل از آنالیز اثرات سطوح مختلف عصاره مرزنجوش بر یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها در جدول ۲ نمایش داده شده است. نتایج تجزیه آماری نشان داد که افزودن ۲ و ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر از عصاره مرزنجوش نسبت به گروه شاهد، باعث حفظ غشای پلاسمایی اسپرم‌ها از فرآیند پراکسیداسیون شده و از اینرو سلامت غشایی اسپرم‌ها را بهبود داده است (P<۰/۰٥). اما استفاده از سطوح بالاتر (١٦ و ۲۰ میلی-لیتر در دسی‌لیتر) اثر منفی روی این صفت داشت.

اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

نتایج حاصل از بکارگیری سطوح مختلف عصاره مرزنجوش در کاهش غلظت MDA در جدول ۲ نشان شده است. استفاده ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر از عصاره مرزنجوش باعث کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰٥). سایر سطوح تأثیر معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نشان ندادند. این نتایج نشان دادند که افزودن عصاره مرزنجوش باعث کاهش معنی داری غلظت MDA می‌شود که از عوامل مخرب غشای سلول اسپرم بوده و به حفظ سلامت غشاء کمک شایان توجهی می‌کند (P<۰/۰٥).

بحث

استفاده از اسپرم منجمد شده نقش بسیار مهمی در پیشرفت تکنیک‌های اصلاح نژادی، تولید آزمایشگاهی رویان (IVF)[1] و تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)[2] داشته و برای دستیابی به مزایای زیاد AI، ذخیره‌سازی منی برای بلند مدت امری ضروری است

[1] - In Vitro Fertilisation
[2] - Intra-Cytoplasmic Sperm Injection

(بیلی و همکاران ۲۰۰۰). اما فرآیند انجماد-یخ‌گشایی با تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد بویژه ROS، استرس اکسیداتیو را به همراه داشته و تمامی ترکیبات سلولی اسپرم‌ها از قبیل لیپیدها، پروتئین‌ها، قندها و اسیدهای نوکلئیک را مورد هدف قرار می‌دهد. این امر برای باروری اسپرم مضر بوده و عملکرد اسپرم‌ها را کاهش می‌دهد. (آگاروال و رائو ۲۰۰۰، چاترجی و همکاران ۲۰۰۱ و بانسال و بیلاسپوری ۲۰۱۱). مطالعات فراوان در شرایط آزمایشگاهی نشان داده‌اند که ترکیبات فنولیک می‌توانند بطور مستقیم رادیکال‌های آزاد مانند یون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و پراکسیل را پاکسازی و جاروب کنند؛ بطوریکه حتی اثر آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات بیشتر از ویتامین‌های C و E و آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک است (ریس-اوانس ۱۹۹۷). با توجه به توانایی عمل ترکیبات فنلی به عنوان یک ماده دهنده گروه هیدروکسیل و خصوصیت شلات‌کنندگی یونهای فلزی، این ترکیبات بخوبی می‌توانند رادیکال‌های آزاد را مهار کنند (اوساوا ۱۹۹٤). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که ترکیبات متعدد فنولیک موجود در گیاه مرزنجوش با یون‌های فلزی مانند آهن و مس که القا کننده فرآیند اکسیداسیون هستند، شلات شده و آنها را از دسترس عوامل اکسید کننده خارج می‌کنند (چراتو و همکاران ۲۰۰۰). در این مطالعه افزودن عصاره مرزنجوش به رقیق‌کننده، موجب بهبود پارامترهای تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در مقایسه با گروه شاهد شده و توانست اسپرم‌ها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت کند که احتمالا یکی از دلایل این بهبود می‌تواند مهار تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد بخصوص ROS توسط عصاره این گیاه باشد. یک ارتباط قوی بین تولید ROS و کاهش تحرک اسپرم وجود دارد بطوریکه مشخص شده است هیدروژن پراکسید می‌تواند در سراسر غشای اسپرم پخش شده و فعالیت برخی آنزیم‌های حیاتی مانند آنزیم گلوگز-٦ فسفات دهیدروژناز را مهار کند. این آنزیم با کنترل غلظت گلوگز از طریق منحرف کردن مسیر هگزوز مونو فسفات و کنترل فعالیت NADPH نقش اساسی در تولید ATP و تحرک اسپرم دارد (آیتکن و همکاران ۱۹۹۷). افزودن عصاره مرزنجوش به رقیق کننده، توانسته است با محافظت ساختمان غشاء اسپرم‌ها زنده-مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی آنها را نسبت به گروه شاهد بهبود به بخشد. مطالعات پیشین حاکی از آن است که ترکیبات فنولیک (بخصوص فلاونوئیدها) قادرند با پوشش دادن لیپیدها روند پراکسیداسیون لیپیدی را تغییر داده و متوقف کرده و با کاهش سیالیت غشاهای سلولی، جلوگیری از تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال و محدود کردن پراکسیداسیون فسفولیپیدها و اسیدهای چرب غیراشباع، از غشاهای سلولی محافظت کنند (آرورا و همکاران ۲۰۰۰، بلوخینا و همکاران ۲۰۰۳). سطح ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره مرزنجوش غلظت MDA را بطور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش داده است که این امر بیان کننده تأثیر مفید عصاره این گیاه برای کاهش فرآیند پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم‌ها است. در این مطالعه افزودن سطوح بالاتری از عصاره اثرات منفی روی هرکدام از پارامترها داشته که می‌تواند ناشی از تغییرات اسمزی، pH و بهم خوردن تعادل ترکیبات رقیق کننده در سطوح بالاتر عصاره باشد؛ زیرا میزان گلیسرول و زرده تخم‌مرغ که از عوامل محافظت کننده انجمادی و نگهدارنده اسپرم‌ها از شوک سرمایی در طول فرآیند انجماد محسوب می-شوند، بسیار مهم بوده و در نتیجه زنده‌مانی، تحرک و عملکردهای اسپرم را تحت تاثیر قرار می‌دهند (فاهی ۱۹۸٦). همچنین افزودن سطوح بالای عصاره، با مهار بیش از حد فعالیت آنزیم‌های دخیل در اکسیداسیون و احیاء و به هم زدن تعادل بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تولید رادیکال‌های آزاد در محیط اسپرم‌ها را به هم زده و باعث کاهش عملکردهای اسپرم می‌شوند (روکا و

همکاران ۲۰۰٤). مطالعه مشابهی وجود ندارد تا بتوان نتایج مطالعه حاضر را با نتایج آنها مقایسه کرد. مالو و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کرده‌اند که افزودن عصاره آبی گیاه رزماری تأثیر بالقوه‌ای بر پارامترهای تحرک و درصد زنده‌مانی اسپرم خوک داشته و غلظت MDA تولیدی را که از عوامل اکسیداسیونی مخرب بشمار می‌رود، بطور معنی‌داری کاهش داده است. استفاده از عصاره آبی رودیولا ساکرا در منی خوک توانست بعد از فرآیند انجماد، پارامترهای کیفی منی را در وضعیت بهتری نگهداشته و یک فعالیت قوی پاکسازی رادیکال آنیون‌سوپراکسید را از خود نشان دهد (ژائو و همکاران ۲۰۰۹). در مطالعه‌ای دیگر افزودن عصاره آبی رزماری به منی بز باعث بهبود پارامترهای کیفی منی بعد از فرآیند انجماد شد (زنگانه و همکاران ۲۰۱۳). اما به دلیل متفاوت بودن نوع گیاه، روش عصاره‌گیری، ترکیبات رقیق‌کننده و گونه حیوانی نمی‌توان نتایج حاضر را با نتایج آنها مقایسه کرد.

نتیجه گیری کلی

نتایج نشان داد که افزودن عصاره مرزنجوش به رقیق‌کننده موجب بهبود پارامترهای تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی شده و تولید MDA که از عوامل مخرب غشای پلاسمایی اسپرم‌ها است را بطور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش داد. از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از عصاره اتانولی گیاه مرزنجوش که حاوی ترکیبات پلی فنولیک متعددی است، بعنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در جهت حفاظت اسپرم‌ها از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو مفید بوده و می‌تواند جایگزین برخی آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک شود. همچنین وفور این گیاه در مناطق مختلف و روش‌های ساده عصاره‌گیری، تهیه و استفاده از این گیاه را مقرون به صرفه کرده است. با این وجود برای بررسی و ارزیابی دقیق‌تر تأثیر آنتی اکسیدانی گیاه مرزنجوش در راستای فرآوری اسپرم نیاز به تحقیقات و آزمایشات بیشتری است.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با همکاری مرکز اصلاح نژاد دام غرب و شمال غرب کشور انجام شد. نویسندگان از تمام پرسنل آن مرکز بویژه آقایان مهندس ایرج غفاری و مهندس رضا انوری کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

Agarwal S and Rao AV, 2000. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. J CMA 163(6): 739–744.

Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, and Irvine S, 1997. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. Mol Reprod Dev 47(4): 468-482.

Arora A, Nair GM and Strasburg MG, 1998. Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. Free Radic Biol Med 24(9): 1355-1363.

Arora A, Byrem TM, Nari MG, and Strasburg GM, 2000. Modulation of liposomal membranes fluidity by flavonoids and isoflavonoids. Arch Biochem Biophys 373(1): 102-109.

Bailey JL, Bilodeau JF, and Cormier N, 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. J Androl 21(1): 1-7.

Bansal AK, and Bilaspuri GS, 2011. Impacts of oxidative stress and Antioxidants one semen functions. Vet Med Int 686137: 1-7.

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. Mol Reprod Dev 55(3): 282–288.

Blokhina O, Virolainen E, and Fagerstedt KV, 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Ann Bot 91(2): 179-194.

Cervato G, Carabelli M, Gervasio S, Citterra A, Cazzola R, and Cestaro B, 2000. Antioxidant properties of oregano (Origanum Vulgare) leaf extracts. J Food Biochem 24(6): 453-465.

Chatterjee S, de Lamirande E, and Gagnon C, 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. Mol Reprod Dev 60(4): 498–506.

Fahy GM, 1986. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. Cryobiology 23(1): 1-13.

Farber JL, 1994. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. Environ Health Perspect 102 (Suppl 10): 17-24.

Gil J, Lundeheim N, Soderquist L and Rodriiuez-Martinez H, 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology 59(5-6): 1241–1255.

Javanmardia J, Stushnoff C, Locke E, and Vivanco JM, 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. Food Chemistry 83(4): 547–550.

Kikuzaki H and Nakatani N, 1989. Structure of a new antioxidative phenolic acid from origano (Origanum Vulgare L.). Agric Biol Chem 53(2): 519-524.

Kurşat M, Emre I, Yilmaz Ö, and Erecevit P, 2011. Antioxidant and antimicrobial activity in the seeds of Origanum vulgare L. subsp.gracile (C. Koch) Ietswaart and Origanum acutidens (Hand.-Mazz.) Ietswaart from Turkey. Grasas y Aceites 62(4): 410-417.

Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Lombardo F, Terminali O, Passi S, and Dondero F, 1994. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. Hum Reprod 9(11): 2044-2050.

Malo C, Gil L, Gonzalez N, Martínez F, Cano R, de Blas I, and Espinosa E, 2010. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (Rosmarinus officinalis). Cryobiology 61(1):142–147.

Malo C, Gil L, Cano R, Martínez F, and Galé I, 2011. Antioxidant effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology 75(9): 1735–1741.

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. Eds., Japan Scientific Societies Press: Tokyo, Japan. pp. 241-251.

Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, Dal-Pizzol F and Moreira JC, 2006. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. Cell Biol Int 30(10): 848-853.

Rice-Evans C, Miller N, and Paganga G, 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci 2(4): 152-159.

Roca J, Gil MA, Hernandez M, Parrilla I, Vazquez JM and Martinez EA, 2004. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze–thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. J Androl 25(3): 397–405.

Roofchaee A, Irani M, Ebrahimzadeh MA, and Akbari MR, 2011. Effect of dietary oregano (Origanum vulgare L.) essential oil on growth performance, cecal microflora and serum antioxidant activity of broiler chickens. African Journal of Biotechnolog 10(32): 6177-6183.

Sikka SC, 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front Biosci 1: e78-86.

Skoula M, Grayer RJ, Kite GC, and Veitch NC, 2008. Exudate flavones and flavanones in Origanum species and their interspecific variation. Biochem Syst Ecol 36(8): 646–654.

Velioglu YS, Mazza G, Gao L, and Oomah BD, 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. J Agric Food Chem 46: 4113–4117.

Zanghaneh Z, Zhandi M, Zareh Shahneh, Najafi A, Nabi MM, and Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2013. Does Rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Rumin Res 114(1): 120-125.

Zhao HW, Li QW, Ning GZ, Han ZS, Jiang ZL, and Duan YF, 2009. Rhodiola sacra aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen. Theriogenology 71(5): 849 –857.

Effect of *Origanum vulgare* ethanol extract on quality parameters and malondialdehyde concentration of cryopreserved Holstein bull sperm

R Farhadi[1], H Daghigh Kia[2], A Hosseinkhani[2], B Ghasemi Panahi[3], Gh Dehghan[4] and I Ashrafi[5]

Received: December 04, 2013 Accepted: March 19, 2014

[1]Graduate MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz Iran
[2]Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4]Associate Professor, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[5]PhD Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

Abstract

BACKGROUND: Various stages of processing, storage and cryopreservation of semen, reduce frozen-thawed sperm quality due to physiological and chemical stress on the sperm membrane, decreasing sperm quality. To overcome this problem, utilization of antioxidants can play an important role. **OBJECTIVES:** The purpose of this study is to investigate the effect of Origanum Vulgare extract as a natural antioxidant on microscopic and biochemical parameters of frozen-thawed Holstein bull sperms**. METHODS:** In this study, semen samples were collected from three mature Holstein bulls twice a week using artificial vagina and ejaculates were pooled in order to eliminate the individual effects of bulls. Different levels of Origanum Vulgare ethanol extract (2, 4, 8, 12, 16 and 20 ml in 100 ml of diluents solution) 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, using CASA system, Eosin-Nigrosin staining, hypo osmotic swelling test and measuring malondialdehyde concentration, respectively. **RESULTS:** The addition of 4 ml/dl of Origanum Vulgare extract improved motility, viability and plasma membrane integrity parameters of spermatozoa significantly and reduced the lipid peroxidation as well compared to the control group, following freeze-thawing process (P< 0/05). **CONCLUSIONS:** our study confirms the positive effectiveness of adding 4 mL/dL Origanum Vulgare on quality of cryopreserved bull sperm.

Keywords: Sperm, Freeze-thawing, Herbal Antioxidant