تولیدات دامی
دوره ۱۸ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۵
صفحه‌های ۳۸۵-۳۷۷

اثر عصاره برگ زیتون بر ذخیره‌سازی منی خروس

سید مونس جلالی کوهی‌خیلی[۱]، مهرداد محمدی*[۲] و محمد روستایی علی‌مهر[۲]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت – ایران
۲. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت – ایران

تاریخ وصول مقاله:۱۳۹۴/۰۵/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۱۹

چکیده

اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ زیتون بر تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی اسپرم و میزان تولید مالون دی‌آلدئید با استفاده از ۱۲ قطعه خروس نژاد راس ۳۰۸ در سن ۳۰ هفتگی بررسی شد. نمونه‌های منی در پنج نوبت از خروس‌ها با روش مالش شکمی گرفته شد. در هر نوبت پس از ارزیابی اولیه اسپرم، نمونه‌ها تجمیع و با رقیق‌کننده سکستون رقیق شدند. نمونه‌ها به پنج قسمت تقسیم و پس از افزودن مقادیر صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره برگ زیتون به هر قسمت، به مدت ۷۲ ساعت در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. صفات تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی بررسی و میزان تولید مالون دی‌آلدئید در نمونه‌ها پس از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی اندازه‌گیری شد. اضافه نمودن ۱۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون به منی میزان تولید مالون دی‌آلدئید را کاهش داد ($P<0/05$). پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در نمونه‌هایی که ۱۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون به آنها اضافه شده بود، بالاتر از گروه شاهد بود ($P<0/05$). پس از ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در نمونه‌هایی که ۲۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون به آنها اضافه شده بود، پایین‌تر از گروه شاهد بود ($P<0/05$). براساس نتایج تحقیق حاضر، جهت ذخیره‌سازی اسپرم خروس در چهار درجه سلسیوس، افزودن ۱۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون به رقیق‌کننده پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌اکسیدان، اسپرم، خروس، زیتون، مالون دی‌آلدئید

* نویسنده مسئول Email: mohammadi@guilan.ac.ir

مقدمه

تلقیح مصنوعی یکی از روش‌های مدیریتی جهت افزایش راندمان تولیدمثل در گله‌های مرغ مادر و لاین است، به‌طوری‌که از نظر اصلاح نژادی با استفاده از تلقیح مصنوعی می‌توان نتاج خروس‌های ممتاز را افزایش داد. همچنین از خروس‌های مسن که دارای ارزش ژنتیکی بالایی هستند، استفاده کرد. تا زمانی‌که شرایط نگهداری درازمدت اسپرم فراهم نشود، تلقیح مصنوعی ماکیان باید در فاصله ۳۰ دقیقه پس از اسپرم‌گیری، انجام شود [۱].

یکی از روش‌های نگهداری اسپرم پرندگان در شرایط آزمایشگاهی، نگهداری منی به صورت مایع است. در روند ذخیره‌سازی منی تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون چربی‌ها امری اجتناب‌ناپذیر است. افزایش میزان رادیکال‌های آزاد علاوه بر پراکسیداسیون چربی‌های غشای اسپرم سبب اختلال در واکنش آکروزومی، تخریب کروماتین اسپرم، کاهش تحرک و کاهش باروری می‌شود [۴].

اسپرم در خلال فرآیند اسپرم‌سازی، مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهد و از آنجا که بیشتر آنزیم‌ها در سیتوپلاسم سلول است، بنابراین اسپرم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اندکی دارد. از طرف دیگر، غلظت عوامل آنتی‌اکسیدانی مایع منی در هنگام عمل‌آوری و رقیق کردن منی کاهش می‌یابد. لذا، هنگام ذخیره‌سازی سلول‌های جنسی نر، افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به منی یک راهکار عملی جهت حفظ کیفیت و افزایش باروری اسپرم محسوب می‌شود [۶ و ۹].

محصولات مختلف درخت زیتون شامل روغن، میوه و برگ آن دارای مواد با فعالیت آنتی‌اکسیدان بسیار بالا هستند و از آسیب‌های اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند [۱۲]. تاکنون اثر مقادیر مختلف عصاره برگ زیتون بر ویژگی‌های اسپرم خروس طی ذخیره‌سازی به صورت مایع مورد بررسی قرار نگرفته است. هدف از انجام پژوهش حاضر، تعیین بهترین غلظت عصاره برگ زیتون جهت ذخیره‌سازی اسپرم خروس در دمای چهار درجه سلسیوس است.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در واحد دامپروری دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. تعداد ۱۲ خروس سالم در سن ۳۰ هفتگی از شرکت نوید جوجه انتخاب شدند. به مدت ۱۲-۱۰ روز دوره عادت‌پذیری خروس‌ها جهت اخذ نمونه اسپرم انجام شد. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی به ابعاد ۷۵× ۵۰× ۶۰ سانتی‌متر نگهداری شدند و به صورت آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند. جیره غذایی براساس احتیاجات مواد مغذی توصیه شده در دفترچه راهنمای شرکت راس تنظیم شد. دمای سالن در محدوده ۲۲-۱۸ درجه سلسیوس حفظ شد و برنامه نوردهی ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی بود.

عصاره اتانولی برگ زیتون از شرکت دانا کاسیان استان لرستان خریداری شد. ترکیبات این عصاره با روش HPLC اندازه‌گیری شد که اصلی‌ترین ترکیبات آن آلئوروپین ۳۵۶، تیروزول ۳/۷۳، هیدروکسی تیروزول ۴/۸۹ و اسید کافئیک ۴۹/۴۱ میلی‌گرم در گرم بود. برای تهیه محلول پایه عصاره برگ زیتون ابتدا ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره برگ زیتون در یک میلی‌لیتر الکل مطلق حل و جهت استریل کردن از صافی ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول پایه به وسیله بافر سکستون به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد تا محلول کار با غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره برگ زیتون تهیه شود.

نمونه‌های منی در پنج نوبت با فاصله دو روز از طریق مالش شکم با استفاده از لوله جمع آوری منی (هم‌دما با دمای داخلی بدن خروس) جمع‌آوری شدند [۲]. نمونه‌ها بعد از جمع‌آوری به‌وسیله رقیق‌کننده سکستون (سیترات پتاسیم مونوهیدرات ۰/۶۴ گرم، ال-گلوتامات سدیم ۸/۰۷ گرم، کلرید منیزیم ۰/۳۴ گرم، فروکتوز ۵ گرم، فسفات دی‌پتاسیم تری هیدرات ۱۲/۷ گرم، فسفات مونوپتاسیم ۰/۶۵ گرم، تریس متیل ۲-آمینواتان سولفونیک اسید ۳/۹۵ گرم، استات سدیم ۴/۳ گرم در یک لیتر آب مقطر و ۷/۴

pH =) به نسبت یک به دو رقیق و بلافاصله به‌وسیله ظرف عایق حرارتی حاوی آب با دمای ۳۹ درجه سلسیوس، به دور از هر گونه نور و ضربه به آزمایشگاه منتقل شدند [۲]. تحرک پیش‌رونده اسپرم و غلظت اسپرم با توجه به رقیق-سازی اولیه در هر نمونه تعیین شد. نمونه‌هایی که تحرک کمتر از ۷۰ درصد و غلظت کمتر از ۳×۱۰^{۹} اسپرم در میلی‌لیتر داشتند، از آزمایش حذف شدند. به منظور یکنواختی در بررسی صفات در هر نوبت نمونه‌گیری (تکرار)، بعد از جمع‌آوری نمونه و پیش از شروع آزمایش انزال‌ها تجمیع شده و به‌وسیله رقیق‌کننده سکستون تا غلظت ۴×۱۰^{۹} اسپرم در میلی‌لیتر رقیق شدند. سپس نمونه به پنج بخش مساوی تقسیم شد. به هر بخش رقیق‌کننده سکستون حاوی صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره برگ زیتون به صورت حجم به حجم یک: یک اضافه شد. غلظت نهایی اسپرم به ۲×۱۰^{۹} در میلی‌لیتر و عصاره برگ زیتون به صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رسید.

بعد از رقیق‌سازی، تیمارها برای خنک شدن به دستگاه تست چمبر منتقل شدند. این دستگاه با نرخ سردسازی ۰/۲۵ درجه در دقیقه، دما را از ۳۹ به چهار درجه سلسیوس رسانده و نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در آن ذخیره شدند. سلامت غشای پلاسمایی، تحرک، زنده‌مانی اسپرم در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ذخیره‌سازی بررسی شد. بعد از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی، ۱۵۰ میکرولیتر از هر تیمار برای اندازه‌گیری غلظت مالون - دی‌آلدئید استفاده شد.

نمونه‌های منی به نسبت یک به ۲۰۰ با آب رقیق شد و تعیین غلظت اسپرم با کمک لام شمارش سلولی و میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰× انجام شد. به منظور بررسی تحرک پیشرونده اسپرم، پنج میکرولیتر از نمونه رقیق شده روی یک لام قرار داده شده و با گذاشتن یک لامل روی آن، تحرک اسپرم با کمک میکروسکوپ فاز متضاد مجهز به صفحه گرم با بزرگنمایی ۴۰۰× بررسی شد. تحرک اسپرم در هر نمونه حداقل پنج میدان دید میکروسکوپی با اختلاف ۱۰ درصد تخمین زده شد و در انتها میانگین حاصل از این تخمین‌ها به عنوان درصد تحرک پیش‌رونده ثبت شد [۲].

ارزیابی زنده‌مانی اسپرم با استفاده از رنگ هوخست بیس بنزامید H33258 انجام شد [۱۴]. به‌طور خلاصه، بعد از اینکه نمونه‌ها به غلظت ۳۰×۱۰^{۶} اسپرم در میلی‌لیتر رسانده شد، ۱۰ میکرولیتر از این نمونه‌ها با ۱۰ میکرولیتر از محلول رنگ هوخست بیس‌بنزامید (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از هوخست بیس بنزامید H33258 در بافر ۰/۱۵۴ مول سدیم کلرید و ۰/۰۱۵ مول تری سدیم سیترات ۷ = pH) مخلوط شد و پس از گذشت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق پنج میکرولیتر از نمونه روی لام قرار داده شد. با گذاشتن لامل روی آن، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر مناسب با بزرگنمایی ۴۰۰×، ۲۰۰ عدد اسپرم در شرایط نور بسیار کم بررسی و اسپرم‌های آبی رنگ به عنوان پاسخ منفی (مرده) و اسپرم‌های بدون رنگ به عنوان پاسخ مثبت (زنده) درنظر گرفته شدند.

برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم پنج میکرولیتر از نمونه اسپرم با ۵۰ میکرولیتر از محلول هایپواسموتیک (یک گرم سیترات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH = ۷) مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه آون با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت [۲]. سپس با استفاده از میکروسکوپ فاز متضاد با بزرگنمایی ۴۰۰×، حداقل در ۵ میدان دید ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی شد. اسپرم‌های دارای دم متورم به عنوان پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌های با دم بدون تورم به عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی ناسالم) درنظر گرفته شدند.

غلظت مالون دی‌آلدهید (میکرومول در میلی‌لیتر) در ۱۵۰ میکرولیتر از تیمارها که حاوی ۳۰۰×۱۰^{۶} اسپرم بود، اندازه گیری شد [۲]. این روش بر پایه واکنش یک مولکول

مالون دی‌آلدهید با دو مولکول اسید تیوباربیتوریک و تولید مولکولی صورتی رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد.

داده‌های مربوط به غلظت مالون‌دی‌آلدهید با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۱۰/۱) و رویه مدل خطی عمومی برای مدل ۱ و داده‌های تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی به صورت داده‌های تکرار شده در زمان با استفاده نرم‌افزار SAS و رویه Mixed برای مدل ۲ تجزیه و میانگین‌ها به کمک آزمون توکی مقایسه شدند. نتایج داده‌های تکرار شده در زمان به صورت LSmeans ± SE ارائه و سطوح معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

$$y_{ij} = \mu + o_i + e_{ij} \quad (1)$$

در این رابطه، y_{ij} مشاهدات مربوط به غلظت مالون - دی‌آلدئید، μ میانگین غلظت مالون دی‌آلدئید، o_i اثر سطوح مختلف عصاره برگ زیتون و e_{ij} اثر تصادفی باقیمانده است.

$$y_{ijk} = \mu + o_i + t_i + (o \times t)^{ij} + e_{ijk} \quad (2)$$

در این رابطه، y_{ijk} مشاهدات مربوط به تحرک، زنده‌مانی و یا سلامت غشای پلاسمایی، μ میانگین تحرک، زنده‌مانی و یا سلامت غشای پلاسمایی، o_i اثر سطوح مختلف عصاره برگ زیتون، t_i اثر زمان و e_{ijk} اثر تصادفی باقیمانده است.

نتایج و بحث

اثر عصاره برگ زیتون بر میزان غلظت مالون دی‌آلدئید پس از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی منی در جدول ۱ ارائه شده است (P<۰/۰۵). غلظت مالون دی‌آلدئید در نمونه منی حاوی ۱۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون کمتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵)، ولی در نمونه‌هایی که ۲۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون به آنها اضافه شده بود، غلظت مالون دی‌آلدئید نسبت به گروه شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵).

جدول ۱. اثر عصاره برگ زیتون بر میزان تولید مالون دی‌آلدئید در منی بعد از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی (اشتباه معیار ±میانگین)

عصاره برگ زیتون (میکروگرم در میلی‌لیتر)	مالون دی‌آلدئید (میکرومول)
۰	۰/۹۴^{b} ± ۰/۰۴۱
۵۰	۰/۷۶^{bc} ± ۰/۰۶۷
۱۰۰	۰/۵۰^{c} ± ۰/۰۵۲
۱۵۰	۰/۷۹^{b} ± ۰/۰۹۴
۲۰۰	۱/۶۹^{a} ± ۰/۱۵۲

a-c- تفاوت میانگین‌ها با حروف غیرمشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

در شرایط آزمایشگاه با افزایش مدت نگهداری اسپرم، غلظت مالون دی‌آلدهید به صورت خطی افزایش می‌یابد [۶]. با افزایش میزان خمیر گوجه‌فرنگی [۲۱] و لیکوپن آن [۱۸] در جیره خروس میزان مالون دی‌آلدئید در منی خروس کاهش پیدا کرد. عصاره برگ زیتون باعث کاهش معنی‌داری در غلظت مالون دی‌آلدهید در سرم و کلیه موش [۲۴] و همچنین باعث پاک‌سازی آنیون‌های سوپراکسیدی، رادیکال‌های هیدروکسیل در سلول‌های نوتروفیل انسان شد

[۲۵]. آلئوروپین و هیدروکسی تیروزول موجود در عصاره برگ زیتون (حاوی ۱۹ درصد آلئوروپین، ۱/۸ درصد گلیکوسیدهای فلاوونوئید و استرهای ۳ و ۴ دی هیدروکسی فنتیل) بیشترین توانایی آنتی اکسیدانی را نسبت به ویتامین E یا بوتیل هیدروکسی تولوئون (BHT) در مدل سیستم شیمیایی دارند [۱۵]. هیدروکسی تیروزول می‌تواند رادیکال‌های پروکسیل آبی حاضر در سطح غشاء را پاکسازی کند، درحالی‌که عمل آلئوروپین پاکسازی رادیکال‌های پروکسیل چربی با زنجیره منتشره از درون غشاء است [۱۵].

اثر سطوح مختلف عصاره برگ زیتون بر تحرک پیش‌رونده اسپرم در زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی معنی‌دار بود (جدول ۲) (P<۰/۰۵). پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان ذخیره‌سازی در تیمارهای ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم عصاره و پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت در تیمار ۱۰۰ میکروگرم عصاره، تحرک اسپرم نسبت به گروه شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵). در تمام ساعات ذخیره‌سازی، کمترین تحرک اسپرم در تیمار ۲۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون مشاهد شده (P<۰/۰۵).

جدول ۲. اثر سطوح مختلف عصاره برگ زیتون بر درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم در زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی (اشتباه معیار ±میانگین حداقل مربعات)

عصاره برگ زیتون (میکروگرم در میلی‌لیتر)	زمان ذخیره‌سازی (ساعت)			
	۰	۲۴	۴۸	۷۲
۰	۸۰ ± ۲/۰۹	۷۰^{b} ± ۲/۰۹	۶۲^{b} ± ۲/۰۹	۴۴^{b} ± ۲/۰۹
۵۰	۸۰ ± ۲/۰۹	۷۶^{a} ± ۲/۰۹	۶۰^{b} ± ۲/۰۹	۴۲^{b} ± ۲/۰۹
۱۰۰	۸۰ ± ۲/۰۹	۸۰^{a} ± ۲/۰۹	۶۸^{a} ± ۲/۰۹	۵۲ ^{a}± ۲/۰۹
۱۵۰	۸۰ ± ۲/۰۹	۷۶^{a} ± ۲/۰۹	۶۲^{b} ± ۲/۰۹	۴۴^{b} ± ۲/۰۹
۲۰۰	۸۰ ± ۲/۰۹	۶۲^{c} ± ۲/۰۹	۵۴^{c} ± ۲/۰۹	۳۸^{c} ± ۲/۰۹

a-c – تفاوت ارقام با حروف غیرمشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

اثر سطوح مختلف عصاره برگ زیتون بر زنده‌مانی اسپرم، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ذخیره‌سازی معنی‌دار بود (جدول ۳) (P<۰/۰۵). پس از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی در تیمارهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم عصاره و پس از گذشت ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی در تیمار ۱۰۰ میکروگرم عصاره، زنده‌مانی اسپرم نسبت به گروه شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵). پس از ۷۲ ساعت از زمان ذخیره‌سازی، تیمار ۲۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون باعث کاهش درصد زنده‌مانی اسپرم خروس شد (P<۰/۰۵).

جدول ۳. اثر سطوح مختلف عصاره برگ زیتون بر درصد زنده‌مانی اسپرم در زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی (اشتباه معیار ±میانگین حداقل مربعات)

عصاره برگ زیتون (میکروگرم در میلی‌لیتر)	زمان ذخیره‌سازی (ساعت)			
	۰	۲۴	۴۸	۷۲
۰	۹۰/۶ ± ۱/۴۱	۸۲/۶^{ab} ± ۱/۴۱	۱/۴۱ ^{c} ±۷۲/۴	۱/۴۱ ^{b} ±۶۵/۸
۵۰	۹۰/۰ ± ۱/۴۱	۸۱/۸^{ab} ± ۱/۴۱	۱/۴۱ ^{bc} ±۷۳/۴	۱/۴۱ ^{b} ±۵۸/۴
۱۰۰	۹۰/۲ ± ۱/۴۱	۸۳/۰^{a} ± ۱/۴۱	۱/۴۱ ^{a} ±۷۸/۰	۱/۴۱ ^{a} ±۷۳/۰
۱۵۰	۸۹/۰ ± ۱/۴۱	۸۲/۸^{a} ± ۱/۴۱	۱/۴۱ ^{a} ±۷۶/۸	۱/۴۱ ^{b} ±۶۴/۰
۲۰۰	۸۸/۸ ± ۱/۴۱	۷۸/۸^{b} ± ۱/۴۱	۱/۴۱ ^{bc} ±۷۳/۴	۱/۴۱ ^{c} ±۵۴/۸

a-c – تفاوت میانگین‌ها با حروف غیرمشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

اثر سطوح مختلف عصاره برگ زیتون بر سلامت غشای پلاسمایی اسپرم، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ذخیره-سازی معنی‌دار بود (جدول ۴) (P<۰/۰۵). پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت از زمان ذخیره‌سازی، تیمار ۱۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون بر سلامت غشای پلاسمایی بیشتری نسبت به گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵). پس از ۷۲ ساعت ذخیره-سازی، تیمار ۲۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون، باعث کاهش سلامت غشای پلاسمایی اسپرم شد (P<۰/۰۵).

جدول ۴. اثر سطوح مختلف عصاره برگ‌زیتون بر درصد سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی (اشتباه معیار ±میانگین حداقل مربعات)

عصاره برگ زیتون (میکروگرم در میلی‌لیتر)	زمان ذخیره‌سازی (ساعت)			
	۰	۲۴	۴۸	۷۲
۰	۸۸/۸± ۱/۷۴	۸۰/۴ ^{ab}±۱/۷۴	۷۰/۸^{b}±۱/۷۴	۶۳/۲^{b}±۱/۷۴
۵۰	۸۹/۲± ۱/۷۴	۸۰/۲^{ab}±۱/۷۴	۷۲/۴^{ab}±۱/۷۴	۶۱/۸^{b}±۱/۷۴
۱۰۰	۹۰/۰± ۱/۷۴	۸۲/۰^{a}±۱/۷۴	۷۶/۶^{a}±۱/۷۴	۷۰/۸^{a}±۱/۷۴
۱۵۰	۸۷/۲ ± ۱/۷۴	۸۰/۸^{ab}±۱/۷۴	۷۳/۰^{ab}±۱/۷۴	۶۱/۲^{b}±۱/۷۴
۲۰۰	۸۷/۲± ۱/۷۴	۷۶/۶^{b}±۱/۷۴	۷۰/۸^{b}±۱/۷۴	۵۴/۴^{c}±۱/۷۴

a-c – تفاوت میانگین‌ها با حروف غیرمشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

در تحقیق حاضر، در طول ذخیره‌سازی، درصد سلامت غشای پلاسمایی، تحرک پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم‌ها کاهش یافت که با گزارش‌های دیگر در مورد اسپرم خروس [۵] و بوقلمون [۱۰] هم خوانی دارد. همچنین، افزودن میزان ۱۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون به منی خروس سبب بهبود ماندگاری اسپرم در شرایط ذخیره‌سازی به صورت مایع شد. عصاره برگ زیتون سبب افزایش زنده‌مانی و کامل شدن فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در سلول‌های بتای پانکراس در شرایط آزمایشگاه شده است [۸]. آلئوروپین نیز باعث افزایش عمر فیبروبلاست-های رویانی در انسان می‌شود [۱۳]. اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه که در ساختمان فسفولیپیدها میکروزم کبد موش صحرایی شرکت کرده‌اند، در طی پراکسیداسیون، به واسطه هیدروکسی تیروزول و آلئوروپین محافظت شده‌اند [۱۱].

در مدت نگهداری اسپرم در شرایط آزمایشگاهی، ترکیباتی نظیر رادیکال‌های آزاد سوپراکسید و هیدروکسیل و ترکیبات غیررادیکالی نظیر پراکسید هیدروژن و اسید هیپوکلریک توسط اسپرم‌های مرده، گلبول‌های سفید و اکسیژن موجود در محیط تولید می‌شوند که واکنش‌های پراکسیداسیونی را به دنبال خواهد داشت. این واکنش‌ها باعث تخریب اندامک‌های درون سلولی اسپرم و همچنین تخریب ساختمان لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA اسپرم می-شوند که مرگ اسپرم را به دنبال خواهد داشت [۷]. از طرف دیگر، همبستگی معکوسی بین پراکسیداسیون لیپید و تحرک اسپرماتوزوا، زنده‌مانی و شایستگی آنها برای لقاح اسپرم و اووسیت مشاهده شده است [۷]. برگ زیتون حاوی ترکیبات فنلی، ترپنی و ترکیبات محلول در چربی، کربوهیدرات‌ها، پروتئین و مواد معدنی است. برگ زیتون بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی و قدرت گیرندگی رادیکال-های آزاد را در بین بخش‌های مختلف درخت زیتون دارد [۱۲]. پلی‌فنل‌ها ترکیبات آنتی‌اکسیدان هستند و قادرند رادیکال‌های آزاد را جذب نمایند [۱۹]. افزودن روغن زیتون به منی خروس میزان تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی را پس از ۷۲ ساعت ذخیره سازی در دمای چهار درجه سلسیوس افزایش داد [۳].

افزودن ترکیبات گیاهی غنی از کوئرسیتن همانند عصاره علف چشمه به منی سبب بهبود ماندگاری اسپرم خروس می‌شود [۲]. نتایج تحقیق حاضر با نتایج مطالعه‌ای که از سوپراکسید دسموتاز و ان-استیل ال-سیستئین به عنوان آنتی‌اکسیدان در نگهداری اسپرم خروس استفاده کردند، مطابقت داشت، به طوری که استفاده از آنها باعث بهبود تحرک اسپرم شد [۱۷]. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های دیگر نظیر ویتامین E، Tempo (۴-هیدروکسی ۲،۲،۶،۶- تترا متیل پیپرادین-۱-اکسیل) و BHT از یکپارچگی غشای اسپرم بوقلمون در طی ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی در شرایط آزمایشگاهی محافظت کردند، زیرا این ترکیبات آنتی-اکسیدان‌های محلول در چربی هستند و می‌توانند در غشای پلاسمایی نفوذ کرده و خسارت‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد را سرکوب کنند [۹]. تحرک اسپرم بوقلمون بعد از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی در حضور غلظت بهینه ویتامین E، BHT و یا Tempo حفظ شد، به‌طوری‌که در تیمارهای با آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی، شاخص تحرک اسپرم بعد از ۴۸ ساعت بسیار بالا و در حدود ۸۴ درصد بود [۹].

هنگامی‌که منی خروس برای ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاهی با ویتامین E مکمل شده بود، تفاوتی در تحرک بین گروه شاهد و دیگر تیمارها مشاهده نشد [۲۳]. افزودن سلنیوم به جیره باعث افزایش درصد اسپرم‌های سالم و کاهش ناهنجاری‌های قطعه میانی اسپرم شد که افزایش تحرک را به دنبال داشت [۲۳]. لذا به نظر می‌رسد مقدار ۱۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون می‌تواند به‌عنوان یک افزودنی مناسب برای رقیق‌کننده منی خروس در روند

ذخیره سازی اسپرم در دمای چهار درجه سلسیوس سبب کاهش پراکسیداسیون چربی شود.

اگرچه افزودن ۱۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون به منی خروس باعث بهبود ماندگاری اسپرم می‌شود، ولی میزان بالای عصاره برگ زیتون (۲۰۰ میکروگرم) نه تنها باعث افزایش پراکسیداسیون چربی، بلکه سبب افت کیفیت اسپرم در دوره ذخیره‌سازی نیز می‌شود. عملکرد بهینه آنتی‌آکسیدان‌ها در غلظت‌های معینی به وقوع می‌پیوندد، به‌طوری‌که با افزایش غلظت، عملکرد آن‌ها معکوس شده و سبب القای اکسیداسیون می‌شوند [۲۰]. این امر در مورد سایر آنتی‌اکسیدان‌ها با منشاء گیاهی نظیر عصاره علف چشمه نیز به اثبات رسیده است [۲]. به‌علاوه، برگ زیتون دارای متابولیت‌های ثانویه‌ای نظیر تانن و ساپونین است [۱۲]. افزایش تانن و ساپونین با اثر بر استرول غشای پلاسمایی باعث کشته شدن اسپرم می‌شود [۱۶ و ۲۲]. لذا، افزایش غلظت MDA و کاهش تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم در تیمار ۲۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون، می‌تواند به دلیل غلظت بالای آنتی‌اکسیدان‌های موجود در این تیمار باشد.

براساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، می‌توان چنین نتیجه گرفت که غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره برگ زیتون منجر به حفظ بهتر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم و نیز سبب کاهش میزان تولید مالون دی‌آلدئید پس از ذخیره‌سازی شد. بنابراین، جهت ذخیره‌سازی اسپرم خروس در دمای چهار درجه سلسیوس، افزودن ۱۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون به یک میلی‌لیتر رقیق‌کننده توصیه می‌شود.

منابع

۱. ضمیری م ج (۱۳۸۰) تولیدمثل در پرندگان اهلی (ترجمه). انتشارات دانشگاه شیراز. ۲۴۴ ص.

۲. روستایی علی‌مهر م و آدیشی ب (۱۳۹۴) اثر عصاره علف چشمه بر ذخیره‌سازی منی خروس در دمای ۴ درجه سلسیوس. تحقیقات تولیدات دامی. ۴(۱): ۱۵-۲۴.

3. Al–Daraji HJ (2012) Adding olive oil to rooster semen diluents for improving semen quality and storage ability during liquid storage. Baltic Journal of Comparative and Clinical Systems Biology. 2: 3-11.

4. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V and Davies-Morel MCG (2000) The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. Journal of Andrology. 21: 895-902.

5. Blesbois E, Grasseau I and Hermier D (1999) Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2-50C. Theriogenology. 52: 325-334.

6. Breque C, Surai P and Brillard JP (2003) Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. Molecular Reproduction and Development. 66: 314-323.

7. Bucak MN, Sariozkan S, Tuncer PB, Ulutas PK and Akcadage HI (2009) Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. Small Ruminant Research. 81: 90-95.

8. Cumaoglu A, Rackova L, Stefek M, Kartal M, Maechler P and Karasu C (2011) Effects of olive leaf polyphenols against H2O2 toxicity in insulin secreting β-cells. Acta Biochemistry Polonica. 58: 45-50.

9. Donoghue AM and Donoghue ADJ (1997) Effect of water and lipid soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity and motility during liquid storage. Poultry Science. 76: 1440-1445.

10. Douard V, Hermier D and Blesbois E (2000) Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. Biology of Reproduction. 63: 1450-1456.

11. Gutierrez VR, Puerta DL and Catala A (2001) The effect of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein on the non-enzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes. Molecular and Cellular Biochemistry. 217: 35-41.

12. Jemai H, Fki I, Bouaziz M, Bouallagui Z, El Feki A, Isoda H and Sayadi S (2008) Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 2630-2636.

13. Katsiki M, Chondrogianni N, Chinou I, Rivett AJ and Gonos ES (2007) The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. Rejuvenation Research. 10: 157-172.

14. Leeuw AM, Daas GHJ and Woelders H (1991) The fix vital stain method simultaneous determination of viability and acrosomal and status of bovine spermatozoa. Journal of Andrology. 12: 112-118.

15. Le Tutour B and Guedon D (1992) Antioxidative activities of Olea europaea leaves and related phenolic compounds. Phytochemistry. 31(4): 1173-1178.

16. Lohiya NK, Kothari LK, Manivannan B, Mishra PK and Pathak N (2000) Human sperm immobilization effect of Carica papaya seed extracts: an in vitro study. Asian Journal of Andrology. 2: 103-109.

17. Partyka A, Nizanski W, Bajzert J, Lukaszewicz E and Ochota M (2013) The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. Cryobiology. 67: 132-136.

18. Saemi F, Zamiri MJ, Akhlaghi A, Niakousari M, Dadpasand M and Ommati MM (2012) Dietary inclusion of dried tomato pomace improves the seminal characteristics in Iranian native roosters. Poultry Science. 91: 2310-2315.

19. Salta FN, Mylona A, Chiou A, Boskou G and Andrikopoulos NK (2007) Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. Food Science and Technology International. 13(6): 413-421.

20. Sanocka D and Kurpisz M (2004) Reactive oxygen species and sperm cells. Reproductive Biology and Endocrinology. 2: 1-7.

21. Selcuk M, Selcuk Z, Kahraman Z, Ciftci G and Akal E (2013) Effects of dried tomato pulp used as a feed ingredient in breeder roosters' diets on blood and semen antioxidant status and on some sperm parameters. Revue de Medecine Veterinaire. 164: 435-442.

22. Souad K, Saad A, Mounir A and Mounir TM (2007) Spermicidal activity of extract from Cestrum parqui. Contraception. 75: 152-156.

23. Surai PF, Kostjuk IA, Wishart GJ, Macpherson A and Speake BK (1998) Effect of vitamin E and selenium of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes and liver. Biological Trace Element Research. 64: 119-132.

24. Tavafi M, Ahmadvand H and Toolabi P (2012) Inhibitory effect of olive leaf extract on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Iranian Journal of Kidney Diseases. 6(1): 25-32.

25. Visioli F, Bellomo G and Galli C (1998) Free radical scavenging properties of olive oil polyphenols. Biochemical and Biophysical Research Communications. 247: 60-64.