تولیدات دامی
دوره ۱۹ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۶
صفحه‌های ۲۴۴-۲۳۳

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

شهین مظاهری[۱]، علی کیانی[۲*]، آرش خردمند[۳]، مسعود علیرضایی[۴]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه لرستان، خرم آباد- ایران.
۲. دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه لرستان، خرم آباد- ایران.
۳. دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه لرستان، خرم آباد- ایران.
۴. دانشیار گروه علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد- ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۰۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۰۵

چکیده

در این تحقیق اثر آنتی اکسیدانی عصاره برگ زیتون در مقایسه با ویتامین‌های C و E در اسپرم سرد شده گاو در طی مدت ۴۸ساعت نگهداری در شرایط دمایی پنج درجه سانتیگراد مقایسه شد. اسپرم از قسمت دم اپیدیدیم بیضه ۱۰رأس گاو نر نژاد هولشتاین دورگ با میانگین سنی سه تا پنج سال جمع‌آوری و با افزودن رقیق‌کننده تخم‌مرغ و سیترات سدیم حاوی عصاره برگ زیتون (در سه غلظت نیم، یک و دو میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و ویتامین‌های E و C (هرکدام با غلظت دو میلی‌گرم در میلی‌لیتر) رقیق شدند. افزودن عصاره برگ زیتون به رقیق‌کننده، تحرک اسپرم را کاهش داد (P<۰/۰۵). سلامت غشا اسپرم گاو استفاده از ویتامین E بالاتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵). میزان پراکسیداسیون چربی‌ها در تیمار حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر عصاره برگ زیتون کمتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵). نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن عصاره برگ زیتون به رقیق‌کننده اسپرم در طی مدت ۴۸ ساعت نگهداری در شرایط دمایی پنج درجه سانتیگراد علیرغم کاهش میزان اکسیداسیون لیپیدی موجب کاهش تحرک اسپرم گاو می‌شود و بنابراین ترکیب مناسبی برای استفاده در رقیق‌کننده‌های اسپرم گاو نمی‌باشد.

کلیدواژه‌ها: اسید تیوباربیتوریک، اولئوروپئین، اسپرم، پراکسیداسیون ، گاو

*نویسنده مسئول Email: kiani.a@lu.ac.ir

مقدمه

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

رادیکال‌های آزاد مولکول‌هایی هستند که آخرین لایه الکترونی آنها تکمیل نبوده و به همین دلیل به لحاظ شیمیایی فعال‌تر از دیگر مولکول‌ها می‌باشند. این رادیکال-ها سبب پراکسیداسیون چربی، آسیب به DNA و پروتئین-های اسپرم شده و در نهایت منجر به مرگ سلول اسپرم می‌شوند. مکانیسم آسیبی القاء شده به وسیله رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر غشای اسپرم‌ها، پراکسیداسیون چربی‌ها نام دارد که با استرس اکسیداتیو در اثر عواملی مانند نگهداری در سرما ایجاد می‌شود. پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم باعث آسیب‌دیدگی غشای سلول اسپرم و متعاقب آن کاهش تحرک، زنده مانی، اختلال در سیگنال‌های خارج و داخل سلولی، افزایش ناهنجاری مورفولوژیکی اسپرم، آسیب‌دیدگی DNA و کاهش موفقیت فرایند لقاح و معیوب شدن عملکردهای سلولی می‌شود [۵]. بنابراین در نگهداری اسپرم حتی در دماهای پائین، استفاده از آنتی‌اکسیدان ها ضروری است.

برگ درخت زیتون حاوی غلظت بالایی از آنتی‌اکسیدان ها از جمله اولئوروپئین می‌باشد که یک ترکیب فنلی است [۱۳و۱۰]. عصاره برگ زیتون شامل مواد قندی، مواد رزینی، موم، کلروفیل، تانن، ساپونین‌ها، اسید گالیک، مانیت و سه نوع الکل به نام های اولئاس ترول، اولئاس ترانول و همواولئاس ترانول می‌باشد. ترکیباتی نظیر اولئوروپئین، هیدروکسی تیروزول و اولروپئوزید می‌توانند ترکیبات رادیکال‌های آزاد را جمع کنند و از اکسیداسیون شیمیایی LDL جلوگیری کنند [۱۷]. میزان ترکیبات فنلی عصاره برگ زیتون برابر با ۰/۳۳±۱۹۶/۶۰میلی گرم در هر گرم از عصاره براساس میزان اسید گالیک بعنوان استاندارد می‌باشد [۱۶]. ترکیبات فنلی عصاره برگ زیتون شامل اولئوروپئین (۳۵۶ میلی گرم در گرم)، تیروزول (۳/۷۳ میلی گرم در گرم)، هیدروکسی تیروزول (۴/۸۹ میلی گرم در گرم) و کافئیک اسید (۴۹/۴۱ میلی گرم در گرم) می‌باشد [۶]. اولئوروپئین مهمترین ترکیب فنلی برگ زیتون است. مشخص شده که میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ زیتون تقریباً دو برابر چای سبز و چهار برابر بیشتر از ویتامینC است [۱۲].

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

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

مواد و روش‌ها

عصاره الکلی برگ زیتون از برگ‌های درخت زیتون (واریته *Oleaeuropaea Sevillano*) شهرستان خرم آباد تهیه شد. عصاره‌گیری در مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی (لرستان، ایران) انجام گرفت. نمونه‌های اسپرم از بیضه‌های ۱۰ رأس گاو نژاد هولشتاین دورگ با میانگین سنی سه تا پنج سال و در پنج هفته پیاپی (هر هفته دو نمونه بیضه) از کشتارگاه صنعتی گلشن شهرستان خرم آباد تهیه شدند. بیضه‌ها در سریعترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شده و سپس تا زمان آماده‌سازی نمونه‌ها در بن ماری نگهداری می‌شدند. سپس دم اپی دیدیم با قیچی بریده شده و پس از جداسازی چربی و بافت‌های اضافه آن، در داخل دو سی سی سرم فیزیولوژی گرم خرد شده و جهت آزاد سازی بیشتر اسپرم‌ها از قطعات خرد شده دم اپی‌دیدیم، نمونه‌ها بمدت ۱۵ دقیقه در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بدنبال آن نمونه‌های اسپرم بداخل محیط رقیق‌کننده حاوی زرده تخم مرغ – سیترات ۲/۹ درصد (به نسبت یک به دو) منتقل شدند. زرده تخم مرغ (Cat No:K93438984)، سیترات سدیم (Cat No:A686099327) و اسید آسکوربیک از شرکت مرک آلمان و ویتامین E از شرکت داروسازی اسوه (تهران، ایران) تهیه شدند.

شش تیمار آزمایشی عبارت بودند از رقیق‌کننده بدون افزودن آنتی‌اکسیدان (شاهد) رقیق‌کننده حاوی دو میلی‌گرم در میلی‌لیتر ویتامین C، رقیق‌کننده حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین E و رقیق‌کننده حاوی ۰/۵ یک و دو میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره برگ زیتون بودند. عصاره مورد استفاده به صورت پودر فریز شده بوده که پس از اندازه‌گیری براحتی در داخل سالین نرمال حل شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر اسپرم به هریک از رقیق‌کننده‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها در دمای پنج درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگه‌داری شدند. درصد تحرک اسپرم، سلامت غشاء و غلظت مواد واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک اسید بعنوان شاخصی برای میزان پراکسیداسیون غشایی در ساعات صفر، شش، ۲۴ و ۴۸ اندازه‌گیری شدند.

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

جهت ارزیابی سلامت غشای اسپرم از آزمون HOS (تورم در محیط پر فشار) استفاده شد. به این منظور مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسپرم به ۰/۴ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت پنج دقیقه داخل انکوباتور با دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس درصد اسپرم‌های دارای دم خمیده (به عنوان غشای سالم) با استفاده از میکروسکوپ نوری و بزرگ نمایی۴۰ محاسبه شدند. اسپرم‌های دارای دم خمیده، تحت عنوان HOS مثبت در نظر گرفته شدند [۲۰].

برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از روش اندازه گیری اسید تیوباربیتوریک استفاده شد [۲۲]. در این روش ۸۰ میکرولیتر از محلول بالایی نمونه‌ها (پلاسمای اسپرم) با ۲۰ سی‌سی آب دوبار تقطیر و۲۰ سی‌سی سرم

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

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

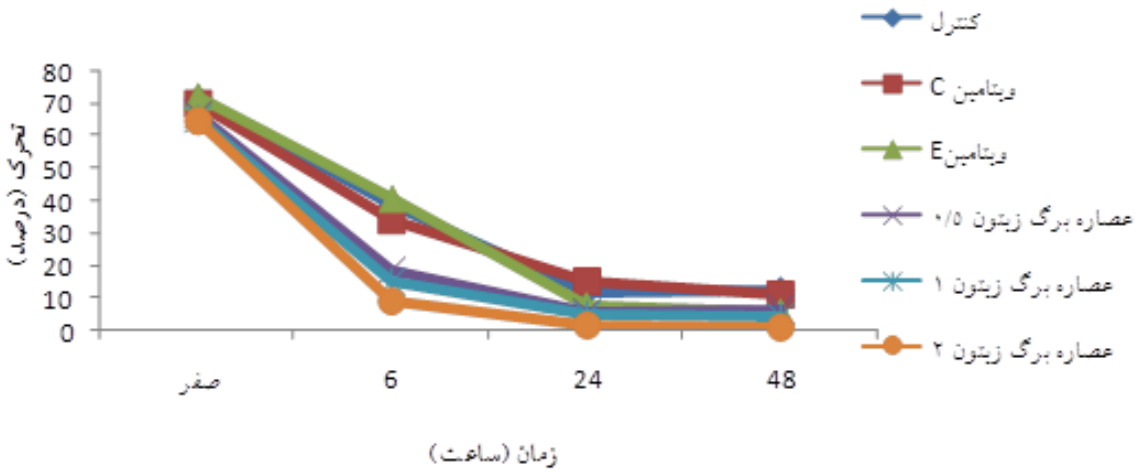
$$y_{ij} = \mu + T_i + M_j + EM_{ij} + e_{ij} \qquad \text{(رابطه ۱)}$$

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

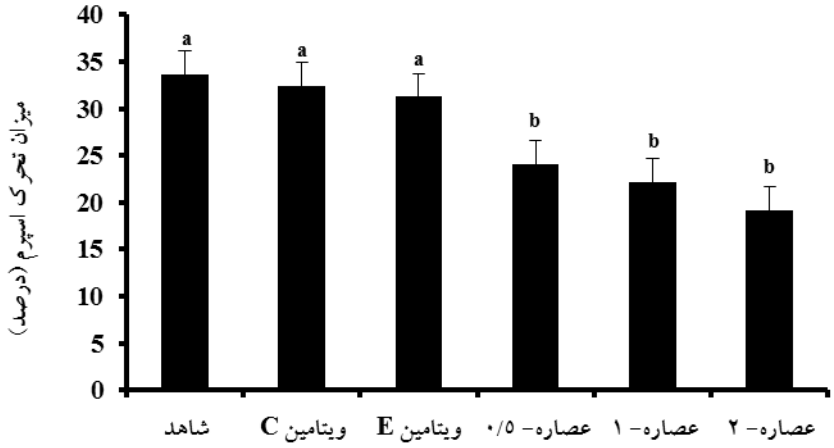
نتایج و بحث

تحرک اسپرم ها با افزایش زمان نگهداری کاهش یافت (P<۰/۰۵ ؛ شکل ۱). تحرک اسپرم‌ها در تیمارهای مختلف در ساعت صفر نگهداری تفاوتی نداشتند. تحرک اسپرم در شش، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از نگهداری، در تیمارهای حاوی عصاره برگ زیتون کمتر از گروه شاهد و ویتامین‌ها بود (P<۰/۰۵).

تحرک اسپرم ها در تیمارهای حاوی عصاره برگ زیتون سایر تیمارها کمتر بود (P<۰/۰۵). میزان تحرک اسپرم در تیمارها با غلظت‌های متفاوت عصاره برگ اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند(شکل ۲).



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



شکل ۲. میانگین ۴۸ ساعته درصد تحرک اسپرم

تیمار شاهد: نمونه اسپرم بدون افزودن آنتی اکسیدان، ویتامین C: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین C، ویتامین E: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین E و سه تیمار عصاره-۰/۵ ،عصاره-۱ و عصاره-۲ که به ترتیب حاوی ۰/۵، یک و دو میلی گرم در میلی لیتر عصاره برگ زیتون.
a-c: تفاوت میانگین ها با حروف غیرمشابه معنی دار است (P<۰/۰۵).

برگ‌های زیتون دارای متابولیت‌های ثانویه‌ای چون تانن، ساپونین، استروئید، آلکالوئید، استرول غیراشباع و ترپن است. علاوه بر این تحقیقات نشان داده که الئونولیک اسید (موجود در عصاره برگ زیتون) در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند از تحرک اسپرم موش جلوگیری کند و اثرات زیان‌آوری روی تولیدمثل جنس نر داشته باشد. در مطالعه‌ای ثابت شد الئونولیک اسید دارای عمل سینرژیست با اثرات اسپرم‌کشی ساپونین است [۹]. مطالعه حاضر نشان داد که افزودن عصاره برگ زیتون به رقیق‌کننده اسپرم گاو میزان تحرک اسپرم را کاهش می‌دهد. مطالعات انجام شده بر روی موش صحرایی نتایج متفاوتی را نشان داده است [۱]. در پژوهش دیگری عصاره هیدروالکلی زیتون در غلظت‌های ۵۰، ۱۵۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب کاهش وزن بیضه چپ، هورمون تستوسترون، تعداد و تحرک اسپرم در رت گردید [۱۴].

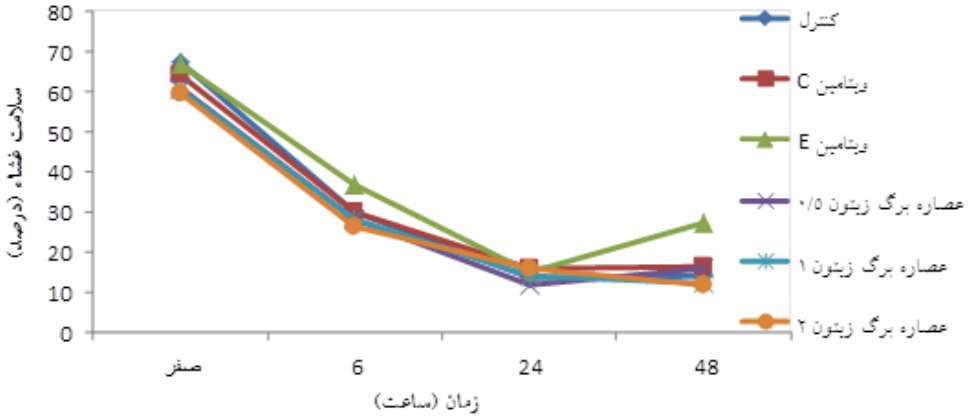
در مطالعه‌ای دیگر گزارش شده است که غلظت ۰/۴ میلی‌لیتر عصاره زیتون تأثیری بر تحرک و غلظت اسپرم نداشت [۱۹]. یکی از دلایل تفاوت نتایج طرح حاضر با سایرین می‌تواند مربوط به روش استفاده از عصاره باشد. در این پژوهش عصاره برگ زیتون به طور مستقیم به اسپرم اضافه شد در حالیکه در آزمایش‌های صورت گرفته با رت این عصاره به موش‌های صحرایی خورانده شد. به عنوان نمونه در مطالعه‌ای نشان داده شد که خوراندن عصاره برگ زیتون به رت‌ها سبب افزایش تحرک اسپرم‌ها می‌شود [۱]. لذا اثرات عصاره برگ زیتون بر تحرک اسپرم گاو ممکن است به دلیل افزودن مستقیم این عصاره به اسپرم رخ داده باشد.

عصاره برگ زیتون شامل ترکیبات مختلفی بوده که مهمترین آنها اولئوروپئین بعنوان یک ماده آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. اما تفاوت مطالعه حاضر با مطالعات دیگران، افزودن مستقیم این عصاره بداخل نمونه‌های اسپرم است. درحالی‌که در مطالعات دیگر این عصاره به حیوانات خورانده شده است، لذا سایر ترکیبات فنلی داخل عصاره توسط کبد سم‌زدایی می‌شوند. اما در اضافه کردن مستقیم عصاره به اسپرم، این سم‌زدایی انجام نمی‌شود و لذا احتمالاً نتایج بدست آمده مبنی بر کاهش تحرک اسپرم متعاقب

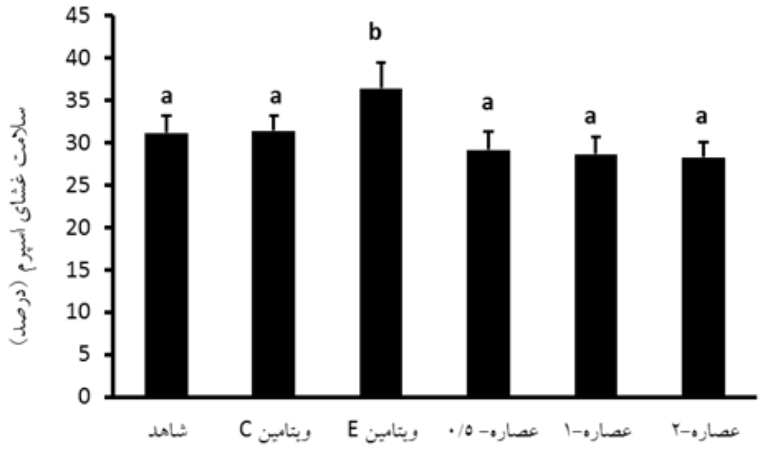
استفاده از عصاره برگ زیتون به همین دلیل باشد. در همین راستا تحقیق حاضر نشان داد که افزودن مستقیم عصاره برگ زیتون به اسپرم‌ها برخلاف سایر آنتی‌اکسیدان های دیگر روش مطلوبی نبوده و دارای اثرات منفی بر روی تحرک اسپرم ها می‌باشد.

سلامت غشای اسپرم با افزایش زمان نگهداری در همه تیمارها به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵ ، شکل ۳). اما در ساعت‌های صفر، شش و ۲۴ تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد. در ساعت ۴۸ نگهداری، سلامت غشای اسپرم در رقیق‌کننده حاوی ویتامین E از سایر تیمارها بالاتر بود (P<۰/۰۵).

سلامت غشای اسپرم در تیمارهای حاوی عصاره برگ زیتون تفاوتی با این صفت در رقیق‌کننده شاهد و با رقیق‌کننده حاوی ویتامینC نداشت (شکل۴). درحالی‌که تیمار حاوی ویتامین E توانست سلامت غشاء را نسبت به دیگر تیمارها افزایش دهد (P<۰/۰۵).



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



شکل ۴. درصد سلامت غشای اسپرم

تیمار شاهد: نمونه اسپرم بدون افزودن آنتی اکسیدان، ویتامین C: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین C، ویتامین E: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین E و سه تیمار عصاره-۰/۵ ، عصاره-۱ و عصاره-۲ که به ترتیب حاوی ۰/۵، یک و دو میلی گرم در میلی لیتر عصاره برگ زیتون.

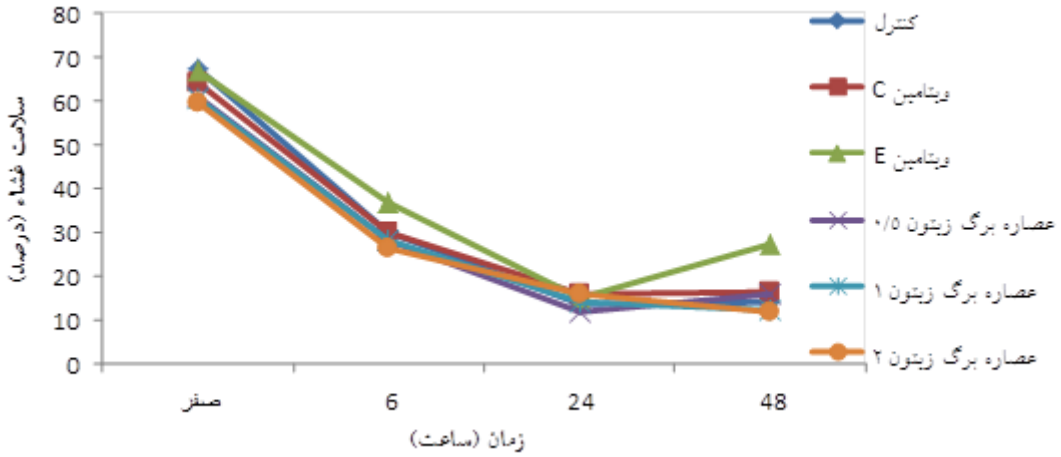
a-c: تفاوت میانگین ها با حروف غیرمشابه معنی دار است (P<۰/۰۵).

سلامت غشای اسپرم در تیمارهای حاوی عصاره برگ زیتون، تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و ویتامین C نداشت در حالی که تیمار ویتامین E توانست سلامت غشاء را در ۴۸ ساعت پس از نگهداری نسبت به دیگر تیمارها افزایش دهد. سردسازی و انجماد، تغییر فازهای لیپیدی غشاء را در اسپرم تحریک می‌کند و به تغییر پایداری و ساختار غشاء می‌انجامد که با صدمه به اسپرم و کاهش توانایی باروری همراه است. تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد به موجب افزایش پراکسیداسیون چربی‌های غشای اسپرم می شود[۱۸]. از دست دادن یکپارچگی غشاء باعث افزایش نفوذپذیری غشاء و توانایی نداشتن در تنظیم غلظت‌های درون‌سلولی یون‌های درگیر در کنترل حرکات اسپرم می‌شود [۵]. نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو ناشی از اتانول در بیضه موش صحرایی ممکن است با ترکیب فنولیک زیتون (اولئوروپئین) به وسیله اثرات آنتی‌اکسیدانی و متوقف کردن استرس اکسیداتیو به طور موفقیت‌آمیز درمان شود.

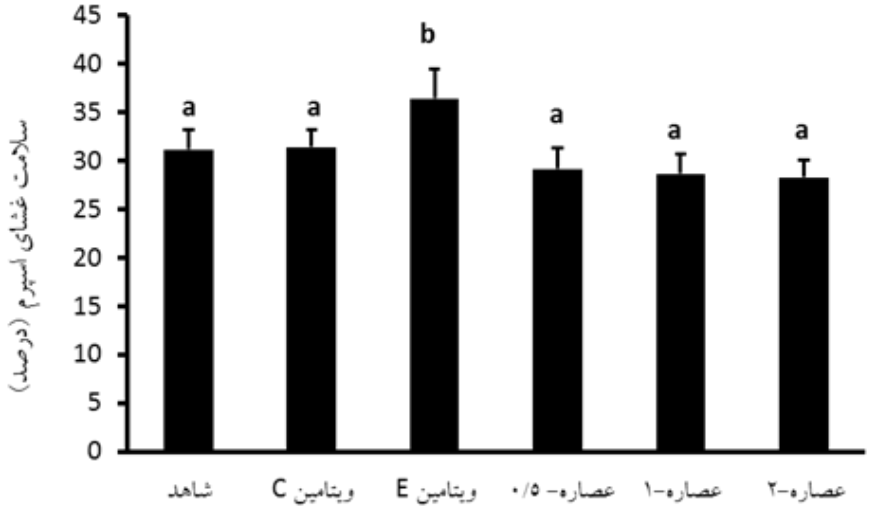
علاوه بر این اولئوروپئین باعث پیشگیری از استرس اکسیداتیو شده و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می‌دهد و باعث افزایش تحرک اسپرم، حفظ تمامیت غشاء و به دنبال آن افزایش قابلیت زنده‌مانی اسپرم می‌شود [۱].

غلظت مواد واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک‌اسید در زمان‌های مختلف در دوره ۴۸ ساعته نگهداری در شکل ۵ نشان داده شده است. در زمان‌های صفر، شش و ۲۴ ساعت پس از نگهداری، غلظت مواد واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک‌اسید در رقیق‌کننده حاوی دو میلی‌گرم عصاره برگ زیتون کمتر از سایر رقیق‌کننده ها بود (P<۰/۰۵).

سلامت غشای اسپرم در تیمارهای حاوی عصاره برگ زیتون تفاوتی با این صفت در رقیق‌کننده شاهد و با رقیق‌کننده حاوی ویتامینC نداشت (شکل۴). درحالی‌که تیمار حاوی ویتامین E توانست سلامت غشاء را نسبت به دیگر تیمارها افزایش دهد (P<۰/۰۵).



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



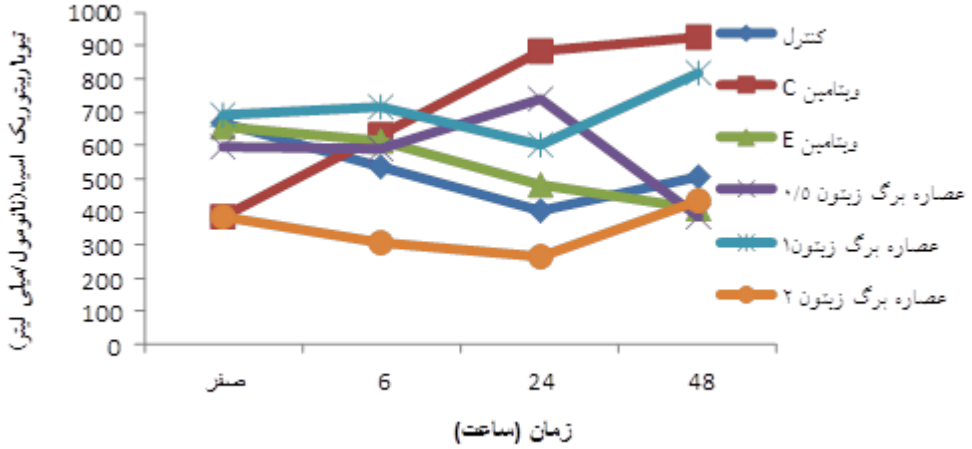
شکل ۴. درصد سلامت غشای اسپرم

تیمار شاهد: نمونه اسپرم بدون افزودن آنتی اکسیدان، ویتامین C: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین C، ویتامین E: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین E و سه تیمار عصاره-۰/۵ ، عصاره-۱ و عصاره-۲ که به ترتیب حاوی ۰/۵، یک و دو میلی گرم در میلی لیتر عصاره برگ زیتون.
a-c: تفاوت میانگین ها با حروف غیرمشابه معنی دار است (P<۰/۰۵).

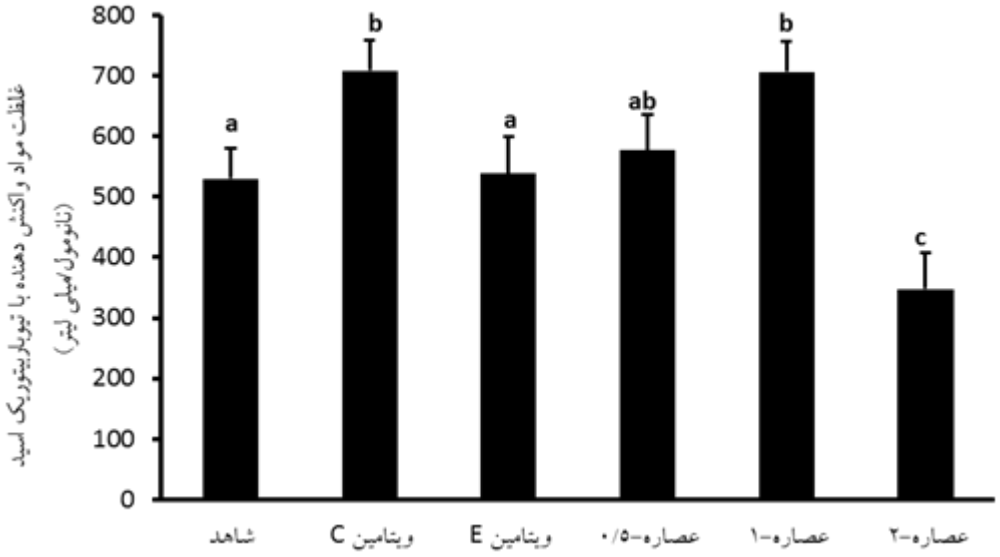
سلامت غشای اسپرم در تیمارهای حاوی عصاره برگ زیتون، تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و ویتامین C نداشت در حالی که تیمار ویتامین E توانست سلامت غشاء را در ۴۸ ساعت پس از نگهداری نسبت به دیگر تیمارها افزایش دهد. سردسازی و انجماد، تغییر فازهای لیپیدی غشاء را در اسپرم تحریک می‌کند و به تغییر پایداری و ساختار غشاء می‌انجامد که با صدمه به اسپرم و کاهش توانایی باروری همراه است. تولید بیش از اندازه رادیکال-های آزاد به موجب افزایش پراکسیداسیون چربی‌های غشای اسپرم می شود[۱۸]. از دست دادن یکپارچگی غشاء باعث افزایش نفوذپذیری غشاء و توانایی نداشتن در تنظیم غلظت‌های درون‌سلولی یون‌های درگیر در کنترل حرکات اسپرم می‌شود [۵]. نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو ناشی از اتانول در بیضه موش صحرایی ممکن است با ترکیب فنولیک زیتون (اولئوروپئین) به وسیله اثرات آنتی‌اکسیدانی و متوقف کردن استرس اکسیداتیو به طور موفقیت‌آمیز درمان شود. علاوه بر این اولئوروپئین باعث پیشگیری از استرس اکسیداتیو شده و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می‌دهد و باعث افزایش تحرک اسپرم، حفظ تمامیت غشاء و به دنبال آن افزایش قابلیت زنده‌مانی اسپرم می‌شود [۱].

غلظت مواد واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک‌اسید در زمان‌های مختلف در دوره ۴۸ ساعته نگهداری در شکل ۵ نشان داده شده است. در زمان‌های صفر، شش و ۲۴ ساعت پس از نگهداری، غلظت مواد واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک‌اسید در رقیق‌کننده حاوی دو میلی‌گرم عصاره برگ زیتون کمتر از سایر رقیق‌کننده ها بود (P<۰/۰۵).

غلظت مواد واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک‌اسید در تیمارها در شکل ۶نشان داده شده است. غلظت مواد واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک‌اسید در تیمار حاوی دو میلی‌گرم عصاره برگ زیتون در مقایسه با سایر تیمارها کمتر بود (P<۰/۰۵).



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



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

تیمار شاهد: نمونه اسپرم بدون افزودن آنتی اکسیدان، ویتامین C: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین C، ویتامین E: حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر ویتامین E و سه تیمار عصاره-۰/۵، عصاره-۱ و عصاره-۲ که به ترتیب حاوی ۰/۵ یک و دو میلی گرم در میلی لیتر عصاره برگ زیتون

a-c: تفاوت میانگین ها با حروف غیرمشابه معنی دار است (P<۰/۰۵).

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

در پژوهش دیگری، عصاره برگ زیتون توانست باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم خروس در دمای چهار درجه سانتیگراد شود [۷] که این نتایج با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. از طرفی خوراندن عصاره برگ زیتون در رت‌ها باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و پیشگیری از پراکسیداسیون لیپیدی در بافت کبد و معده موش صحرایی شده است [۲و۳]. گزارش شده است که عصاره برگ زیتون باعث کاهش معنی‌دار در غلظت مالون‌دی-آلدئید سرم خون خرگوش شد[۴]. در مطالعه دیگری عصاره برگ زیتون سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در ناحیه کورتکس مغز رت‌ها شد [۸]. بنابراین با توجه به تحقیقات انجام گرفته به نظر می‌رسد کاهش TBARS به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و پاک‌کنندگی رادیکال‌های آزاد توسط عصاره برگ زیتون باشد.

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

منابع

1. Alirezaei M, Kheradmand A, Heydari R, Tanideh N, Neamati Sh and Rashidipour, M (2012a) Oleuropein protects ethanol-induced oxidative stress and modulates sperm quality in the rat testis. Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism 5: 205–211.
2. Alirezaei M, Dezfoulian O, Neamati Sh, Rashidipour M, Tanideh N and Kheradmand A (2012b) Oleuropein prevent ethanol-induced gastric ulcers via elevation of antioxidant enzyme activities in rats. Journal of Physiology and Biochemistry 68: 583-592.
3. Alirezaei M, Dezfoulian O, Kheradmand A, Neamati Sh, Khonsari A and Pirzadeh A (2012c) Hepatoprotective effects of purified oleuropein from olive leaf extract against ethanol- induced damages in the rat. Iranian Journal of Veterinary Research 13: 3- 40.
4. Andrreadou I, Iliodromitis EK, Micors E, Constantinou M, Agalias A and Magiatis P (2006) The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic,antioxidative, and hypolipitemic effects in anesthetized rabbits. Journal of Nutrition 136: 13-19.
5. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA and Gagnon C (2000) Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Journal of Molecular and Morphological Review 55: 282–288.
6. Esmaeili-Mahani S, Rezaeezadeh-Roukerd M, Esmaeilpour K, Abbasnejad M, Rasoulian B, Sheibani V, Kaeidi A and Hajializadeh Z (2010) Olive (*Olea euoropaea L.*) Leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. Journal of Ethnopharmacology 132: 200-205.

7. Jalali SM, Mohammady M and Roostaaei M (2013) Effect of Olive leaf extract on lipid peroxidation male sperm during storage at 4 ºC. National Congress of New Technologies in Animal Sciences. 20 -21 Nov., Islamic Azad University, Isfahan. Iran.

8. Khanjani Jelodar S and Bigdeli, M R (2013) Effect of Olive Leaf Extract on the behavioral signs of huntington's disease and antioxidant enzymatic activity in the rat brain. Physiology and Pharmacology 17: 328-338.

9. Kumar S, Biswas S, Mandal D, Roy HN, Chakraborty S, Kabir SN, Banerjee S and Mondal NB (2007) Chenopodium album seed extract: a potent sperm-immobilizing agent both in vitro and in vivo. Contraception 75: 71– 78.

10. Lujan RJ, Rodriguez JML and Castro MDL (2006) Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. Journal of Chromatography 108: 76-82.

11. Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P and Noble R (2005) Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. Theriogenology 63: 411-421.

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

13. Mohame R, Pineda M, and Aguilar M (2007) Antioxidant capacity of extracts from wild and crop plants of mediterranean region. Journal of Food Science 72: 59-63.

14. Najafizadeh P, Dehghani F, Panjehshahi M and Hamzei Taj S (2013) The effect of a hydro-alcoholic extract of olive fruit on reproductive argons in male sprague-dawley rat. Iranian Journal of Reproduction Medicine 11: 293-300.

15. O'Flaherty C, de Lamirande E and Gagnon C (2006) Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. Free Radical Biology and Medicine 40: 1045-1055.

16. Rafiei1 Z, Jafari SM, Alami M and Khomeiri M (2012) Evaluation of antimicrobial activity of olive leaf extracts by ELISA method. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 28: 12-22.

17. Ranalli A, Contento S, Lucera L, Di Febo M, Marchegiani D and Di Fonzo V (2006) Factors affecting the contents of iridoidoleuropein in olive leaves (*Olea europaea L.*). Agricultural and Food Chemistry 54: 434-40.

18. Sharma RK and Agarwal, A (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology 48: 835-850.

19. Sherif W, Mansour I, Sibghatullah S, Sree H, Mueen A and Khaleel ARN (2013) Sensibility of male rats' fertility against olive oil, Nigella sativa oil and pomegranate extract. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology 3: 563-568.

20. Sliwa L and Macura B (2005) Evaluation of cell membrane integrity of spermatozoa by hypoosmotic swelling test - "water test" in mice after intra peritone aldaidzein administration. Archives of Andrology 51: 443-448.

21. Sonmez M, Turk G and Yuce A (2005) The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and male Wistar rats. Theriogenology 63(7):2063-72.

22. Subbarao KV, Richardson JS and Ang LC (2010) Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. Journal of Neurochemistry 55: 342-345.

Journal of
Animal Production
(College of Abouraihan – University of Tehran)
Vol. 19 ■ No. 1 ■ Spring 2017

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

Shahin Mazaheri[1], Ali Kiani [2*], Arash Kheradmand [3], Masoud Alirezaei[4]

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

Received: February 26, 2016 **Accepted: May 25, 2016**

Abstract

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

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

Email: kiani.a@lu.ac.ir