مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۱۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹

اثر آنتی‌اکسیدانتی عصاره دانه‌ی خرنوب بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ فراهانی بعد از انجماد و یخ‌گشایی

محسن عسگری .M.Sc، مهدی خدایی‌مطلق .Ph.D*[1]، مهدی کاظمی بن‌چناری .Ph.D[1]، وحید واحدی .Ph.D[2]

۱- دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی، اراک، ایران
۲- دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی، اردبیل ، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mmotlagh2002@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۲۶

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش بررسی تاثیرعصاره‌ی دانه‌ی خرنوب به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت طبیعی بر کیفیت اسپرم قوچ نژاد فراهانی پس از یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از پنج راس قوچ نژاد فراهانی (وزن: ۵±۶۰ کیلوگرم)، دو بار در هفته توسط واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شد. به‌منظور از بین بردن اثرات فردی دام‌ها انزال آن‌ها به‌نسبت مساوی باهم مخلوط شدند. سطوح مختلف عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب (صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌لیتر) به رقیق کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ-تریس افزوده شد. نمونه‌ها بعد از طی مراحل سرد سازی و پر شدن در پایوت‌ها، در بخار ازت منجمد شده و تا زمان ارزیابی در ازت مایع نگه‌داری شدند. پس از یخ‌گشایی و ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد فراسنجه‌های کیفی اسپرم نظیر جنبایی، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی (تست ائوزین- نگروزین)، سلامت غشا (تست هاست) و همچنین ریخت‌شناسی اسپرم‌ها (تست هانکوک) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج نشان داد که سطح ۰/۰۵ میلی‌لیتر ازعصاره‌ی دانه‌ی خرنوب به‌طورمعنی‌داری سبب بهبودی فراسنجه‌های اسپرم همچون تحرک، زنده‌مانی، یک‌پارچگی غشای پلاسمایی و ریخت‌شناسی درمقایسه با گروه شاهد شد ($P<0/01$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که افزودن ۰/۰۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب به رقیق‌کننده بر پایه‌ی تریس- زرده‌ی تخم‌مرغ برای فریز و یخ‌گشایی اسپرم در قوچ نژاد فراهانی احتمالا می‌تواند مفید باشد.

واژگان کلیدی: عصاره‌ی دانه، قوچ، اسپرم، آنتی‌اکسیدانت

مقدمه

انجماد منی پستانداران تحولی اساسی در نگه‌داری منی و حفاظت از انجماد سلول اسپرم، راهی برای حفظ ژرم پلاسم بوده که می‌تواند با حفظ DNA گونه‌ها، در دامپروری، آبزی پروری و حفظ تنوع زیستی کاربرد داشته باشد (۱). درطول فرآیند انجماد- یخ‌گشایی منی، تنش‌های فیزیکی و شیمیایی در غشای اسپرم به‌وجود آمده و موجب کاهش کیفیت، زنده‌مانی، تحرک و قدرت باروری اسپرم‌ها می‌شود، این آسیب‌ها با تولید بیش ازحد رادیکال‌های آزاد به‌ویژه گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای سلول اسپرم، همراه است (۲). استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین تولید ROS و سیستم بیولوژیکی کنترل‌کننده رادیکال‌های آزاد است که در طول فرآیند انجماد، موجب تخریب دیواره غشا و کل ترکیبات ساختمانی اسپرم می‌شود (۲). سلول اسپرم دارای مکانیسم آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی و غیرآنزیمی است اما در فرآیند رقیق‌سازی نسبت آنتی‌اکسیدانت‌های داخلی کاهش یافته و برای فرآوری اسپرم نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدانت‌هایی با منشا خارجی می‌باشد (۳). آنتی‌اکسیدانت‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانتی گیاهان به‌طورعمده به ترکیبات فنولیک، فلاوونوئیدها، اسیدهای فنولیکودی‌ترپن‌های فنولیک مربوط می‌شود (۴).

خرنوب درختی از خانواده حبوبات و با نام علمی *Ceratonia siliqua L* است. این گیاه درختچه یا درختی همیشه سبز، اغلب یک پایه با برگ‌های شانه‌ای منفرد و گل آذین خوشه‌های انبوه پرگل می‌باشد (۵). با مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره متانولی دانه‌ی خرنوب متوجه شدند دانه‌ی این گیاه منبع غنی از آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی است (۶). مطالعات نشان داده‌اند که دانه‌ی خرنوب دارای ترکیباتی مانند توکوفرول، استرول‌های گیاهی و آنتی‌اکسیدانتی‌های فراوان است و می‌تواند با اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد تولید شد هم قابله نموده و استرس اکسیداتیو درون سلولی را به‌حداقل برساند (۷). مطالعات برروی محتویات شیمیایی دانه‌ی خرنوب نشان می‌دهد که حاوی مقدار زیادی ازالیاف، ترکیبات پلی‌فنولیک، اسید آراشیدونیک، لیگنین، چربی، پروتئین، کربوهیدرات، کلسیم، پتاسیم و فسفر است (۸). حضور ویتامین E در دانه خرنوب اثبات شده است (۹). یکی از مهم‌ترین خواص شیمیایی ویتامین E حساسیت بالای آن به اکسیدانت است و از آن به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت در صنعت داروسازی استفاده می‌شود (۱۰). همچنین دانه‌ی خرنوب به‌عنوان یک منبع بالقوه آنتی‌اکسیدانت-های طبیعی در نظر گرفته می‌شود (۶). فعالیت آنتی‌اکسیدانتی خرنوب مربوط به ترکیبات فنلی است (۱۱). مطالعات نشان داد که ترکیبات فنلی از پودر خرنوب شامل: پروتوکاتکویک، پیروگالول، کومارین، سینامیک، فرولیک، اسیدگالیک، وانیلیک، کاتکول،کلروژنیک، اسیدکافئیک و کاتچین است (۱۲). جوشانده خرنوب افزایش‌دهنده تعداد و کیفیت اسپرم متحرک و علیه ناتوانی جنسی در مردان ذکر شده است (۱۳). تحقیقات نشان می‌دهدکه از عصاره‌ی هیدروالکلی دانه‌ی خرنوب به‌صورت خوراکی در موش استفاده شده است و اثر آن بر هورمون‌های بیضه و اسپرماتوژنز مورد بررسی قرارگرفته که باعث افزایش غلظت تستوسترون شده است (۱۴). تاکنون گزارشی در رابطه با تاثیر آنتی‌اکسیدانتی عصاره دانه‌ی خرنوب بر فراسنجه‌های بعد از یخ‌گشایی اسپرم صورت نگرفته است.

هدف از انجام این آزمایش بررسی تاثیر سطوح مختلف عصاره دانه‌ی خرنوب به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت طبیعی بر فراسنجه‌های کیفیت اسپرم قوچ بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی است.

مواد و روش‌ها

روش پژوهش از نوع تجربی بود. این تحقیق در مزرعه‌ی دانشگاه اراک با مشخصات جغرافیایی ۳۴۱۸۶۴۷۶۰ (عرض جغرافیایی)، ۴۹۶۴۲۶۵۹۰ (طول جغرافیایی) و ۱۶۸۷۲۲ (ارتفاع جغرافیایی) انجام گرفته، در این آزمایش از تعداد ۵ راس قوچ نژاد فراهانی (با میانگین سنی ۳±۰/۵ سال و وزن ۶۰±۵ کیلوگرم)، استفاده شد. قوچ‌ها آموزش یک ماه جهت اسپرم‌گیری با

مهبل مصنوعی آموزش دیدند. بر اساس جدول کمیته ملی تحقیقات آمریکا (۱۵) در دو وعده صبح و شب، جیره‌ی غذایی به‌صورت دستی در اختیار دام‌ها قرار گرفت.

جهت تحریک قوچ‌های نر برای پرش و انزال مطلوب، از یک رأس میش فحل استفاده شد. انزال‌هایی که معیارها و شرایط ذیل را داشتند، برای انجام آزمایش انتخاب شدند: حجم ۲-۰/۵ میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از ۳×۱۰^{۹} اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک بالای۸۰ درصد و کمتر از ۱۰ درصد اسپرم ناهنجار بلافاصله بعد از جمع‌آوری و ارزیابی اولیه منی، انزال‌های جمع‌آوری شده همه با هم به‌دلیل جلوگیری از اثرات و پراکنش فردی قوچ‌ها مخلوط شده و برای آزمایش‌ها استفاده شد. بعد از تهیه‌ی میوه‌های خرنوب نیام‌ها را شکسته، دانه‌ها را جدا و آسیاب کرده تا پودر نرمی حاصل شود یک کیلوگرم از پودر حاصله را به نسبت ۵۰/۵۰ با الکل اتانول ۹۶ درصد و آب به‌مدت ۷۲ ساعت خیسانده و آن را در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت۴۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۸ دقیقه قرار داده تا ذرات معلق در آن جدا شوند. بعد از سانتریفیوژ مایع به‌دست آمده در آون۴۰ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد تا آب و الکل آن تبخیر شد و یک شیره قهوه‌ای غلیظ باقی بماند. در مرحله بعد، مقادیر مورد نظر از عصاره در آب مقطر حل شد تا غلظت‌های مختلف به‌دست آید.

در این تحقیق از رقیق‌کننده یک مرحله‌ای منی قوچ که حاوی ۳/۶۳۴ گرم تریس (هیدروکسی متیل) آمینومتان، ۰/۵ گرم فروکتوز، ۱/۹۹ گرم اسید سیتریک، ۱۵ میلی‌لیتر زرده تخم مرغ، ۵ میلی‌لیتر گلیسرول، ۱۰۰۰۰۰ هزار واحد بین‌المللی پنی‌سیلین، ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین و آب مقطر برای رساندن حجم رقیق کننده به ۱۰۰ میلی‌لیتر و با Hp=۷ و اسمولاریته ۰/۰۲۳ میلی‌اسمول، به‌عنوان رقیق کننده پایه منی استفاده شد (۶۱).

تیمارها شامل: شاهد: رقیق کننده‌ی پایه تریس، تیمار۱: رقیق کننده‌ی تریس حاوی ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره دانه‌ی خرنوب، تیمار۲: رقیق کننده‌ی تریس حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره دانه‌ی خرنوب، تیمار۳: رقیق کننده‌ی تریس حاوی ۰/۱۵ میلی‌لیتر عصاره دانه‌ی خرنوب، تیمار۴: رقیق کننده‌ی تریس حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره دانه‌ی خرنوب، که میزان عصاره‌ها با سرنگ انسولین به رقیق کننده‌ها اضافه شد.

برای انجماد، ابتدا نمونه‌های آزمایشی در پایوت‌های ۰/۵میلی‌لیتری بسته‌بندی شده و به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از طی دوره‌ی تعادل، پایوت‌ها در فاصله‌ی ۵ سانتی‌متری به‌مدت ۱۰ دقیقه در معرض بخار ازت مایع منجمد و سپس در ازت مایع غوطه‌ور شده و برای نگه‌داری به تانک ازت، منتقل شدند (۱۷).

برای ذوب منی، پس از خارج کردن پایوت‌های حاوی منی از ازت، پایوت‌ها، به‌مدت۳۰ ثانیه در داخل آب‌گرم ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرارداده شد و سپس پایوت‌ها به داخل لوله‌های اپندورف تخلیه شدند. پایوت‌ها بعد از یخ‌گشایی با دستمال کاغذی خشک و سپس انتهایی را که با پلی‌وینیل الکل مسدود بود، با قیچی بریده و منی بر اساس تیمارهای مشخص شده درون میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری خالی شدند. جهت تطابق‌پذیری و بازگشت آب درون سلولی به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ماندند و برای ارزیابی نمونه‌ها ۵ میکرولیتر از آن‌ها برداشته و بقیه درون انکوباتور۷۳ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا فراسنجه‌های تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشا پلاسمایی و سلامت آکروزوم اسپرم ارزیابی قرار بگیرند.

برای بررسی جنبایی اسپرم ۳ پایوت از هر گروه تیماری ذوب شده و به داخل لوله‌های اپندورف انتقال داده شدند، سپس با استفاده از سمپلر و با برداشتن ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام و گذاشتن یک لامل تمیز روی آن، لام موردنظر با استفاده از سیستم آنالیز اسپرم کامپیوتری یا CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) بررسی شد. پس از بررسی

نمونه‌های اسپرم به‌وسیله‌ی نرم‌افزار ASAC در این آزمایش فراسنجه‌های ارزیابی تحرک مانند درصد کل اسپرم‌های متحرک و درصد اسپرم‌های پیش‌رونده محاسبه شد (۱۸).

برای ارزیابی یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم از تست محلول هایپواسمتیک یا HOST (hypo-osmotic swelling test) (فروکتوز ۹ گرم، سدیم سیترات ۴۹ گرم، PH ۷/۲ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) استفاده شد (۱۹ و ۲۰). برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک اضافه شد. سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس انکوبه شد. پس از انکوباسیون نمونه با ملایمت مخلوط شده و یک قطره از نمونه‌ی انکوبه شده را روی لامی که قبلا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم شده قرار داده و سپس آن را با لامل پوشانده، ارزیابی و شمارش اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری فازکنتراست و با بزرگنمایی۴۰۰ صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های با دم گره خورده (غشای سالم) نسبت به گره نخورده (غشای آسیب دیده) محاسبه شد.

برای ارزیابی اسپرم با ریخت‌شناسی غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول هانکوک که شامل فرمالین ۳۷ درصد (۶۲/۵ میلی‌لیتر)، محلول سالین (۱۵۰ میلی‌لیتر)، محلول بافر فسفات (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دوبار تقطیر (۵۰۰ میلی‌لیتر) می‌باشد، افزوده شد و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفت و توسط یک لامل پوشانده شد و با شمارش حداقل۲۰۰ اسپرماتوزوا زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی غیرطبیعی (آکروزوم غیرطبیعی، سر جدا شده، نقص‌های دم و میانه اسپرم) به کل اسپرم شمارش شده، محاسبه شد (۱۲). برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین برداشته و روی نمونه ریخته و با سرسمپلر به‌آرامی نمونه را هم‌زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ۳۰ ثانیه ۲۰ میکرولیتر از نمونه را برداشته و بر گوشه‌ی لام دیگری گذاشته و با یک لام دیگر بر روی لام به‌آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن لام را زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ قرار داده و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد (۲۲).

در تجزیه و تحلیل این آزمایش از نرم افزار SAS استفاده شد و از طرح کاملا تصادفی با تکرار متعادل (پنج تیمار و پنج تکرار) برای محاسبه‌ی اثر تیمارها روی واحدهای آزمایشی استفاده شد.

نتایج

نتایج آنالیز آماری تحقیق مربوط به تحرک پیشرونده اسپرم همان‌گونه که در جدول۱ نشان داده شده است سطح ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب با میزان ۱۶ درصد تحرک پیشرونده باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در میزان تحرک پیشرونده اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی با سایر سطوح و گروه شاهد شد ($P<۰/۰۱$). سطح ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب با میزان ۴۵/۸ درصد تحرک پیشرونده دارای اختلاف معنی‌داری با سطوح ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌لیتر و گروه شاهد بود ($P<۰/۰۱$). لازم به‌ذکر است که اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب و گروه شاهد در تحرک پیشرونده اسپرم مشاهده نشد.

جدول ۱: تاثیر سطوح مختلف عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب بر تحرک پیشرونده اسپرم (درصد)

شاهد	تیمار۱ (۰/۰۵)	تیمار۲ (۰/۱)	تیمار۳ (۰/۱۵)	تیمار۴ (۰/۲)	SEM	P-value
۴۹^{c}	۶۱^{a}	۵۴/۸^{b}	۵۱^{c}	۴۹^{c}	۱/۷۱	<۰/۰۱

تفاوت در حروف لاتین در جدول نشان از اختلاف معنی‌داری می‌باشد

همان‌گونه که در جدول ۲ نشان داده شده است سطح ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب با میزان ۶۷/۲ درصد تحرک کل باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در میزان تحرک کل اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی با سایر سطوح و گروه شاهد شد (P<۰/۰۱). سطح ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب با میزان ۶۲/۶ درصد تحرک کل دارای اختلاف معنی‌داری با سطوح ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌لیتر و گروه شاهد بود (P<۰/۰۱). لازم به‌ذکر است که اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب و گروه شاهد در تحرک کل اسپرم مشاهده نشد.

جدول ۲: تاثیر سطوح مختلف عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب بر تحرک کل اسپرم (درصد)

شاهد	تیمار۱ (۰/۰۵)	تیمار۲ (۰/۱)	تیمار۳ (۰/۱۵)	تیمار۴ (۰/۲)	SEM	P-value
۵۷^{c}	۶۷/۲^{a}	۶۲/۶^{b}	۵۸/۳^{c}	۵۷/۵^{c}	۱/۳۴	**<۰/۰۱**

تفاوت در حروف لاتین در جدول نشان از اختلاف معنی‌داری می‌باشد

نتایج مربوط به زنده‌مانی اسپرم (جدول ۳) نشان داد که سطح ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی شد (P<۰/۰۱). سطح ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب با میزان ۶۰/۶ درصد زنده‌مانی دارای اختلاف معنی‌داری با سایر سطوح و گروه شاهد بود (P<۰/۰۱). و اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۰/۱ و ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب و گروه شاهد مشاهده نشد.

جدول ۳: تأثیر سطوح مختلف عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب بر زنده‌مانی اسپرم (درصد)

شاهد	تیمار۱ (۰/۰۵)	تیمار۲ (۰/۱)	تیمار۳ (۰/۱۵)	تیمار۴ (۰/۲)	SEM	P-value
۵۲/۸^{b}	۶۰/۶^{a}	۵۵/۸^{b}	۵۴/۹^{b}	۵۴/۶^{b}	۳/۵۵	**<۰/۰۱**

تفاوت در حروف لاتین در جدول نشان از اختلاف معنی‌داری می‌باشد

نتایج یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم (جدول ۴) نشان داد که سطح ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب با میزان ۶۷/۵ درصد یک‌پارچگی غشای پلاسمایی باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در میزان یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی با سایر سطوح و گروه شاهد شد (P<۰/۰۱). سطح ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب با میزان ۶۲/۴ درصد یک‌پارچگی غشای پلاسمایی دارای اختلاف معنی‌داری با سطوح ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌لیتر و گروه شاهد بود (P<۰/۰۱). و اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب در میزان یک‌پارچگی غشای پلاسمایی مشاهده نشد، اما بین این سطوح و گروه شاهد در میزان یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۱).

جدول ۴: تاثیر سطوح مختلف عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب بر یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم (درصد)

شاهد	تیمار۱ (۰/۰۵)	تیمار۲ (۰/۱)	تیمار۳ (۰/۱۵)	تیمار۴ (۰/۲)	SEM	P-value
۴۴/۸^{d}	۶۷/۵^{a}	۶۲/۴^{b}	۵۸/۶^{c}	۵۵/۳^{c}	۲/۸۱	**<۰/۰۱**

تفاوت در حروف لاتین در جدول نشان از اختلاف معنی‌داری می‌باشد

نتایج مربوط به ریخت شناسی اسپرم (جدول ۵) نشان داد که سطح ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب با میزان ۱۹/۹ درصد باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در کاهش میزان اسپرم‌های با ریخت شناسی غیرطبیعی بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی نسبت به سایر سطوح و گروه شاهد شد (P<۰/۰۱). سطح ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب با میزان ۲۳/۲ درصد باعث

ایجاد اختلاف معنی‌داری در کاهش میزان اسپرم‌های با ریخت شناسی غیرطبیعی نسبت به سایر سطوح و گروه شاهد شد (P<۰/۰۱). سطح ۰/۱۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب با میزان ۲۵ درصد باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در کاهش میزان اسپرم‌های با ریخت شناسی غیرطبیعی نسبت به سطح ۰/۲ و گروه شاهد شد (P<۰/۰۱). سطح ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب با میزان ۲۷/۵ درصد باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در کاهش میزان اسپرم‌های با ریخت شناسی غیرطبیعی نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۱).

جدول ۵: تاثیر سطوح مختلف عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب برناهنجاری‌های ریخت شناسی اسپرم (درصد)

شاهد	تیمار۱ (۰/۰۵)	تیمار۲ (۰/۱)	تیمار۳ (۰/۱۵)	تیمار۴ (۰/۲)	SEM	P-value
۲۹/۴[a]	۱۹/۹[e]	۲۳/۲[d]	۲۵[c]	۲۷/۵[b]	۱/۲۳	<۰/۰۱

تفاوت در حروف لاتین در جدول نشان از اختلاف معنی‌داری می‌باشد

بحث

امروزه، حفظ انجمادی منی کاربردهای بیوتکنولوژیکی بسیاری دارد، ازآن‌جمله که می‌تواند برای درمان مشکلات کم‌باروری انسان، بیماری‌های تهدیدکننده حیات،حفظ منی و DNA گونه‌های در خطر انقراض و حفظ تنوع زیستی مورد استفاده قرار گیرد. مطالعه‌ی مشابهی در زمینه‌ی تاثیر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب بر عملکرد اسپرم قوچ وجود ندارد که ما بتوانیم با نتایج این آزمایش مقایسه کنیم ولی در مورد اثر آنتی‌اکسیدانتی گیاهان دیگر بر اسپرم تحقیقاتی صورت گرفته است. عصاره‌ی بسیاری از گیاهان حاوی ترکیبات بیواکتیو از جمله فنولیک‌ها و فلاونوئیدها هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانتی موثری را نشان داده‌اند و از آسیب رادیکال‌های آزاد ممانعت می‌کنند. اخیرا مشخص شد که افزودن عصاره‌ی آبی گیاه رزماری تاثیر بالقوه‌ای روی فراسنجه‌های تحرک و درصد زنده‌مانی اسپرم خوک داشته و غلظت مالون‌دی‌آلدئید تولیدی که از عوامل اکسیداسیونی مخرب به‌شمار می‌رود، را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (۲۳) که با نتایج مطالعه حاضر مشابهت داشته است احتمالا در پژوهش حاضر نیز عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی خود توانسته است بر اکسیدان‌های حاضر در محیط انجماد-یخ‌گشایی غلبه نماید و تعادل به‌سمت افزایش توان آنتی‌اکسیدانتی و کاهش اکسیداسیون اسپرم شود. استفاده از عصاره‌ی آبی رادیو لاساکرا (Rhodiola sacra) را به منی خوک توانست فراسنجه‌های کیفی منی را بعد از فرآیند انجماد در وضعیت بهتری نگه‌داشته و یک فعالیت قوی پاکسازی رادیکال آنیون سوپراکسید را از خود نشان دهد (۴). که با نتایج پژوهش حاضر شباهت دارد شاید فلاونووئیدهای موجود در عصاره خرنوب در حذف عوامل اکسیداسیون کننده نقش موثری دارد. اثرآنتی‌اکسیدانتی آب انار بر فراسنجه‌های اسپرم و پتانسیل باروری موش‌ها بررسی شده و نشان داد که مصرف خوراکی آب انار در بهبود فراسنجه‌های اسپرم موثر بوده و مصرف آب انار باعث کاهش معنی‌داری درصد اسپرم‌های غیرپیشرونده و غیرطبیعی شد (۲۴). نتایج نشان داد که عصاره‌ی جوانه‌ی گل میخک دارای قدرت آنتی‌اکسیدانتی است و اثر مطلوبی بر اسپرم قوچ در مرحله‌ی سردسازی و پس از انجماد داشت (۲۵). و همچنین عصاره‌ی چای سبز می‌تواند کیفیت اسپرم قوچ را پس از انجماد بهبود بخشد (۲۶)، که با نتایج این مطالعه مشابه بود که احتمالا می‌تواند به‌دلیل داشتن مواد بیواکتیو مشابه این گیاهان باشد. افزودن عصاره‌ی مرزنجوش به رقیق‌کننده منی باعث بهبود اکثر فراسنجه‌های تحرکی اسپرم قوچ قزل بعد از یخ‌گشایی شد (۲۷). نتایج ارزیابی نشان داد که افزودن سطح ۲ و ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره‌ی مریم گلی سهندی باعث بهبود معنی-دارکلیه صفات تحرک و افزودن ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره این گیاه باعث بهبود معنی‌دار صفات زنده‌مانی و یک‌پارچگی غشایی اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های تیماری شد (۲۷). نتایج مطالعات بالا تقریبا با نتایج مطالعه‌ی حاضر شباهت داشت که احتمالا به‌دلیل ترکیبات فعال و فلاونوئیدها خاصیت آنتی‌اکسیدانتی موثری را

نشان داده‌اند و از آسیب رادیکال‌های آزاد ممانعت و باعث بهبود کیفیت اسپرم بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی شده‌اند. بامطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره متانولی دانه خرنوب متوجه شدند دانه‌ی این گیاه منبع غنی از آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی است (۶). عصاره رازیانه با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی خود سبب بهبود فراسنجه‌های حرکتی اسپرم قوچ شد که با تحقیق حاضر شباهت دارد (۲۸)

لسیتین سویا به‌عنوان یک منبع گیاهی موجب بهبود کیفیت مایع منی شد (۲۹). مطالعات نشان داده‌اند که دانه‌ی خرنوب دارای ترکیباتی مانند توکوفرول، استرول‌های گیاهی و آنتی‌اکسیدانتی‌های فراوان است و می‌تواند با اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد تولید شده مقابله نموده و استرس‌اکسیداتیو درون سلولی را به‌حداقل برساند (۷). حضور ویتامین E در دانه‌ی خرنوب اثبات شده است (۹). یکی از مهم‌ترین خواص شیمیایی ویتامین E حساسیت بالای آن به اکسیدانت است و از آن به عنوان آنتی‌اکسیدانت در صنعت داروسازی استفاده می‌شود (۱۰). ویتامین E به‌عنوان مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانت غشایی در داخل بدن مطرح می‌باشد و ضمن تقویت سیستم ایمنی بدن، ازبیماری‌های عروق کرونری بدن جلوگیری می‌کند. ازمهم‌ترین اثرات این ویتامین می‌توان در محافظت غشای سلول‌ها درمقابل آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از پروسه‌های التهابی به‌وسیله تنظیم سیگنال‌های سلولی جهت کنترل و تحریک سیستم ایمنی نام برد (۳۰). ویتامین E مهم‌ترین ماده‌ی ضداکسایشی زنجیره‌شکن محلول در چربی در بدن است که در قالب مجموعه‌ای از ملکول‌ها در بخش آبگریز غشاهای زیستی فعالیت آنتی‌اکسیدانتی دارد و می‌تواند رادیکال‌های پراکسیل‌اسیدهای چرب را به هیدروپراکسیدهای کم‌خطرتری تبدیل کند و واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون را کاهش دهد (۳۱). ویتامین E به‌ویژه باعث محافظت فسفولیپیدهای غشاهای زیستی و لیپوپروتئین‌های پلاسما می‌شود (۳۲). ویتامین E یک آنتی‌اکسیدانت قوی است (۳۳)،که نقش حمایتی آن در کیفیت و کمیت اسپرم، لقاح و باروری در انسان‌ها گزارش شده است (۳۴). و به‌مقدار زیاد در سلول‌های سرتولی، اسپرماتوسیت در مرحله (پاکیتن) و به‌مقدار کمتر در اسپرماتیدهای گرد وجود دارد (۳۵). ویتامین E با خاصیت ضدآلکیله کنندگی خود، از آسیب اسیدهای چرب غیراشباع بافت‌ها دربرابر رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون ممانعت کرده و باعث پایداری غشا سلول‌ها می‌شود (۳۶). آلفاتوکوفرول فراوان‌ترین و فعال‌ترین عضو خانواده ویتامین E و یک آنتی‌اکسیدانت غیرآنزیمی قوی شکننده زنجیر بوده که از پیشروی واکنش‌های رادیکال‌های آزاد اکسیژن جلوگیری می‌کند (۳۷). نتایج نشان دادند که آلفاتوکوفرول فراسنجه‌های کیفی اسپرم گراز نظیر تحرک آن‌را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد و از واکنش‌های اکسیداتیو ناشی از حفاظت انجمادی اسپرم جلوگیری می‌کند (۳۸). نتایج دیگر نیز نشان داد که آلفاتوکوفرول باعث تحرک و افزایش زنده‌مانی اسپرم می‌شود، همچنین اثرات این ماده نسبت به غلظت آن متفاوت است به‌طوری‌که غلظت بالای آلفاتوکوفرول اثرات اکسیداتیو ولی غلظت‌های پایین آن اثرات آنتی‌اکسیداتیو دارد (۳۹). اهمیت ویتامین E مربوط به توانایی آن در حمایت از ارگانیسم‌ها در برابر حمله رادیکال‌های آزاد می‌باشد. واثرات حمایتی ویتامین E و گیاه زنجبیل بر سمیت القا شده توسط سیکلوفسفامید در دستگاه تولیدمثل موش‌های نر، پیش ازشروع دوره شیمی درمانی را گزارش کردند (۴۰). تحقیقات نشان داده‌اند که افزودن ویتامین E به رقیق کننده اسپرم منجر به بهبود خصوصیات ریخت شناسی منی و نهایت افزایش باروری طیور می‌شد (۴۱ و ۴۲). حفاظت انجمادی اسپرم در مدل‌های حیوانی و اسپرم انسانی مطالعاتی انجام گرفته است که بیان‌گر اثر وابسته به دوز ویتامین E در بهبود تحرک و حیات اسپرم از طریق مهار لیپیدپراکسیداسیون غشای پلاسمایی اسپرم می‌باشد (۳۰). تجویز خوراکی ویتامینE درترکیب با دیگر آنتی‌اکسیدانت‌ها نیز توانسته است میزان آسیب را در بیماران نابارور کاهش و باعث افزایش تحرک و بهبود ریخت شناسی اسپرم افراد آستنوتراتوزواسپرمی شود (۴۳). استفاده از ویتامین E در قوچ موجب بهبود خصوصیات اسپرم ازجمله تحرک و زنده‌مانی شد (۴۴). استفاده از ویتامین E باعث افزایش معنی‌دار تحرک

و زنده‌مانی اسپرم قوچ آتابای در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس در شرایط نگهداری به‌صورت مایع در دمای پنج درجه سانتی-گراد شد (۴۵). همچنین دانه‌ی خرنوب به‌عنوان یک منبع بالقوه آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی در نظر گرفته می‌شود (۶). فعالیت آنتی‌اکسیدانت خرنوب مربوط به ترکیبات فنلی است(۱۱). مطالعات نشان داد که ترکیبات فنلی از پودر خرنوب شامل ۱۱ ترکیبات: پروتوکاتکویک، پیروگالول، کومارین، سینامیک، فرولیک، اسیدگالیک، وانیلیک،کاتکول،کلروژنیک، اسیدکافئیک و کاتچین (۱۲). جوشانده خرنوب افزایش‌دهنده تعداد و کیفیت اسپرم متحرک و علیه ناتوانی جنسی در مردان ذکر شده است (۱۳). تحقیقات نشان می‌دهد که از عصاره‌ی هیدروالکلی دانه‌ی خرنوب به‌صورت خوراکی در موش استفاده شده است و اثر آن بر هورمون‌های بیضه و اسپرماتوژنز مورد بررسی قرارگرفته که باعث افزایش غلظت تستوسترون شده است (۱۴). در این مطالعه افزودن عصاره دانه‌ی خرنوب به رقیق‌کننده، موجب بهبود فراسنجه‌های تحرک، زنده‌مانی، یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم و کاهش ناهنجاری‌های ریخت شناسی اسپرم در مقایسه با گروه شاهد شده و توانست اسپرم‌ها را در برابرآسیب‌های اکسیداتیو محافظت کند که احتمالا یکی از دلایل این بهبود می‌تواند مهار تولید بیش ازحد رادیکال‌های آزاد به‌خصوص ROS توسط عصاره‌ی این گیاه باشد. یک ارتباط قوی بین تولید ROS و کاهش تحرک اسپرم وجود دارد به‌طوری‌که مشخص شده است هیدروژن پراکسید می‌تواند در سراسر غشای اسپرم پخش شده و فعالیت برخی آنزیم‌های حیاتی مانند آنزیم گلوگز-۶ فسفات دهیدروژناز را مهار کند. این آنزیم با کنترل غلظت گلوگز از طریق منحرف کردن مسیر هگزوز مونوفسفات و کنترل فعالیت نقش اساسی در تولید ATP و تحرک اسپرم دارد (۴۶). نتایج تحرک کل و پیشرونده‌ی اسپرم تحقیق حاضر در سطوح ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در میزان تحرک کل اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد ذوب شدند. افزودن عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب به رقیق کننده، توانست با محافظت ساختمان غشاء اسپرم‌ها زنده‌مانی و یک‌پارچگی غشای پلاسمایی آن‌ها را نسبت به گروه شاهد بهبود ببخشد، نتایج نشان داد که سطوح ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در میزان یک‌پارچگی غشای پلاسمایی و سطح ۰/۵۰ میلی لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد-ذوب شدند. یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم یک شرط لازم برای حفظ عملکردهای اسپرماتوزوا در طول ذخیره‌سازی در مجرای تناسلی ماده و نفوذ از لایه پری ویتیلین تخمک است. گسیختگی یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم ناشی از ژولیدگی و به‌هم ریختگی آرایش لیپیدها در داخل غشا در طول حفظ انجماد منی ممکن است آسیب‌های سلولی بیشتری را القا کرده و در نتیجه منجر به مرگ سلول اسپرم شود (۴۷). علاوه بر این، اسپرم قوچ نسبت به تغییرات دمایی حساس بوده و به‌راحتی در طی حفظ انجماد منی آسیب می‌بینند. غشای پلاسمایی اغلب به‌عنوان بخش اولیه که در آن آسیب در سلول‌ها آغاز می‌شود، در نظر گرفته شده است. مطالعات پیشین حاکی از آن است که ترکیبات فنولیک (مخصوصا فلاونوئیدها) قادرند با پوشش دادن لیپیدها روند پراکسیداسیون لیپیدی را تغییر داده و متوقف کرده و باکاهش 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 (۴۸). بررسی نتایج درصد کل اسپرم ناهنجار ریخت شناسی) که این امر به ژنتیک حیوان مرتبط است و بیشتر ناهنجاری‌های اسپرم در مرحله اسپرماتوژنسیز رخ می‌دهد. شاید نوع روش انجماد به دلیل ایجاد شوک سرمایی نیز منجر به بعضی ناهنجاری‌ها در اسپرم شود. نتایج این آزمایش نشان داد که سطح ۰/۵۰ میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در کاهش میزان اسپرم‌های با ریخت شناسی غیرطبیعی بعد از فرآیند انجماد-ذوب شد. اثرات مثبت عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب نه‌تنها در خصوصیات تحرک اسپرم بلکه در زنده‌مانی، یک‌پارچگی غشا و کاهش میزان اسپرم‌های با ریخت شناسی غیرطبیعی قابل مشاهده بود که می‌توان دلیل آن‌را داشتن ترکیب‌های فنولیک متعدد در گیاه دانست، که اسپرم‌ها را از آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو محفوظ می‌دارند. در این مطالعه افزودن سطوح بالاتری ازعصاره، اثرات مفید

کمتری روی هرکدام از فراسنجه‌ها داشته که می‌تواند ناشی از تغییرات اسمزی، pH و بهم خوردن تعادل ترکیبات رقیق‌کننده در سطوح بالاتر عصاره باشد. همچنین افزودن سطوح بالای عصاره، با مهار بیش ازحد فعالیت آنزیم‌های دخیل در اکسیداسیون و احیا و به‌همزدن تعادل بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی و تولید رادیکال‌های آزاد در محیط اسپرم‌ها را به‌همزده و باعث کاهش عملکردهای اسپرم می‌شوند (۴۹).

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن ۰/۰۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ی دانه‌ی خرنوب به رقیق‌کننده بر پایه‌ی تریس-زرده‌ی تخم‌مرغ برای فریز و یخ‌گشایی اسپرم در قوچ نژاد فراهانی احتمالا می‌تواند مفید باشد و در غلظت‌های مختلف و شرایط متفاوت برای تحقیق در آینده توصیه می‌شود.

منابع

1. Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell Tissue Bank. 2009; 10(1):42-69.
2. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased inbovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Mol Reprod Dev. 2000; 55(3):282–288.
3. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet med int. 2011; 686137: 1-7.
4. Zhao HW, Li Qw, Ning GZ, Han ZS, et al. Rhodiola sacra aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen Theriogenology. 2008; 71(5):849-57.
5. Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser Publication. Tehran. 1996.
6. Gohar A, Gedara SR, Baraka HN. New acylated flavonol glycoside from *Ceratonia siliqua L*. seed. J Med Plan Res. 2009; 3(5): 424-8.
7. Mohamed D, Helal A, Hamed I, Hosein H, et al. Ceratonia siliqua pods as a cheap source of functional food components. Dtsch Lebensmitt Rundsch. 2008; 104(1): 25-29.
8. Ortiz LT, Rodriguez ML, Alzueta C, Rebole A, et al. Effect of carob seed (*Ceratonia siliqua L*) in broiler chick diet on nutrient digestibility and intestinal viscosity. EAAP publication no.110, Toledo, Spain, Wageningen academic publishers. 2004; 239-242.
9. Duke J. Phytochemical and ethnobotanical databases Ceratonia siliqua, Green farmacy garden 8210 Murpht road fulton, MD 20759. Agricultural research service, Beltsville area*:* http://www.Aragrin. Gov/duke/Ceratonia siliqua information from NPGS/GRIN. 2009.
10. Yang HS, Han DK, Kim JR, Sim JC. Effects of alpha-tocopherol on cadmium-induced toxicity in rat testis and spermatogenesis. J Korean Med Sci. 2006; 21(3): 445-51.
11. Owen RW, Haubner R, Hull WE, Erben G, et al. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. Food Chem Toxicol. 2003; 41(12): 1727-38.

12. Smith HAE. Biochemical studies on some flavonoides, essential oils and saponins extracted from medical plants. PhD, Thesis. Faculty of Agriculture-Cairo University. 2007.
13. Vafaee Mamghani N. Health Guide to Plants, 2th Ed. Tabriz: Amidi Publications; 2014.
14. Mokhtari M, Sharifi E, Azadian SH. The effects of hydro alcoholic extract of*Ceratonia siliqua L*seeds on pituitary–testis hormones and spermatogenesis in rat. Adv Environ Biol. 2012; 6(10): 2778-2783.
15. NRC. Nutrient Requirements of Sheep. National Research Council, Academy Press, USA. 1985.
16. Mamooi M. Artificial insemination of sheep and goats. Ahvaz Univ. Press. 2000.
17. Naijian HR, Kohram H, Zare Shahneh A, Sharafi M. Effects of various concentrations of BSA on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process. Small Rumin Res. 2013; 113(2): 371-375.
18. Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB, Sakinand F, et al. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircusancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. Small Rumin Res. 2010; 89: 24-30.
19. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJ. The hypoosmotic swelling test: an update. Arch Androl. 1992; 29(2): 105- 116.
20. Garcia-Artiga C. Test de endosmosis en ovino. In: 7th international meeting on animal reproduction. Murcia. Spain. 1994; PP: 77-81.
21. Schafer S, Holzmann A. The use oftransmigration and spermac stain to evaluateepididymal cat spermatozoa. Anim Reprod Sci. 2000; 59(3-4): 201-211.
22. Evans G, Maxwell WMC, Salamons S. Artificial insemination of sheep and goats. Butterworths. 1987; No.Ed. 2 pp.xi + 194 pp.
23. Lotfipour S, Arnold MM, Hogenkamp DJ, Gee KW, et al.The monoamine oxidase (MAO) inhibitor tranylcypromine enhances nicotine self-administration in rats through a mechanism independent of MAO inhibition. Neuropharmacology. 2011; 61(1-2):95-104.
24. Amini Rad O, Khalili MA, Soltani Gord Faramarzi HR. Influence of pomegranate juice on sperm parameters and fertility in mice Hormozgan Med J. 2009;13(3):182-188.
25. Riasi A, Baghshahi H, Mahdavi AH, Shirazi A. Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. Cryobiology. 2014; 69(3): 482–487.
26. Daghighkia H, Shahbaz zadeh R, Ashrafi I. Antioxidant effect of Macrantha Satureja extraction on microscopic and biochemical parameters of bull sperm after freeze -thawing process. Anim Sci J. 2016; 108(28); 101-113
27. Farhadi R, Daghigh Kia H, Ashrafi I. The Effect of Salvia Sahendica Ethanolic Extract as Natural Antioxidant on Quality Parameters of Cryopreserved Holstein Bull Sperm. Rap. 2016; 6 (12):79-86.
28. Vahedi V, Hedayat Evrigh N. Improvement in frozen-thawed ram sperm quality parameters by adding Mentha piperita L. extract in extender. J ANIM Environ. 2019; 11(1): 83-90.

29. Rostami S, Beigi Nassiri MT, Nazari M, Tabatabaei Vakili. The effect of different levels of soybean lecithin on semen quality and sex ratio of Holstien bull sperm by Real-time qPCR technique. Cell Tissue. 2019; 10(3): 133-142.
30. Breque C, Surai P, Brillard JP. Roles of antioxidants on prolonged storage avian spermatozoa in vivo and in vitro. Mol Reprod Dev. 2003; 66(3): 314–323.
31. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E antioxidant andnothing more. Free Radic Biol Med. 2007; 43(1): 4-15.
32. Mahan LK, Escott-Stump S, Raymond JL, KrauseMV. Krause's food & the nutrition care process.13th ed. St. Louis, Mo. Elsevier/Saunders. 2012.
33. Gurel A, Coskun O, Armutcu F, Kanter M, et al. Vitamin E against oxidative damage causedby formaldehyde in frontal cortex and hippocampus:biochemical and histological studies. J Chem Neuroanat. 2005; 29(3): 173-8.
34. Nouri M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, Shahnazi V,et al. Vitamins C, E and lipid peroxidationlevels in sperm and seminal plasma ofasthenoteratozoospermic and normozoospermicmen. International J Reprod BioMed. 2008; 6(1): 1-5.
35. Yoganathan T, Eskild W, Hansson V. Investigationof detoxification capacity of rat testicular germcells and sertoli cells. Free Radic Biol Med. 1989; 7(4): 355-9.
36. Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E: protectiverole of a Janus molecule. FASEB J. 2001; 15(13): 2314-25.
37. Mardones P, Strobel P, Miranda S, Leighton F, et al.Tocopherol metabolism is abnormal in scavenger receptor class B type I (SR-BI)-deficient mice. J Nutr. 2002; 132(3): 443-9.
38. Breinger E, Beorlegui N, Flaherty C, Beconi M. Alpha-tocopherol improvesbiochemical and dynamic parameters incryopreserved boar semen. Theriogenology. 2005; 63(8): 2126-2135.
39. Brezezinska E, Slebodzinski A, PietrasB, Wieczork G. Antioxidant effect ofvitamin E and glutatione on lipidperoxidation in boar seminal plasma. Biol. Trace Elem. Res. 1995; 47(1-3): 69-74.
40. Sabik LME, Abd El-Rahman SS. Alpha-tocopheroland ginger are protective on Cyclophosphamideinducedgonadal toxicity in adult male albino rats.Bas Appl Pathol. 2009; 2(1): 21-9.
41. Amini MR, Kohram H, Shahaneh AZ, Zhandi M, et al. The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. Cell Tissue Bank. 2015; 16(4):587-92.
42. Blesbois E, Grasseau I, Blum JC. Effects of Vitamin E on fowl semen storage at 4°C. Theriogenology. 1193; 39(3): 771-779.
43. Ahmadi S, Bashiri R, Ghadiri-Anari A, Nadjarzadeh A. Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. Int J Reprod BioMed. 2016; 14(12):729.
44. Sarlos P, Molnar A, Kokai M, Gabor G, et al. Comparative evaluation of the effectof antioxidants in the conservation of ram semen. Acta Vet Hungarica. 2002; 50(2): 235-245.

45. Parizadian Kavan B, Jafari Ahangari Y, Zerehdaran S. The effects of various levels ofvitamins E and C in milk and tris extenders on characteristics of atabay ram semen in liquidcondition. J. Agric Sci Natur Res. 2008; 15(5): 123-131.
46. Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, et al 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: Gamete Res. 1997; 47(4):468-82.
47. Holt W, North R. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. Biol Reprod. 1994; 51(3): 414-424.
48. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivationstress: A review. Ann Bot. 2003; 91(2): 179-194.
49. Roca J, Gil MA, Hernandez M, Parrilla I, et al. Survival and fertility of boarspermatozoa after freeze–thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. J. Androl. 2004; 25(3): 397–405.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Spring 2020; 11(1)

Antioxidant effect of carob seedextract (*Ceratoniasiliqua L*) on quality parameters Farahani ram sperm after freeze-thawing

Asgari M, Ph.D.[*], Khodaei Motlagh M, Ph.D.[1*], Kazemi Bonchenari M, Ph.D.[1], Vahedi V, Ph.D.[2]

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources Arak university, Arak, Iran
2. Department of Animal Science Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

* Email corresponding author: Mmotlagh2002@gmail.com

Received: 10 May. 2020 Accepted: 15 Jun. 2020

Abstract

Aim: The aim of this study was to determine the effect of Carob seedextract as natural antioxidant on quality cryopreserved Farahani rams breeding sperm.

Material and Methods: In this study semen was collected from five mature ram (weight: 60±5 kg) twice a week using an artificial vagina and the ejaculates were pooled in order to eliminate the individual effect of rams. Different levels of carob seed extracts (0, 0/05, 0/1, 0/15 and 0/2 mL) were added to diluent based tris-egg yolk. After cooling, filling and sealing of the samples, they were frozen and with nitrogen vapor and immersed in liquid nitrogen and were stored until evaluation time. Thereafter and after thawing and incubation for5 min, sperm quality parameters includingmotility, progressive motility, viability (Nigrosine–eosin staining), membrane integrity with Hypoosmotic (Host) and morphology abnormality (Hancock test).

Results: Results indicated that the level of 0/05 mL carob seedextract significantly improved some parameters including motility, viability, plasma membrane and morphology integrity compared to control (P<0.01).

Conclusion: Results indicated that so added 0/05 of carob seed extract peel to Tris based extender was beneficial in storage in sperm Farahani ram breeding after freeze-thawing.

Keywords: Seed extract, Ram, Sperm, Antioxidant