Journal of Cell and Tissue 14(2), Summer (2023) 96-106

Journal of Cell and Tissue
http://jct.araku.ac.ir

# Antioxidant effect of *Syzygium aromaticum* extract on sperm quality in Arabi ram during semen storage in liquid condition

**Tabatabaei Vakili S [a*], Zeidi R [b]**

[a] Associate professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal and Food Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Postcode: 6341773637, Iran.

[b] Ph.D. student, Department of Animal Science, Faculty of Animal and Food Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Postcode: 6341773637, Iran.

**Original Article**

Use your device to scan and read the article online

**Citation**: Tabatabaei Vakili S, Zeidi R. Antioxidant effect of Syzygium aromaticum extract on sperm quality in Arabi ram during semen storage in liquid condition. Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(2):96-106.

https://10.61186/JCT.14.2.106

## KEYWORDS

Ram
Semen storage
Sperm viability
*Syzygium aromaticum* extract

## ABSTRACT

**Aim:** The lipid compositions of mammalian plasma membrane of spermatozoa are highly sensitive to oxidative stress due to the presence of high amounts of unsaturated fatty acids. If the production of active oxygen compounds is more than the antioxidant capacity of sperm to neutralize its effects, the sperm will undergo oxidative damage, which is characterized by the reduction of qualitative and viability parameters of spermatozoa. In recent years, research has been done on the antioxidant properties of some plants and their protective role for animal spermatozoa. So, the purpose of this research was to investigate the in vitro effect of *Syzygium aromaticum* extract on the spermatozoa qualitative parameters and preservation of sperm viability under the semen storage in liquid condition.

**Material and Methods:** Semen collection was done from 8 Arabi rams weekly for 6 weeks and their semen was immediately mixed and after dilution, divided into 5 parts. The treatments included the addition of different levels of zero (control), 25, 50, 75 and 100 µg/ml of clove bud extract to the semen diluent. At zero, 24, 48, 72 and 96 hours after storage the semen samples at 5°C, the quality parameters of the spermatozoa included the motility, viability, plasma membrane integrity and morphological defect rates were evaluated.

**Results:** At zero time, spermatozoa quality parameters were not affected by the treatments ($P<0.05$). In 24 hours, the percentage of motility, viability and plasma membrane integrity of spermatozoa in 100 µg/ml of *Syzygium aromaticum* extract decreased ($P<0.05$), and lower levels of extract were ineffective on the mentioned parameters of spermatozoa compared to the control. But, after the storage of samples up to 96 hours, 25 and 50 µg/ml of extract significantly improved the percentage of motility, viability and plasma membrane integrity of spermatozoa compared to

* Corresponding author. Tel.: 061-36522438; Fax: 061-36522438
E-mail address: tabatabaei@asnrukh.ac.ir
DOI: : https://10.61186/JCT.14.2.96
Received: 14 Jan. 2023; Received in revised form: 23 Mar. 2023; Accepted: 7 Jun. 2023
*Original Article*
© Author

the control (P<0.05). There was no significant difference in the percentage of spermatozoa morphological abnormalities among the treatments (P<0.05).

**Conclusion:** In general, adding 25 µg/ml of *Syzygium aromaticum* extract to semen diluent of Arabian ram improved the motility, viability and plasma membrane integrity of spermatozoa as well as maintain their viability during the storage of semen under 5˚C.

سلول و بافت، دوره ۱۴، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲، صفحات ۹۶ تا ۱۰۶

سلول و بافت

# تاثیر آنتی‌اکسیدانتی عصاره گیاه میخک (*Syzygium aromaticum*) بر کیفیت اسپرم قوچ عربی طی نگه‌داری منی به حالت مایع

صالح طباطبائی وکیلی[1*]، رقیه زیدی[2]

[1] دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

[2] گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

**واژگان کلیدی**

زنده‌مانی اسپرم
عصاره میخک
قوچ
نگه‌داری منی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۱/۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۷

**چکیده**

**هدف:** ترکیبات لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم پستانداران، به‌دلیل وجود مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع، به‌شدت نسبت به تنش اکسیداتیو حساس هستند. در سال‌های اخیر، در خصوص خواص آنتی‌اکسیدانتی برخی گیاهان و نقش حفاظتی آن‌ها برای اسپرم‌های حیوانات تحقیقاتی صورت گرفته است. لذا پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر برون‌تنی عصاره میخک بر فراسنجه‌های کیفی و حفظ حیات اسپرم‌ها تحت شرایط نگه‌داری منی به حالت مایع انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** اسپرم‌گیری از ۸ راس قوچ عربی به‌طور هفتگی به‌مدت ۶ هفته انجام شد و منی مخلوط آن‌ها پس از رقیق‌سازی، به ۵ قسمت تقسیم شد. تیمارها شامل افزودن سطوح صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره جوانه میخک به منی رقیق شده قوچ عربی بود. در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از نگه‌داری تیمارها در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد، فراسنجه‌های کیفی اسپرم‌ها ارزیابی شدند.

**نتایج:** در زمان صفر، فراسنجه‌های کیفی اسپرم‌ها تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفتند. در زمان ۲۴ ساعت، درصد تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها در تیمار ۱۰۰ میکروگرم عصاره میخک کاهش یافتند ($P<0/05$). با سپری شدن زمان تا ۹۶ ساعت، غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم عصاره میخک سبب بهبود درصد تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها شدند ($P<0/05$). تفاوت میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم‌ها در بین تیمارها معنی‌دار نشد.

**نتیجه‌گیری:** به‌طور کلی، افزودن ۲۵ میکروگرم عصاره میخک به‌هر میلی‌لیتر رقیق کننده منی قوچ عربی سبب بهبود تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها طی نگه‌داری منی تحت دمای ۵ درجه سانتی‌گراد شد.

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۶۱-۳۶۵۲۲۴۳۸ فکس: ۰۶۱-۳۶۵۲۲۴۳۸

آدرس پست الکترونیک: tabatabaei@asnrukh.ac.ir

## ۱- مقدمه

عوامل متعددی در کاهش کیفیت و به دنبال آن باروری اسپرم به هنگام ذخیره برون تنی منی نقش دارند که یکی از مهم‌ترین مواردی که همواره مورد توجه بوده است، تغییرات غیرقابل برگشت غشای فسفولیپیدی اسپرم در اثر پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است (۱). گزارش شده است که در فرآیند سردسازی اسپرم مشکل عمده‌ای که رخ می‌دهد، آسیب به غشای پلاسمایی اسپرم در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد (۲). اسپرمی که به لحاظ عمل‌کردی طبیعی است، سطوح پایینی از رادیکال‌های آزاد یعنی گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر Reactive oxygen species (ROS) را تولید می‌کند، اما در اثر فرآیندهای سرد-سازی، افزایش ROS اتفاق می‌افتد که در نهایت منجر به بروز تنش اکسیداتیو در سلول می‌شود. ساز و کارهای متفاوتی برای مهار تنش اکسیداتیو و کاهش آسیب‌های ناشی از انواع گونه‌های فعال اکسیژن وجود دارد که یکی از آن‌ها بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانتی در منی است. غشای پلاسمایی اسپرم دارای مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع با چند باند دوگانه است که از این لحاظ آن‌ها را به آسیب‌های پراکسیداتیو بسیار حساس می‌کند. این آسیب‌های پراکسیداتیو موجب کاهش یکپارچگی غشا، آسیب به عمل‌کرد سلول، کاهش جنبایی و نهایتا کاهش کیفیت و توانایی باروری اسپرم می‌شود. بنابراین، برای جلوگیری از آسیب‌های پراکسیداسیون، به‌ویژه هنگام نگه‌داری منی، استفاده از آنتی اکسیدانت‌ها مفید به‌نظر می‌رسد (۳). آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌توانند با کنترل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش پراکسیداسیون اسیدهای چرب باعث بهبود کیفیت اسپرم شوند. با افزودن آنتی‌اکسیدانت‌ها به اسپرم رقیق شده، اکسیداسیون اسیدهای چرب و به‌دنبال آن آسیب‌های وارده به اسپرم کاهش می‌یابد (۴).

میخک با نام علمی *Syzygium aromaticum* و با نام انگلیسی clove گیاهی است که برگ‌های آن همیشه سبز و دائمی بوده و درختی با اندازه متوسط ۸ تا ۱۱ متر از خانواده بومی Mirtaceae از جزیره مالاکا در شرق اندونزی است. میخک نشان دهنده یکی از منابع مهم گیاهی از ترکیبات فنلی همچون فلاوونوئیدها، اسیدهای هیدروکسی بنزوئیک، اسید هیدروکسی سینامیک و پروپن هیدروکسی فنیل است. از اسیدهای فنلی، گالیک اسید و کافئیک اسید بیشترین مقدار را دارند. از میان فلاوونوئیدها، کوئرستین، کاتچین و کامفرول بیشترین مقادیر را به‌خود اختصاص می‌دهند و از روغن‌های فرار، ترکیبات اوژنول، کارواکرول، تیمول، و منتول را می‌توان نام برد. امروزه، گزارش‌های بسیاری از تایید خواص آنتی‌اکسیدانتی میخک به‌دلیل قدرت حفاظتی آن از تثبیت رادیکال‌های آزاد وجود دارد (۵). از گیاه میخک در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلفی استفاده شده است. میخک به‌عنوان گیاه محرک جنسی شناخته شده و از آن برای درمان اختلالات تولید مثلی نرها استفاده می‌شود. در تحقیقی، درمان با گیاه میخک سبب بهبود فعالیت‌های جنسی موش‌های نر آزمایشگاهی شد (۶). در مطالعه دیگر، میخک علاوه بر افزایش میل جنسی موش‌های نر بالغ، در فراسنجه‌های اسپرم از جمله افزایش تحرک اسپرم‌ها نیز تاثیر داشت (۷).

اسپرم از ساز و کارهای آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی و غیرآنزیمی برای مقابله با اثرات مخرب پراکسیداسیون لیپیدی و رادیکال‌های آزاد برخوردار هستند، اما مقدار آن کافی نبوده و افزودن آنتی‌اکسیدانت‌هایی با منشا خارجی به‌عنوان یک ساز و کار دفاعی خارجی مفید به‌نظر می‌رسد (۸).

با توجه به این‌که دستیابی به رقیق‌کننده‌های مناسب به‌منظور نگه‌داری منی قوچ به‌صورت مایع ضروری می‌باشد، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر سطوح مختلف عصاره گیاه میخک به‌صورت افزودنی به منی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی تحت شرایط برون‌تنی با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانتی آن انجام گرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در ایستگاه دامپروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در شهر ملاثانی، ۳۶ کیلومتری شمال شرقی اهواز طی فصل تولیدمثل گوسفند یعنی پاییز انجام شد. برای این منظور، تعداد ۸ رأس قوچ عربی سالم با متوسط سن حدود ۲/۵ سال استفاده شدند. این قوچ‌ها در یک جایگاه مسقف نیمه باز مجزا در نزدیکی جایگاه میش‌ها نگه‌داری می‌شدند. جیره نگه‌داری قوچ‌ها شامل یونجه خشک (۴۰ درصد)، کاه گندم (۲۰ درصد)، ذرت (۲۶ درصد)، سبوس گندم (۱۳ درصد)،

نمک (۰/۵ درصد) و افزودنی معدنی (۰/۵ درصد) با انرژی قابل متابولیسم ۲/۴۰ مگاکالری در کیلوگرم، ۱۵/۳ درصد پروتئین، ۰/۸ درصد کلسیم و ۰/۷ درصد فسفر بود که به‌صورت آزاد در اختیار دام‌ها قرار داشت. اسپرم‌گیری از قوچ‌ها با دستگاه الکترواجاکولیتور (Ogawa Seiki Co Ltd, Japan) به‌طور هفتگی و به‌مدت ۶ هفته انجام گرفت. منی جمع‌آوری شده از دام‌ها، به‌منظور از بین بردن اثرات فردی بلافاصله با هم مخلوط شده و پس از رقیق‌سازی بر پایه تریس به نسبت ۱ به ۱۰ (یک قسمت منی در ۱۰ قسمت رقیق کننده) (جدول ۱)، به ۵ قسمت تقسیم و غلظت‌های مختلف عصاره جوانه میخک شامل صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر منی رقیق شده را دریافت کردند. نمونه‌های منی مربوط به هر تیمار، در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از نگه‌داری به‌حالت مایع در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد، تحت ارزیابی فراسنجه‌های کیفی اسپرم‌ها شامل درصد تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی قرار گرفتند.

جدول ۱: اجزا و مقدار رقیق‌کننده تریس برای منی قوچ

| | |
|---|---|
| تریس (هیدروکسی متیل آمینومتان) (گرم) | ۳/۶۳ |
| فروکتوز (گرم) | ۰/۵ |
| اسیدسیتریک (منوهیدرات) (گرم) | ۱/۹۹ |
| زرده تخم‌مرغ (میلی‌لیتر) | ۱۴ |
| آب مقطر (میلی‌لیتر) | ۱۰۰ |

جهت بررسی درصد تحرک اسپرم، از سیستم کاسا (CASA, Video Test Sperm 2.1, Ltd, Russia) و برای ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم از رنگ‌آمیزی توسط محلول ائوزین و نیگروزین با حل کردن ۱/۶۷ گرم ائوزین Y (مرک آلمان، کد محصول ۱۱۵۹۳۵)، ۱۰ گرم نیگروزین (مرک آلمان، کد محصول ۱۱۵۹۲۴) و ۲/۹ سیترات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. بدین صورت که بر روی یک لام گرم، قطره‌ای از نمونه منی به‌همراه ترکیب رنگ مذکور قرار داده و پس از تهیه گسترش و خشک شدن در مجاورت هوا، درصد اسپرم‌های زنده تحت بزرگ‌نمایی ×۱۰۰۰ میکروسکوپ نوری و با استفاده از روغن ایمرسیون تعیین شد. رنگ ائوزین از غشای پلاسمایی اسپرم‌های زنده عبور نکرده و سر آن‌ها بدون رنگ می‌مانند. در حالی‌که ائوزین از غشای اسپرم‌های مرده عبور کرده و سر آن‌ها صورتی رنگ می‌شود (۹).

بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها توسط آزمون HOST (Hypo osmotic swelling test) و با استفاده از محلول هیپواسموتیک انجام شد. واکنش اسپرم‌ها به محیط هیپواسمول (شامل ۹ گرم در لیتر فروکتوز و ۴/۹ گرم در لیتر سیترات سدیم) به‌صورت تورم دم یا دم پیچ خورده است. در این‌حالت اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالمی دارند، به محلول واکنش نشان می‌دهند ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر نمونه منی با ۱۰۰ میکرولیتر محیط هیپواسموتیک مخلوط و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از تهیه گسترش بر روی لام، با استفاده از میکروسکوپ نوری تحت بزرگنمایی ×۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفت (۱۰).

داده‌های حاصل از این تحقیق، در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS (ویرایش ۲۰) مورد آنالیز قرار گرفت. برای بررسی کیفیت اسپرم در هر کدام از زمان‌های مورد مطالعه، از تحلیل واریانس یک‌طرفه (One wayANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها، از آزمون مقایسه‌ای چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

مدل آماری طرح به‌صورت زیر می‌باشد:

$$Y_{ij} = \mu + T_{ij} + E_{ij}$$

$Y_{ij}$: مشاهدات مربوط به صفات

$\mu$ : میانگین کل مشاهدات

$T_i$: اثر تیمار

$E_{ij}$ : اثر خطا

## ۳- نتایج

نتایج تاثیر افزودن سطوح مختلف عصاره گیاه میخک به منی قوچ عربی بر درصد تحرک اسپرم‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. در زمان صفر (بلافاصله پس از اسپرم‌گیری و افزودن عصاره)، تحرک اسپرم‌ها تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. در حالی‌که با افزایش مدت نگه‌داری منی، تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره سبب بهبود معنی‌دار تحرک اسپرم‌ها شدند (P< ۰/۰۵). تیمارهای آزمایشی تاثیر معنی‌داری بر درصد زنده‌مانی اسپرم در زمان صفر نداشتند. این در حالی است که ۲۴ ساعت پس از نگه‌داری منی، سطح ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره میخک کمترین زنده‌مانی اسپرم را داشت. (۰/۰۵ >P). با گذشت مدت ذخیره اسپرم تا رسیدن به زمان ۹۶ ساعت، بیشترین درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها در سطوح ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره میخک و کمترین آن مربوط به شاهد و غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره بود (P<۰/۰۵) (جدول ۳).

جدول ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره میخک بر درصد تحرک اسپرم قوچ عربی طی نگه‌داری منی به حالت مایع

| غلظت‌های عصاره (میکروگرم در میلی‌لیتر) | زمان ذخیره‌سازی (ساعت) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ۰ | ۲۴ | ۴۸ | ۷۲ | ۹۶ |
| ۰ | ۸۶/۸۸ | ۶۹/۷۳$^{a}$ | ۵۰/۶۵$^{ab}$ | ۱۹/۱۸$^{b}$ | ۱۱/۷۰$^{b}$ |
| ۲۵ | ۸۶/۸۰ | ۸۱/۲۵$^{a}$ | ۷۲/۵۰$^{a}$ | ۵۸/۷۵$^{a}$ | ۳۰/۰۰$^{a}$ |
| ۵۰ | ۸۰/۳۳ | ۷۲/۵۰$^{a}$ | ۶۸/۷۵$^{a}$ | ۶۲/۲۵$^{a}$ | ۳۶/۲۵$^{a}$ |
| ۷۵ | ۷۲/۵۰ | ۳۸/۷۵$^{b}$ | ۳۱/۲۵$^{b}$ | ۲۷/۲۵$^{b}$ | ۱۵/۰۰$^{b}$ |
| ۱۰۰ | ۶۹/۶۷ | ۳۷/۸۸$^{b}$ | ۲۵/۰۰$^{b}$ | ۱۳/۰۰$^{b}$ | ۶/۵۰$^{b}$ |
| SEM | ۳/۳۴ | ۵/۷۱ | ۵/۵۵ | ۵/۱۴ | ۳/۰۹ |
| P-value | ۰/۱۵۴ | ۰/۰۲۷ | ۰/۰۱۷ | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۴ |

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها؛ $^{a-b}$ تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵)

جدول ۳: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره میخک بر درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ عربی طی نگه‌داری منی به حالت مایع

| غلظت‌های عصاره (میکروگرم در میلی‌لیتر) | زمان ذخیره‌سازی (ساعت) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ۰ | ۲۴ | ۴۸ | ۷۲ | ۹۶ |
| ۰ | ۸۹/۷۵ | ۸۰/۵۰$^{a}$ | ۵۸/۷۵$^{bc}$ | ۳۳/۷۵$^{bc}$ | ۱۶/۷۵$^{c}$ |
| ۲۵ | ۸۸/۳۳ | ۸۷/۵۰$^{a}$ | ۸۱/۲۵$^{a}$ | ۶۶/۲۵$^{a}$ | ۵۱/۲۵$^{a}$ |
| ۵۰ | ۸۲/۰۰ | ۸۳/۲۵$^{a}$ | ۷۶/۲۵$^{ab}$ | ۶۷/۰۰$^{a}$ | ۵۰/۵۰$^{a}$ |
| ۷۵ | ۷۵/۰۰ | ۷۱/۲۵$^{ab}$ | ۴۸/۷۵$^{c}$ | ۴۵/۵۰$^{b}$ | ۴۰/۰۰$^{b}$ |
| ۱۰۰ | ۷۴/۳۳ | ۵۸/۷۵$^{b}$ | ۴۱/۲۵$^{c}$ | ۳۰/۰۰$^{c}$ | ۲۳/۲۵$^{c}$ |
| SEM | ۳/۳۱ | ۳/۱۸ | ۴/۳۴ | ۴/۰۵ | ۳/۴۸ |
| P-value | ۰/۱۸۷ | ۰/۰۱۶ | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۰۱ |

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها؛ $^{a-c}$ تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵)

در جدول ۴، نتایج افزودن عصاره میخک به منی بر درصد اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم مشاهده می‌شود. در زمان صفر ارزیابی، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی یافت نشد. در زمان ۲۴ ساعت، کمترین درصد سلامت غشای پلاسمایی اسپرم متعلق به بالاترین سطح عصاره میخک (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بود. ۴۸ ساعت پس از نگه‌داری منی، تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره موجب بهبود سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها در مقایسه با شاهد و دیگر سطوح عصاره شدند ($p< ۰/۰۵$). در زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت از نگه‌داری منی، بیشترین و کمترین درصد اسپرم‌های با سلامت غشای پلاسمایی سالم به ترتیب مربوط به غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره میخک و شاهد بودند ($P< ۰/۰۵$). در هیچ‌کدام از زمان‌های مورد مطالعه، سطوح بکار رفته عصاره میخک تاثیر معنی‌داری بر درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم‌ها نداشتند (جدول ۵).

جدول ۴: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره میخک بر درصد سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ عربی طی نگه‌داری منی به حالت مایع

| غلظت‌های عصاره (میکروگرم در میلی‌لیتر) | زمان ذخیره‌سازی (ساعت) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ۰ | ۲۴ | ۴۸ | ۷۲ | ۹۶ |
| ۰ | ۷۷/۰۰ | ۶۴/۲۵$^{a}$ | ۵۲/۵۰$^{b}$ | ۲۸/۷۵$^{c}$ | ۱۴/۲۵$^{c}$ |
| ۲۵ | ۷۷/۵۰ | ۷۰/۰۰$^{a}$ | ۶۳/۷۵$^{a}$ | ۴۸/۷۵$^{ab}$ | ۴۱/۲۵$^{ab}$ |
| ۵۰ | ۷۶/۲۵ | ۷۱/۲۵$^{a}$ | ۶۶/۲۵$^{a}$ | ۵۷/۵۰$^{a}$ | ۴۷/۵۰$^{a}$ |
| ۷۵ | ۷۳/۷۵ | ۶۹/۵۰$^{a}$ | ۴۳/۷۵$^{bc}$ | ۴۱/۲۵$^{bc}$ | ۳۳/۷۵$^{b}$ |
| ۱۰۰ | ۷۲/۵۰ | ۵۳/۷۵$^{b}$ | ۴۰/۵۰$^{c}$ | ۲۹/۰۰$^{c}$ | ۲۰/۰۰$^{c}$ |
| SEM | ۰/۹۷ | ۱/۸۳ | ۲/۷۵ | ۳/۰۱ | ۳/۱۹ |
| P-value | ۰/۳۹ | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۰۱ |

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها؛ $^{a-c}$ تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$)

جدول ۵: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره میخک بر درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم قوچ عربی طی نگه‌داری منی به حالت مایع

| غلظت‌های عصاره (میکروگرم در میلی‌لیتر) | زمان ذخیره‌سازی (ساعت) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ۰ | ۲۴ | ۴۸ | ۷۲ | ۹۶ |
| ۰ | ۸/۰۰ | ۱۱/۷۵ | ۱۸/۰۰ | ۲۰/۷۵ | ۲۵/۰۰ |
| ۲۵ | ۶/۵۰ | ۱۱/۰۰ | ۱۴/۲۵ | ۲۰/۵۰ | ۲۴/۷۵ |
| ۵۰ | ۷/۷۵ | ۱۱/۷۵ | ۱۶/۷۵ | ۲۱/۵۰ | ۲۵/۲۵ |
| ۷۵ | ۶/۲۵ | ۹/۰۰ | ۱۳/۷۵ | ۲۰/۰۰ | ۲۳/۵۰ |
| ۱۰۰ | ۷/۲۵ | ۱۰/۵۰ | ۱۴/۲۵ | ۱۸/۷۵ | ۲۲/۵۰ |
| SEM | ۰/۴۴ | ۰/۵۸ | ۰/۷۳ | ۱/۲۴ | ۱/۴۷ |
| P-value | ۰/۵۲ | ۰/۵۹ | ۰/۲۴ | ۰/۰۷۱ | ۰/۱۰۶ |

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها $p< ۰/۰۵$.

## ۴- بحث

جوانه میخک به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت گیاهی موثر حاوی ترکیبات فنلی (عمدتا اوژنول) شناخته شده است. در یک سنجش آزمایشگاهی، نشان داده شد که اوژنول باعث کاهش پراکسیداسیون و افزایش گلوتاتیون و ال-آسکوربات در سلول‌های موش می‌شود (۱۱).

پژوهش حاضر نشان داد که افزودن سطوح کمتر عصاره میخک یعنی ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر منی رقیق شده قوچ عربی، سبب بهبود تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها پس از نگه‌داری منی تحت دمای ۵ درجه سانتی‌گراد شد. اثرات آنتی‌اکسیدانتی ترکیبات پلی‌فنولیک گیاهان که نقش مهمی در محافظت از ساختار لیپیدی اسپرم‌ها و در نتیجه حفظ تحرک و حیات اسپرم‌ها دارد، به‌طور عمده به خاصیت دهندگی الکترون آن‌ها مربوط بوده و می‌توانند با انتقال گروه هیدروکسیل از ساختمان

خود به ترکیب لیپیدها، آنها را از فرآیند پراکسیداسیون حفظ نمایند. همچنین این ترکیبات با داشتن خصوصیت شلاته کنندگی یون‌های فلزی و مهار فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو و هیدرولیتیک می‌توانند فعالیت جذب یا مهار رادیکال‌های آزاد را از خود نشان دهد (۱۲).

تحقیقات نشان داده‌اند که گیاه میخک نه تنها برای درمان اختلالات جنسی در نرها موثر است، بلکه بر فیزیولوژی عمل‌کردی سیستم تولیدمثلی از جمله تحرک اسپرم نیز تاثیرگذار می‌باشد (۱۴ و ۱۳). با تزریق عصاره میخک به بیضه موش رت، تحرک اسپرم افزایش یافت (۱۵). در مطالعه دیگر، اثرات تولیدمثلی جوانه میخک به‌صورت مصرف خوراکی با مقادیر ۱۵، ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن در موش‌های رت بررسی شد. نتایج وابسته به دوز بود، به طوری که سطح پایین آن (۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) سبب افزایش تحرک اسپرم شده و فعالیت ترشحی اپی‌دیدیم و غدد وزیکولی را افزایش داد. این در حالی است که سطوح دیگر آن اثر برعکس داشته و با کاهش عمل‌کرد تولیدمثلی همراه بودند (۱۳). در تحقیقی، با افزودن عصاره گیاه میخک در سطوح ۳۵، ۷۵ و ۱۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر منی قوچ‌های لری بختیاری و انجماد منی، تحرک پیشرونده و سایر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم متعاقب یخ‌گشایی، در سطوح ۳۵ و ۷۵ میکروگرم این عصاره بهبود یافتند (۱۱). با این‌حال، با استفاده از عصاره میخک در موش نر، اثرات نامطلوب تولیدمثلی نیز گزارش شده است. در این مطالعه، موش‌های نر تحت تغذیه با سطوح ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره میخک به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن در هر روز به‌مدت ۳۴ قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در حیوانات تحت درمان با دوز بالای عصاره، کاهش چشمگیر در غلظت و تحرک اسپرم و نیز کاهش غلظت تستوسترون خون مشاهده شد و در گروه‌های درمانی در مقایسه با گروه شاهد، لوله‌های منی‌ساز حاوی جمعیت کمتری از اسپرم، احتمالا به‌دلیل کاهش فعالیت اسپرم‌زایی بودند (۱۶). در پژوهش گل اندام و همکاران (۱۷). با موضوع بررسی تاثیر برون‌تنی سطوح مختلف عصاره نعنای فلفلی (خاصیت آنتی‌اکسیدانتی مشابه با میخک به لحاظ دارا بودن فلاوونوئیدها) بر فراسنجه‌های کیفی منی قوچ عربی مشخص شد که نه تنها سطوح به‌کار رفته این عصاره سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم نشدند، بلکه اثر مخربی هم داشتند. لذا، علی‌رغم این‌که امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدنت‌ها در محیط رقیق‌کننده اسپرم جهت کاهش اثرات فرآیند خنک‌سازی منی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۸)، اما کیفیت منی بسته به نوع و غلظت به‌کار رفته این ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی می‌تواند در جهت مثبت یا حتی منفی سوق پیدا کند. با افزودن غلظت‌های مختلف عصاره گیاه اسطوخودوس به منی خروس که مشابه با میخک حاوی ترکیبات فنلی است، غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آن، بهترین خاصیت حفاظتی و زنده‌مانی برای اسپرم‌ها داشت (۱۹). در جمع‌بندی این بخش از نتایج تحقیق حاضر می‌توان بیان نمود که سطوح کمتر عصاره میخک احتمالا از طریق اثر آنتی‌اکسیدانتی توانست سبب حفظ قدرت تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌های قوچ عربی طی مدت سردسازی منی شود.

در این مطالعه، سطوح ۲۵ و ۵۰ میکروگرم عصاره میخک سبب بهبود سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها پس از سپری شدن ۴۸ ساعت از نگه‌داری منی به‌حالت مایع شد. در حالی‌که ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم‌ها تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. ترکیبات فنولی به‌خصوص فلاوونوئیدها، با پوشش دادن لیپیدها، روند پراکسیداسیون لیپیدی را تغییر داده و متوقف می‌کند و نیز سبب کاهش سیالیت غشای سلول می‌شود. لذا با محدود کردن پراکسیداسیون فسفولیپیدها، از غشاهای سلولی محافظت می‌کند (۲۰). غشای پلاسمایی اسپرم در طی نگه‌داری منی و تحت شرایط دمایی سرد دچار تنش می‌شود که ممکن است سبب تغییر در عدم تقارن دو لایه فسفولیپیدی غشاء شده و وضعیت عملکردی غشای اسپرم را مختل کند (۲۱). در تحقیقی با استفاده از سطوح مختلف عصاره دانه خرنوب حاوی فلاوونوئیدها بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ فراهانی بعد از فرایند انجماد و یخ‌گشایی، نتایج نشان داد که افزودن ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره به رقیق کننده منی سبب بهبود سلامت غشای پلاسمایی و مورفولوژی اسپرم‌ها نسبت به شاهد شد (۲۲). در ارزیابی اثرات برون‌تنی روغن‌های اساسی میخک در غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر شاخص‌های کیفی اسپرم اپی‌دیدیم گاو طی ۱ و ۶ ساعت از انکوباسیون نمونه‌های منی، سلامت غشای پلاسمایی، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و نیز تحرک اسپرم‌ها تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. با این‌حال، اسپرم‌های انکوبه شده همراه با ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر روغن‌های اسانسی میخک در مدت یک ساعت، به‌طور معنی‌داری گونه‌های فعال اکسیژن را با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانتی در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی کاهش داد (۲۳).

در تحقیقی، استفاده از عصاره رزماری با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی شبیه به میخک (حاوی ترکیبات فنلی) در بز سبب بهبود درصد سلامت غشای پلاسمایی و کاهش میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم شد (۲۴). پژوهش دیگر با هدف بررسی اثر تغذیه‌ای پودر برگ گیاه مورد که مشابه با میخک دارای ماده موثره کوئرستین با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی است بر عملکرد تولیدمثلی قوچ عربی نشان داد که فراسنجه‌های کیفی اسپرم از جمله سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها به‌صورت وابسته به دوز این گیاه بهبود یافتند (۲۵). در بررسی برون‌تنی اثر آنتی‌اکسیدانتی عصاره مرزه (دارای کارواکرول و تیمول مشابه با میخک) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از فرایند انجماد- یخ‌گشایی در سطوح ۲ تا ۲۰ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر منی، مشخص شد که غلظت کمتر این عصاره (۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر) بهترین اثر حفاظتی بر سلامت اسپرم یخ‌گشایی شده داشت (۲۶). همچنین، با افزودن سطوح ۲ تا ۱۲ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره درمنه (حاوی تیمول مشابه با میخک) به منی قوچ مغانی، غلظت ۴ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره سبب بهبود ساختار غشای پلاسمایی اسپرم و زنده‌مانی آن شد (۲۷). این یافته‌ها در خصوص اثر آنتی‌اکسیدانتی گیاهان دارویی بر بهبود عملکرد اسپرم حیوانات با تاکید بر غلظت‌های کم‌تر و موثر آن موافق با نتایج مطالعه حاضر با استفاده از عصاره میخک به‌صورت برون‌تنی و تحت شرایط نگه‌داری منی به‌صورت مایع در قوچ عربی می‌باشند. در پژوهشی با تجویز درون صفاقی سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه چویر حاوی ترکیبات فنلی با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن در موش‌های صحرایی نر، بیشترین دوز عصاره سبب بهبود مورفولوژی، ساختار غشای پلاسمایی و زنده‌مانی و نیز تحرک اسپرم‌ها در مقایسه با شاهد شد (۲۸). همچنین، با افزودن سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر عصاره اتانولی پونه حاوی منتول و فلاوونوئیدهای مشابه با میخک به منی رقیق شده قوچ بلوچی و انجماد منی، سلامت غشای پلاسمایی و مورفولوژی اسپرم‌ها در بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند (۲۹). در مطالعه حاضر، بیشترین غلظت عصاره میخک به‌طور معنی‌داری سبب کاهش میزان فراسنجه‌های کیفی اسپرم در مقایسه با سطوح پایین‌تر آن شد. شاید به این دلیل باشد که غلظت بالای آنتی‌اکسیدانت‌ها ممکن است بر سیالیت غشا اثر گذاشته و سبب به‌هم خوردن تعادل غشایی رادیکال‌های آزاد شود (۱). همچنین ممکن است به علت تغییر فشار اسمزی، pH و بهم خوردن تعادل ترکیبات رقیق کننده باشد که در طی فرایند ذخیره‌سازی اسپرم بسیار حائز اهمیت بوده و در نتیجه حیات اسپرم را به مخاطره می‌اندازد (۳۰). در مجموع، سطوح کمتر عصاره میخک در پژوهش حاضر توانست درمقابل تنش‌های حاصل از نگه‌داری و سردسازی منی بر غشای پلاسمایی اسپرم قوچ عربی اثر محافظتی داشته باشد.

## ۵- نتیجه‌گیری

به‌طور کلی در مطالعه حاضر، تاثیر برون‌تنی عصاره جوانه میخک با دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانتی بر حفظ کیفیت منی قوچ عربی به‌صورت وابسته به دوز مشاهده شد. به‌طوری‌که افزودن غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره میخک به رقیق کننده منی قوچ عربی سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم و توان زنده‌مانی حیات آن‌ها طی مدت نگه‌داری نمونه‌های منی به‌صورت مایع در دمای یخچال شد.

## ۶- تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر مربوط به طرح مصوب پژوهشی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان می‌باشد که بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

## ۷- منابع

1. Shafigh H, Shakeri M, Zeinoaldini S, Kohram H, et al. Improving sperm cryopreservation of rooster by using rosemary alcoholic essential oil. J Anim Prod (J Agri). 2016; 18(3): 615-624.
2. Uysal O, Bucak MN. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. Acta Vet Brno. 2007; 76(3): 383-390.
3. Leboeuf B, Guillouet Ph, Batellier F, Bernelas D, et al. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. Theriogenol. 2003; 60(5): 867-877.

4. Long JA, Kramer M. Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. Poult Sci. 2003; 82(11): 1802-1807.

5. Khoshdouni F, Khoshdouni Z. Chemical identification of clove (Syzygium aromaticum) extract and essential oil. Sci Res Applied Biol. 2017; 7(3): 1-7.

6. Mishra RK, Singh SK. Reproductive effects of lipid soluble components of Syzygium aromaticum flower bud in male mice. J Ayurveda Integr Med. 2013; 4: 94-98.

7. Moghimian M, Abtahi-Evari SH, Shokoohi M, Amiri M, et al. Effect of Syzygium aromaticum (clove) extract on seminiferous tubules and oxidative stress after testicular torsion in adult rats. Physiol Pharmacol. 2017; 21: 343-350.

8. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet Med Int. 2011; 1-7. doi:10.4061/2011/686137.

9. Uysal O, Bucak MN. The role of different trehalose concentrations and cooling rates in freezing of ram semen. Ankara Univ Vet Fak Derg. 2009; 56: 99-103.

10. Evans G, Maxwell WMC. Handling and examination semen. In: Maxwell WMC, editor. Salamon's artificial insemination of sheep and goat. Sydney: Butterworths. 1987; 93-106.

11. Baghshahi H, Riasi A, Mahdavi AH, Shirazi A. Antioxidant effects of clove bud (Syzygium aromaticum) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. Cryobiol. 2014; 69: 482-487.

12. Alizadeh K, Moslemipour F, Bahri Binabaj F, Mojtahedin A. Study of effect of adding horsmint ethanol extract and cysteine into extender on fertility features of frozen Baluchi ram semen after thawing. J Rumin Res. 2020; 8(1): 49-62.

13. Mishra RK, Singh SK. Reproductive effects of lipid soluble components of syzygium aromaticum flower bud in male mice. J Ayurveda Integrat Med. 2013; 4: 94-98.

14. Choi D, Roh HS, Kang DW, Lee JS. The potential regressive role of syzygium aromaticum on the reproduction of male golden hamsters. Develop Reprod. 2014; 18: 57-64.

15. Memudu AE, Odetola AA, Adeleye OO, Ehebha SE. Histological, hormonal and semen quality assessment following ingestion of clove buds (Syzgium aromaticum) on the testes of adult male sprague dawley rats. J Anat Sci. 2021; 12(1):1-11.

16. Dehghani F, Heshmatpour A, Panjehshahin MR, Talaei-Khozani T. Oxic effects of water/alcoholic extract of Syzygium aromaticum on sperm quality, sex hormones and reproductive tissues in male mouse. IUFS J Biol. 2012; 71(2): 95-102.

17. Golandam Sh, Tabatabaei Vakili S, Mirzadeh Kh. In Vitro effect of different levels of peppermint (Mentha piperital) extract on semen quality parameters in Arabi ram. Exper Anim Biol. 2021; 10(1): 71-79.

18. Shariatzadeh SMA, Mohammadi M. Protective role of green tea (Camellia sinensis) hydroalcholic extract on sperm parameters and testicular tissue in NMRI mice exposed to sodium arsenite. J Birjand Uni Med Sci. 2015; 21(4): 432-443.

19. Tabatabaei Vakili S, Aghaei A, Kazemizadeh A. Effect of different concentrations of Lavandula angustifolia extract on semen quality of rooster during storage in liquid condition. Res Anim Prod. 2020; 11 (27): 74-81.

20. Daghighkia H, Sadeghi Sadegh Abad F, Ebrahimi M, Samadian F. Comparative effect of different concentrations of hydro-ethanolic extract of chamomile on freeze-thawn semen quality of rams. J Vet Clin Pathol. 2017; 11(1): 13-23.

21. Bustani GS, Baiee FH. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. Vet World. 2021; 14(5): 1220-1233.

22. Asgari M, Khodaei Motlagh M, Kazemi Bonchenari M, Vahedi V. Antioxidant effect of carob seed extract (Ceratonia siliqua L) on quality parameters Farahani ram sperm after freeze-thawing. J Cell Tissue. 2020; 11(1): 1-12.

23. Santos MVDO, da Silva AM, Praxedes ÉA, Borges AA, et al. Antioxidant effects of the essential oil of Syzygium aromaticum on bovine epididymal spermatozoa. Andrologia. 2019; 51(11): 1-8.

24. Zanganeh Z, Zhandi M, Zare Shahneh A, Najafi A, et al. Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Rumin Res. 2013; 114(1): 120-125.

25. Tabatabaei Vakili S, Mohaysenzade E, Mohammadabadi T, Zarei M. Effect of dietary Myrtus communis leaf powder on quantitative and qualitative characteristics of sperm and antioxidant function of semen and blood in Arabi ram. Vet Res Biol Prod. 2021; 33(4): 102-111.

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. 2015; 28: 101-112.

27. Ahadi H, Karimi A, Besharati M, Vahedi V, et al. Antioxidant effect of Artemisia (Artemisia incana) extract on the quality of frozen-thawed semen of Moghani ram. J Anim Environ. 2021; 13(2): 87-94.

28. Bohlouli S, Rostaminasab G. Effect of hydroalcoholic extract of Ferollago angulata on sperm and testosterone indices in male rats. J Ilam Uni Med Sci. 2019; 27(3): 47-55.

29. Alizadeh K, Moslemipour F, Bahri Binabaj F, Mojtahedin A. Study of effect of adding horsmint ethanol extract and cysteine into extender on fertility features of frozen Baluchi ram semen after thawing. J Rumin Res. 2020; 8(1): 49-62.

30. Gharagozloo M, Amirghofran Z. Effects of silymarin on the spontaneous proliferation and cell cycle of human peripheral blood leukemia T cells. J Cancer Res Clin Oncol. 2007; 133(8): 525-532.