

اثر عصاره نسترن بر پارامترهای میکروسکوپی و بیوشیمیایی و آنزیم‌های پلاسمای منی پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی

سمیرا رضویان¹ - حسین دقیق کیا^{2*} - ابوذر نجفی³ - حسین واثقی دودران³

تاریخ دریافت: 1395/04/05

تاریخ پذیرش: 1395/05/24

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی سطوح مختلف عصاره نسترن بر پارامترهای میکروسکوپی، بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی با استفاده از 5 رأس قوچ قزل انجام شد. بعد از انجام پیش‌آزمایش‌های تعیین غلظت بهینه روی اسپرم تازه و اسپرم رقیق شده، سه غلظت عصاره گیاه نسترن (میکرولیتر بر میلی‌لیتر 100، 150، 200) انتخاب و به رقیق کننده با پایه تریس-زرده تخم مرغ افزوده شد. نمونه‌های منی هفته‌ای دو بار با استفاده از مهبل مصنوعی گرفته شدند. به منظور حذف اثرات فردی نمونه‌های منی با هم مخلوط شدند. نمونه‌ها پس از فرآوری و انجماد تا زمان ارزیابی در ازت مایع نگهداری شدند. پس از یخ‌گشایی پارامترهای تحرک اسپرم، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء، ناهنجاری‌های اسپرم، پراکسیداسیون غشای لیپیدی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوکاتایون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی ارزیابی شدند. نتایج حاکی از عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میزان مالون دی‌آلدهید و مورفولوژی اسپرم تیمارهای مورد بررسی نسبت به گروه شاهد بود. درصد اسپرم‌های غیر طبیعی و مقدار پراکسیداسیون لیپید در گروه نسترن 100 در مقایسه با گروه شاهد کمترین بود ($P < 0/05$). زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء، تحرک کل و تحرک پیش‌رونده در گروه نسترن 150 از گروه شاهد بهتر بود ($P < 0/05$). پارامترهای سرعت در مسیر منحنی و تحرک عرضی سر در گروه نسترن 100 در مقایسه با گروه‌های دیگر بیشتر بود ($P < 0/05$). ارزیابی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی کاهش معنی‌داری در گروه‌های نسترن 100 و 200 نسبت به گروه شاهد نشان داد ($P < 0/05$). مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های نسترن 150 و 200 افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$).

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسپرم قوچ، انجماد-یخ‌گشایی، رقیق کننده، عصاره نسترن.

مقدمه

غشای لیپیدی و تنش اکسیداتیو می‌شود که این امر موجب مهار قدرت تحرک و نیز تغییر در فراساختار اسپرم شده و در نهایت موجب کاهش لقاح و درصد ناباروری می‌شوند (1، 2، 3، 43). پراکسیداسیون لیپیدی با ایجاد تغییرات در نوع آرایش لیپیدهای غشای اسپرم و کاهش تحرک اسپرم یک فرایند مضر و شناخته شده است (4 و 5). کنترل پراکسیداسیون لیپید در فرآیند تولید مثلی توسط مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های محافظ داخل اسپرم و پلاسمای منی اعمال می‌شود (36). پلاسمای منی دارای آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) است که نقش مهمی در بازدارندگی از اثرات مخرب ROS دارند. پراکسیداسیون لیپید سبب کاهش تحرک اسپرم می‌شود که ممکن است ناشی از عدم هماهنگی بین فعالیت SOD، GPX و CAT در پلاسمای منی و یا کمبود ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سلول باشد (38). این آنزیم‌ها به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و مهار کننده

متابولیسم هوازی اسپرم گونه‌های مختلف باعث تولید اکسیژن فعال⁴ می‌شود. این ترکیبات برای غشای پلاسمایی اسپرم که حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع است، مضر می‌باشد (11، 22 و 25). سطح فیزیولوژیک ROS برای واکنش‌های آکروزمی، افزایش تحرک و ظرفیت‌پذیری اسپرم‌ها ضروری است. غلظت‌های زیاد ROS اثر منفی بر کیفیت اسپرم داشته و باعث افزایش تخریب DNA، پراکسیداسیون

1- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز،

2- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز،

3- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

(* - نویسنده مسئول: Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

DOI: 10.22067/ijasr.v4i1.57054

4- Reactive oxygen species

این تحقیق در ایستگاه خلعت پوشان دانشگاه تبریز انجام شد. نمونه‌های منی از پنج رأس قوچ قزل با شرایط تغذیه‌ای و محیطی یکسان، با استفاده از مهبل مصنوعی و دوبار در هفته اخذ گردید. سپس نمونه‌های منی هر یک از قوچ‌ها از نظر حجم، رنگ، غلظت اولیه، تحرک، عدم آلودگی به ادرار و خون و میزان اسپرم با موفولوژی طبیعی بررسی شده و سپس نمونه‌های منی با رنگ کرمی، غلظت بیشتر از یک میلیارد اسپرم در هر میلی‌لیتر رقیق نشده، تحرک بیشتر از 70 درصد و مورفولوژی کمتر از 10 درصد اسپرم غیر طبیعی به‌عنوان منی نرمال در نظر گرفته شدند (7 و 17). در غیر این صورت، نمونه حذف گردید. به منظور حذف اثرات فردی و احتمالاً اثرات متقابل بین نمونه‌ها، نمونه‌های نرمال در مقادیر مساوی از هر قوچ با هم مخلوط شدند. در این تحقیق از رقیق‌کننده‌ای بر پایه تریس - زرده تخم مرغ (تریس 27/1 گرم در لیتر، اسید سیتریک 14 گرم در لیتر، فروکتوز 10 گرم در لیتر، زرده تخم مرغ 25 درصد، گلیسرول 7 درصد) (30) به همراه سطوح مختلف عصاره نسترن استفاده شد. آنتی‌اکسیدان گیاهی با نسبت‌های مختلف (میکرولیتر بر میلی‌لیتر 200، 150، 100، 0) به لوله‌های فالتون حاوی بافر و زرده تخم مرغ و گلیسرول افزوده شدند. لازم به توضیح است که انتخاب سطوح فوق‌الذکر پس از به دست آوردن نتایج حاصل از آزمایشات اولیه سطح سنجی انجام گرفت. نتایجی که در آن سطوح کشنده و سطوح بی‌تأثیر بدست آمدند و سپس اقدام به تعیین سطوح بین این دو محدوده گردید تا سطوح بهینه با بهترین اثرگذاری به دست آید. پس از طی مراحل سرد سازی و تعادل، نمونه‌های منی در پایوت‌های 0/25 میلی‌لیتری پر شدند. پایوت‌ها بعد از انجماد تا زمان ارزیابی در ازت مایع (196°C) نگهداری شدند.

یخ‌کشایی و ارزیابی پارامترهای اسپرم

به منظور ارزیابی نمونه‌های منی ابتدا پایوت حاوی منی در داخل حمام آب گرم (37°C) در مدت 30 ثانیه یخ‌کشایی شده و سپس محتویات پایوت در درون یک میکروتیوب 1/5 میلی‌لیتری شماره گذاری شده تخلیه کرده و سپس جهت تطابق پذیری و بازگشت آب درون سلولی به مدت 10 دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد. پس از یخ‌کشایی و انکوباسیون ویژگی‌های جنبایی (Motility) شامل تحرک کل⁴، تحرک پیش‌رونده⁵ و ویژگی‌های حرکتی شامل میانگین سرعت در مسیر⁶، سرعت در مسیر منحنی⁷، سرعت در مسیر مستقیم⁸، جنبایی عرضی سر¹، خطی بودن جنبایی²، راستی مسیر طی

پراکسیداسیون لیپید عمل می‌کنند. بنابراین آسیب اکسیداتیو تنها وابسته به تولید ROS نبوده بلکه به دفاع آنتی‌اکسیدانی اسپرم و پلاسما منی نیز بستگی دارد (20).

در مقابل اثرات پاتولوژیک رادیکال‌های آزاد، اسپرماتوزوآ و پلاسما منی دارای مجموعه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی با وزن مولکولی پایین، تحت عنوان کلی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی¹ می‌باشد. این آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان جمع‌آوری‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد جهت حفاظت اسپرماتوزوآ در برابر ROS عمل می‌کنند (8). امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به جای آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک که حاوی ترکیبات سمی سائوتوکسیک هستند بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است (26 و 42). آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی به دلیل دارا بودن فلاونوئیدها و فنول‌ها نقش مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و حفاظت از اسپرم در طی فرآیند محافظت انجمادی دارند (14).

گیاه نسترن² یکی از گونه‌های وحشی رز است که تا به حال بیش از 100 گونه آن شناخته شده است. محتوای پلی‌فنولی بالای نسترن، آن را به‌عنوان یک گیاه هدف برای مطالعه بیشتر معرفی کرده است. ترکیبات پلی‌فنولی بدلیل داشتن اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌موتازونیک و آنتی‌کارسینوژنیک شناخته شده هستند (35). کوئرستین (Quercetin)، الایژیک اسید (Ellagic acid) و کامفرول (kaempferol) شناخته شده‌ترین ترکیبات فنولی گیاه نسترن هستند. گیاه نسترن ممکن است نه تنها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان بلکه به‌عنوان یک پراکسیدان وابسته به غلظت نیز فعالیت کند (46). نسترن به دلیل داشتن مقادیر قابل توجهی از ویتامین C و مواد پلی‌فنولی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. هدف این مطالعه بررسی استفاده از سطوح مختلف عصاره گیاه نسترن به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان گیاهی برای بهبود کیفیت منی و عملکرد اسپرم قوچ قزل طی فرآیند انجماد - یخ‌کشایی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره نسترن

میوه گیاه نسترن از منطقه آذربایجان شرقی جمع‌آوری شده و عصاره اتانولی آن با روش توسلی و دیجومه³ (37) استخراج گردید. عصاره به دست آمده در 15 میکرولیتر توئین 80 درصد و 25 سی سی آب دوبار تقطیر حل شد.

جمع‌آوری و رقیق‌سازی منی

4- Total motility (TM)

5- Progressive Motility (PM)

6- Average path velocity (micron/sec)

7- Curvilinear velocity (micron/sec)

8- Straight- line velocity (micron/sec)

1- Total antioxidant capacity

2- Rosa canina

3- Tavassoli and Djomeh

تیوباربتوریتیک اسید (TBA)⁷ با MDA اندازه‌گیری شد (16). میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز نمونه‌های منی با بهره‌گیری از روش ووليامز و وارنر (41) و با استفاده از کیت Ransod شرکت رندوکس (RANDOX Laboratories Ltd., UK) مورد سنجش قرار گرفت. میزان آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بر اساس روش پاگیلا و والتین (29) و با استفاده از کیت Ransel شرکت رندوکس (RANDOX Laboratories Ltd., UK) اندازه‌گیری گردید. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسمای منی (TAC) با کمک روش میلر و همکاران (27) و با استفاده از کیت رندوکس (RANDOX Laboratories Ltd., UK) مورد سنجش قرار گرفت.

آنالیز آماری

این تحقیق با 4 تیمار و هر کدام در 5 تکرار انجام گردید. داده‌های بدست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل و براساس مدل آماری زیر و با استفاده از نرم افزار SAS (9.1.3) و با کمک رویه GLM آنالیز شدند. برای تعیین معنی‌داری اثرات آنتی‌اکسیدان از آزمون مقایسه‌ای توکی استفاده شد و اختلاف معنی‌داری در سطح 0/05 گزارش شد. اثر تیمار به‌عنوان اثر ثابت در نظر گرفته شد.

$$Y_{ij} = \mu + \text{Treat}_i + e_{ij} \quad (1)$$

در این معادله، Y_{ij} مشاهده ij ام، μ میانگین جمعیت، Treat_i اثر تیمارها و e_{ij} اثر عوامل ناشناخته ij ام می‌باشد.

نتایج

نتایج نشان می‌دهد گروه تیماری 100 میکرولیتر بر میلی‌لیتر عصاره نسترن نسبت به گروه شاهد تأثیر معنی‌داری بر تحرک کل نداشته و افزودن سطح 150 میکرولیتر بر میلی‌لیتر در گروه حاوی عصاره نسترن به رقیق کننده به طور معنی‌داری صفات تحرک کل را نسبت به گروه شاهد و گروه‌های تیماری حاوی سطوح بالاتر عصاره بهبود داد ($P < 0/05$). تحرک پیش‌رونده ناشی از استفاده از سطح تیماری 150 میکرولیتر بر میلی‌لیتر در گروه حاوی عصاره نسترن به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت ($P < 0/05$). اختلاف سایر سطوح تیماری نسبت به شاهد غیر معنی‌دار بود. نتایج مطالعه حاضر بیانگر آن است که صفات میانگین سرعت در مسیر، سرعت در مسیر مستقیم، راستی مسیر طی شده درصد خطی بودن تحرک و تناوب عرضی زنش در رقیق کننده‌های حاوی عصاره نسترن نسبت به گروه شاهد غیر معنی‌دار بود. پارامتر سرعت در مسیر منحنی در گروه‌های 150 و 100 میکرولیتر بر میلی‌لیتر افزایش معنی‌داری نشان

شده³ و تناوب عرضی زنش⁴ توسط سیستم آنالیز رایانه‌ای (CASA)⁵ مدل VT SPERM 3.1 ارزیابی گردید. روش کار به این صورت بود که 5 میکرولیتر از هر نمونه ذوب شده را برداشته و روی لام از قبل گرم شده قرار داده شد و در زیر میکروسکوپ آنالیز شد. از هر نمونه حداقل 5 فیلد به طور کاملاً تصادفی انتخاب شده و حداقل 200 اسپرم شمارش گردید.

وضعیت زنده مانی اسپرم با استفاده از روش رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین براساس روش دوگراف و همکاران (13) ارزیابی شد. بدین منظور 10 میکرولیتر از نمونه منی را با 5 میکرولیتر از رنگ، روی یک لام گرم قرار داده و به آرامی مخلوط کرده سپس با یک لام دیگر گسترش تهیه شد. گسترش تهیه شده در دمای 37°C قرار گرفته و پس از خشک شدن تعداد 200 اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست مورد بررسی قرار گرفت.

برای بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول اسپرم از تست تورم اسپرم در محیط هیپوسموتیک (HOST)⁶ بر اساس روش ریوال و مرود (31) استفاده شد. برای انجام این تست ابتدا 100 میکرولیتر از محلول هیپوسموتیک با 10 میکرولیتر از نمونه منی سانتریفیوژ شده (به مدت 10 دقیقه در 1200g) هر تیمار به آرامی مخلوط شده و به مدت 30 دقیقه در حمام آب گرم 37°C انکوبه شد. سپس 5 میکرولیتر از نمونه مخلوط شده بر روی لام از پیش هم دما شده قرار داده و توسط میکروسکوپ فاز کنتراست تعداد 200 اسپرم شمارش شد. اسپرم‌های با دم تاب خورده و متورم به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم در نظر گرفته شد و اسپرم‌های با دم صاف به‌عنوان اسپرم با غشای آسیب دیده تعیین شدند.

برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد (21). برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم 10 میکرولیتر از هر نمونه منی یخ‌گشایی شده به میکروتیوب‌های حاوی 150 میکرولیتر از محلول هانکوک افزوده شد. سپس یک قطره از این مخلوط روی لام قرار گرفته و حداقل 200 اسپرم زیر میکروسکوپ فاز کنتراست شمارش گردید. درصد اسپرم‌های طبیعی و غیر طبیعی اعم از غیر طبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیر طبیعی و آسیب‌های دم محاسبه شد.

غلظت مالون دی‌آلدهید (MDA) که به‌عنوان شاخص لپید پراکسیداسیون در نمونه‌های منی است با استفاده از واکنش

- 1- Lateral head displacement (micron)
- 2- Linearity (%) ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL} \times 100$)
- 3- Sperm track straightness (%) ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP} \times 100$)
- 4- Beat cross frequency (Hz)
- 5- Computer Assisted Sperm Analyzer
- 6- Hypo-Osmotic Swelling Test

7- Tiobarbitoretic Acid

100 میکرولیتر بر میلی‌لیتر عصاره نسترن اثر بالقوه‌ای روی پارامترهای تحرک اسپرم‌ها ایجاد کردند که می‌توان به اثر آنتی‌اکسیدانی آن پی برد (جدول 1).

داد. تحرک عرضی سر نیز در گروه تیماری 100 میکرولیتر بر میلی‌لیتر عصاره نسترن نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری بهبود یافت ($P<0/05$). نتایج حاکی از آن است که افزودن سطوح 150 و

جدول 1- تأثیر سطوح مختلف عصاره نسترن بر فراسنجه‌های تحرک اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی¹

Table 1-The effect of different levels of Rosa canina extract on sperm motility parameters after freezing-thawing process¹

| فراسنجه‌های تحرک اسپرم Sperm motility parameters | تیمارهای آزمایشی ² Treatments ² | | | | SEM | P-value |
|--|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------|---------|
| | Control | R.c 100 ($\mu\text{L mL}^{-1}$) | R.c 150 ($\mu\text{L mL}^{-1}$) | R.c 200 ($\mu\text{L mL}^{-1}$) | | |
| تحرک کل (درصد) TM (%) | 44.60 ^b | 46.75 ^b | 57.40 ^a | 41.75 ^b | 2.024 | 0.0004 |
| تحرک پیشرونده (درصد) PM (%) | 27.73 ^{bc} | 28.17 ^b | 34.56 ^a | 24.43 ^c | 1.140 | 0.0002 |
| میانگین سرعت در مسیر (میکرومتر بر ثانیه) VAP ($\mu\text{m sec}^{-1}$) | 20.82 ^a | 26.21 ^a | 24.64 ^a | 21.09 ^a | 3.050 | 0.5434 |
| سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر بر ثانیه) VSL ($\mu\text{m sec}^{-1}$) | 17.82 ^a | 21.75 ^a | 19.74 ^a | 16.15 ^a | 2.422 | 0.4578 |
| سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر بر ثانیه) VCL ($\mu\text{m sec}^{-1}$) | 50.91 ^d | 62.36 ^{bc} | 60.92 ^{bc} | 54.24 ^{cd} | 3.949 | 0.0167 |
| راستی مسیر طی شده (درصد) STR (%) | 70.93 ^a | 71.09 ^a | 70.95 ^a | 71.19 ^a | 0.018 | 0.9996 |
| تحرک عرضی سر (میکرومتر) ALH (μm) | 1.21 ^b | 1.95 ^a | 1.73 ^{ab} | 1.41 ^{ab} | 0.231 | 0.0153 |
| درصد خطی بودن تحرک (درصد) LIN (%) | 26.46 ^a | 29.51 ^a | 27.54 ^a | 28.14 ^a | 0.200 | 0.3890 |
| تناوب عرضی زنش (هرتز) BCF (Hz) | 15.08 ^a | 13.05 ^a | 15.40 ^a | 12.82 ^a | 1.607 | 0.5717 |

¹ میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($P<0/05$).

² تیمارهای آزمایشی عبارتند از گروه شاهد - عصاره نسترن (100 میکرولیتر بر میلی‌لیتر) (R.c 100 ($\mu\text{L mL}^{-1}$)) - عصاره نسترن (150 میکرولیتر بر میلی‌لیتر) (R.c 150 ($\mu\text{L mL}^{-1}$)) - عصاره نسترن (200 میکرولیتر بر میلی‌لیتر) (R.c 200 ($\mu\text{L mL}^{-1}$)).

¹ Means within same row with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

² Treatments are: control- R.c 100= Rosa canina 100 ($\mu\text{L mL}^{-1}$)- R.c 150= Rosa canina 150 ($\mu\text{L mL}^{-1}$)- R.c 200= Rosa canina 200 ($\mu\text{L mL}^{-1}$).

نتایج حاصل از ارزیابی مورفولوژی اسپرم‌ها نشان داد که افزودن سطوح ذکر شده عصاره نسترن از لحاظ آماری بر روی شکل و ساختار طبیعی اسپرم‌ها نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. اما میزان اسپرم‌های غیر طبیعی در سطوح 100 و 150 میکرولیتر بر میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد کاهش و در سطح 200 میکرولیتر بر میلی‌لیتر افزایش یافت.

نتایج حاصل از سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) نشان می‌دهد که اضافه کردن 100 میکرولیتر بر میلی‌لیتر عصاره نسترن به محیط رقیق کننده، موجب کاهش میزان MDA تولید شده گردید که این در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود. جالب توجه آن که، اضافه کردن غلظت‌های بیشتر عصاره نسترن به محیط واکنش،

نتایج نشان می‌دهد که افزودن سطح 150 میکرولیتر بر میلی‌لیتر عصاره نسترن به رقیق کننده به طور معنی‌داری باعث بهبود زنده‌مانی اسپرم‌ها بعد از یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های تیماری شد ($P<0/05$). در سطح تیماری 200 میکرولیتر بر میلی‌لیتر درصد زنده‌مانی اسپرم تمایل به کاهش داشت ($P<0/05$).

نتایج آنالیز نشان داد در نمونه‌های منی که دارای عصاره نسترن 150 میکرولیتر بر میلی‌لیتر بودند بعد از یخ‌گشایی، تعداد اسپرم‌هایی که دم‌های متورم و پیچ خورده داشتند به طور معنی‌داری بیشتر بود، بدین معنی که غشای اسپرم‌ها در برابر صدمات ناشی از انجماد به خوبی حفظ شدند ($P<0/05$). در حالی که سطح بالاتر تیمارها اثر منفی روی این صفت داشتند.

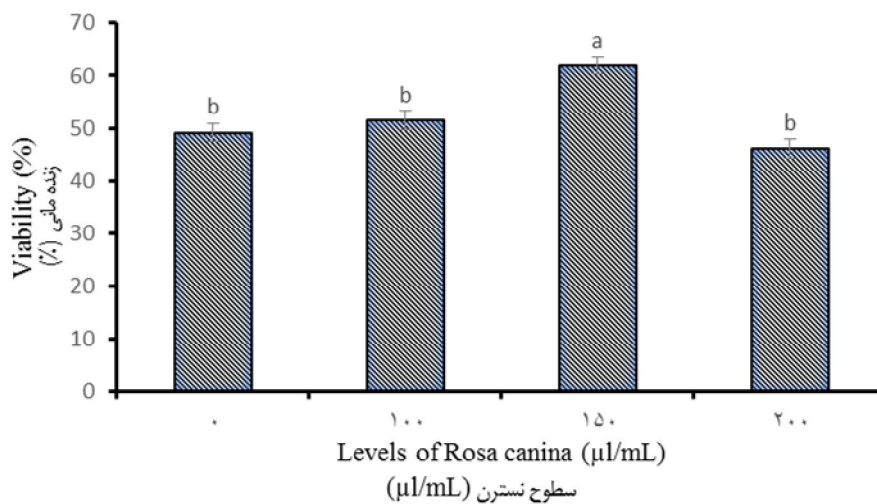
کاهش معنی داری نسبت به گروه شاهد داشت ($P < 0/05$) اما در سطح 150 میکرولیتر بر میلی لیتر میزان فعالیت آنزیمی آنتی اکسیدانی تام غیر معنی دار بود.

بحث

اسپریم به علت تغییراتی که طی انجماد و یخ‌گشایی متحمل می‌شود مستعد آسیب‌های اسمزی، مکانیکی و اکسیداتیو است. راهکاری که امروزه پیشنهاد شده است، افزودن آنتی اکسیدان‌ها به رقیق کننده منی می‌باشد تا از این آسیب‌ها جلوگیری نماید.

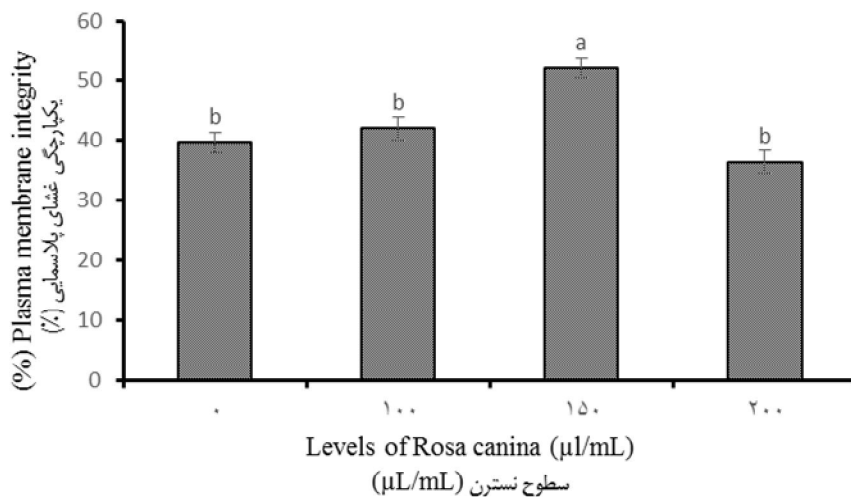
نه تنها موجب کاهش روند پراکسیداسیون لیپید نگردد بلکه موجب افزایش غلظت MDA شد به طوری که این افزایش در گروه 200 میکرولیتر بر میلی لیتر نسبت به گروه شاهد معنی دار بود.

ارزیابی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گروه‌های حاوی سطوح مختلف عصاره نسترن در شکل 5 نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های 150 و 200 میکرولیتر بر میلی لیتر نسبت به شاهد افزایش معنی داری داشت ($P < 0/05$). فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در سطح غلظت 150 میکرولیتر بر میلی لیتر تمایل به افزایش داشت؛ همچنین در سطح 100 میکرولیتر بر میلی لیتر میزان این آنزیم تمایل به کاهش داشت. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی تام در سطوح غلظت 100 و 200 میکرولیتر بر میلی لیتر



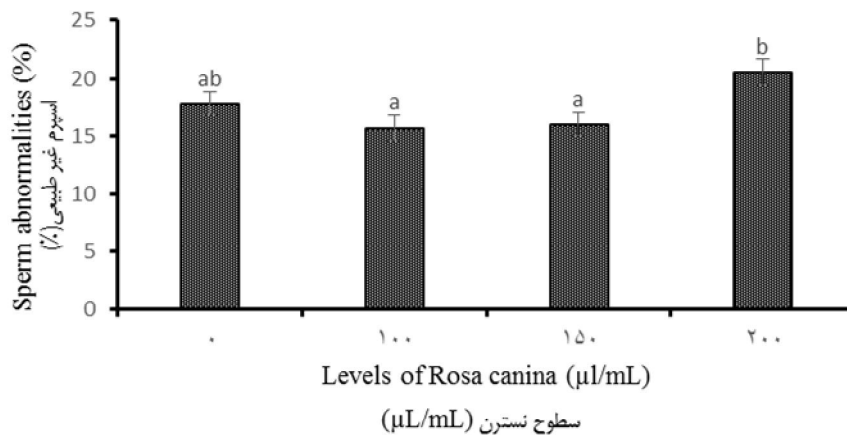
شکل 1- مقایسه میانگین فراسنجه زنده‌مانی با استفاده از سطوح مختلف تیماری عصاره نسترن

Figure 1- Comparing the mean viability parameter using different levels of Rosa canina extract



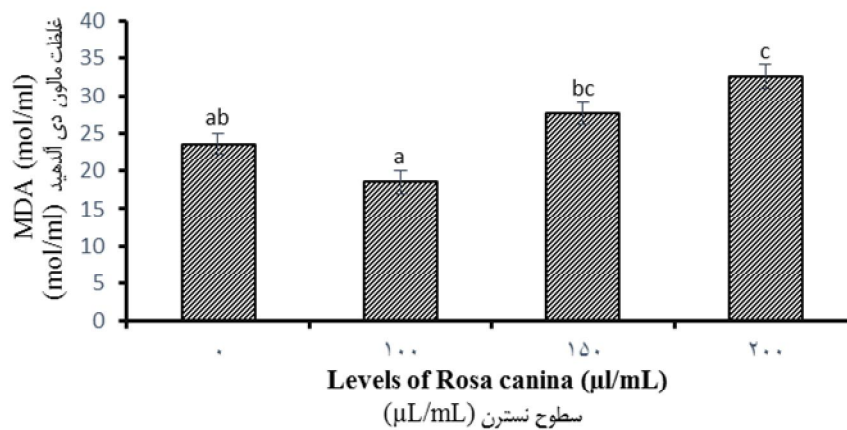
شکل 2- مقایسه میانگین فراسنجه یکپارچگی غشای پلاسمایی با استفاده از سطوح مختلف تیماری عصاره نسترن

Figure 2- Comparing the mean plasma membrane integrity parameter using different levels of Rosa canina extract



شکل 3- مقایسه میانگین فراسنجه مورفولوژی اسپرم با استفاده از سطوح مختلف تیماری عصاره نسترن

Figure 3- Comparing the mean sperm morphology parameter using different levels of Rosa canina extract

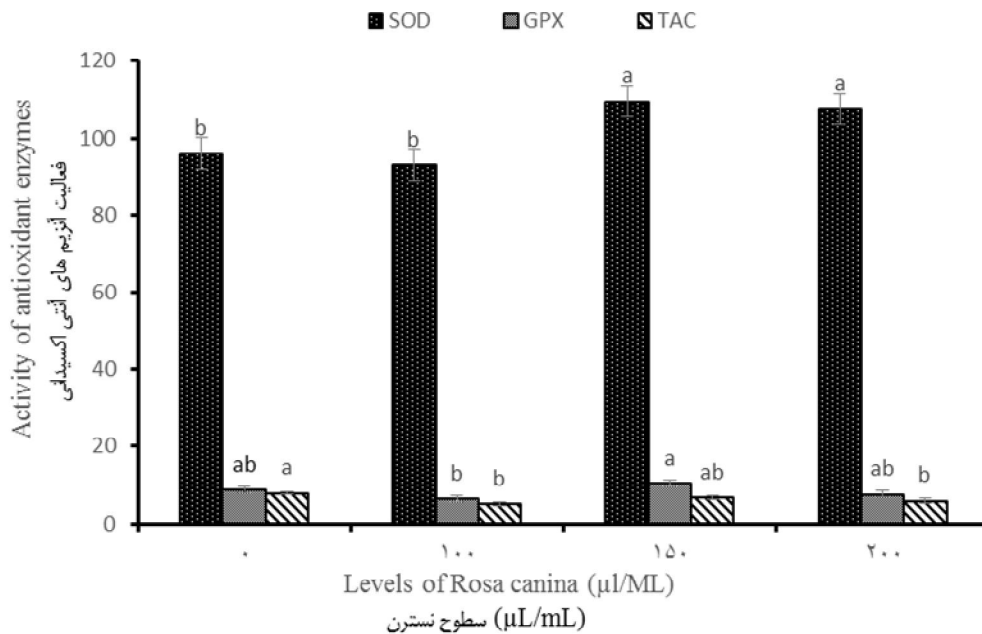


شکل 4- مقایسه میانگین فراسنجه لیپید پراکسیداسیون با استفاده از سطوح مختلف تیماری عصاره نسترن

Figure 4 - Comparing the mean Lipid peroxidation parameter using different levels of Rosa canina extract

گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشند که مکانیسم آن به این صورت است که ترکیبات فنولیک با یون‌های فلزی مانند آهن و مس که القا کننده فرآیند اکسیداسیون هستند، کیلات شده و آنها را از دسترس عوامل اکسید کننده خارج می‌کنند (10). مطالعات انجام شده حاکی از استفاده از عصاره اتانولی گیاهان در رقیق کننده منی چندین گونه حیوانی است. استفاده از عصاره گیاه جوانه میخک در گوسفند (7)، عصاره مرزه سهندی در گاو (33)، مریم گلی سهندی در گاو (18)، عصاره آبی رزماری در بز و گاو (12 و 44)، عصاره آبی گیاه رودیولا ساکرا در خوک (45) نمونه‌هایی از آنتی اکسیدان‌های گیاهی به کار رفته در رقیق کننده منی است.

مطالعات فراوان در شرایط آزمایشگاهی نشان داده اند که ترکیبات فنولیک می‌توانند به طور مستقیم و یا غیر مستقیم رادیکال‌های آزاد مانند یون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و پراکسیل را پاکسازی و جاروب کنند؛ به طوری که حتی اثر آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات بیشتر از ویتامین‌های C، E و آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک است (17). با توجه به توانایی عمل ترکیبات فنلی به‌عنوان یک ماده دهنده گروه هیدروکسیل و خصوصیت کیلاته کنندگی یون‌های فلزی، این ترکیبات به خوبی می‌توانند رادیکال‌های آزاد را مهار کنند (28). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که ترکیبات متعدد فنولیک موجود در گیاه نسترن قادر به مهار



شکل 5- مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، گلوکاتینون پراکسیداز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با استفاده از سطوح مختلف تیماری عصاره نسترن
Figure 5 - Comparing the mean measure enzymes activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and total antioxidant capacity using different levels of *Rosa canina* extract

بی‌ثباتی غشاء موجب کاهش عمر اسپرم می‌شود (40). سطح 100 میکرولیتر بر میلی‌لیتر عصاره نسترن غلظت MDA را کاهش داد که این کاهش نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود و این امر بیان‌کننده تأثیر مفید عصاره نسترن برای کاهش فرآیند پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم‌ها است. در این مطالعه افزودن سطوح بالاتری از عصاره اثرات منفی هر کدام از پارامترها داشته که می‌تواند ناشی از تغییرات اسمزی، pH و بهم خوردن تعادل ترکیبات رقیق‌کننده در سطوح بالاتر عصاره باشد. زیرا میزان گلیسرول و زرده تخم مرغ که از عوامل محافظت‌کننده انجمادی و نگهدارنده اسپرم‌ها از شوک سرمایی در طول فرآیند انجماد محسوب می‌شوند، بسیار مهم بوده و در نتیجه زنده‌مانی، تحرک و عملکردهای اسپرم را تحت تأثیر قرار می‌دهند. همچنین افزودن سطوح بالای عصاره، با مهار بیش از حد فعالیت آنزیم‌های دخیل در اکسیداسیون، احیاء و به هم زدن تعادل بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تولید رادیکال‌های آزاد در محیط، اسپرم‌ها را به هم زده و باعث کاهش عملکردهای اسپرم می‌شود (32). نتایج حاصل از ارزیابی‌های تحقیق ما در مورد عصاره نسترن نشان می‌دهد که انجماد منی قوچ با رقیق‌کننده حاوی 150 میکرولیتر بر میلی‌لیتر عصاره نسترن به طور مؤثری اسپرم را از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو حفظ کرده و پارامترهای تحرک کل و پیش‌رونده، یکپارچگی غشاء، زنده‌مانی را بهبود داده و سبب کاهش اسپرم‌های با ساختار غیر طبیعی می‌شود. در مطالعه حاضر،

در این مطالعه افزودن عصاره نسترن به رقیق‌کننده، موجب بهبود پارامترهای تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در مقایسه با گروه شاهد شد و توانست اسپرم‌ها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت کند که احتمالاً یکی از دلایل این بهبود می‌تواند مهار بیش از حد رادیکال‌های آزاد بخصوص ROS توسط عصاره این گیاه باشد که موجب بهبود تحرک اسپرم‌ها شده است. ارتباط قوی بین تولید ROS و کاهش تحرک اسپرم وجود دارد به طوری که مشخص شده است هیدروژن پراکسید می‌تواند در سراسر غشای اسپرم پخش شده و فعالیت برخی آنزیم‌های حیاتی مانند آنزیم گلوکز-6 فسفات دهیدروژناز را مهار کند. این آنزیم با کنترل غلظت گلوکز از طریق منحرف کردن مسیر هگزوز مونو فسفات و کنترل فعالیت NADPH نقش اساسی در تولید ATP و تحرک اسپرم دارد (2). افزودن عصاره نسترن به رقیق‌کننده، توانسته است با محافظت ساختمان غشاء اسپرم‌ها، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی آنها را نسبت به گروه شاهد بهبود ببخشد. مطالعات پیشین حاکی از آن است که ترکیبات فنولیک بخصوص فلاونوئیدها قادرند با پوشش دادن لیپیدها روند پراکسیداسیون لیپیدی را تغییر داده و متوقف کنند. همچنین با کاهش سیالیت غشاهای سلولی، جلوگیری از تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال و محدود کردن پراکسیداسیون فسفولیپیدها و اسیدهای چرب غیر اشباع، از غشاهای سلولی محافظت کنند. (6 و 9). افزایش در سیالیت غشای پلاسمایی، نفوذپذیری و

آزاد، اکسیژن، سدیم آسکوربات و FeSO_4 است از تشکیل MDA جلوگیری نمی‌کند. در نتایج مطالعات ما بر روی سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتیون پراکسیداز تناقض وجود دارد و هدف ما از ارزیابی این آنزیم‌ها مطالعه تغییرات آنها بود. علاوه بر این دو آنزیم ارزیابی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی نیز می‌تواند شاخص مناسبی برای ارزیابی وضعیت سلول باشد. در این تحقیق غلظت TAC در گروه‌های تیمار شده با عصاره نسترن مورد مطالعه قرار گرفت. براساس نتایج این مطالعه میانگین TAC پلاسما منی در گروه‌های حاوی نسترن میزان فعالیت این آنزیم کاهش یافت. کوکا و همکاران (24) ارتباط مثبتی بین TAC پلاسما منی و تحرک اسپرم مشاهده کردند. بنابراین هر چه ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی افزایش یابد میزان تحرک نیز بهبود خواهد یافت.

این طرح اولین مطالعه درباره تأثیر عصاره نسترن بر روی پارامترهای اسپرم یخ‌گشایی شده قوچ همراه با ارزیابی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. از آنجاییکه ماده مؤثره گیاه نسترن کوئرسیتین و کامفرول می‌باشد و باتوجه به اینکه گیاه مرزه سهندی و ماکرانثا نیز عمدتاً حاوی کوئرسیتین است به همین دلیل نتایج حاضر با نتایج آنها و دیگر عصاره‌های گیاهی استفاده شده در اسپرم را مقایسه گردید. مطالعات اخیر حاکی از آن است که استفاده از عصاره آبی گیاه رزماری تأثیر بالقوه‌ای بر پارامترهای تحرک و درصد زنده‌مانی اسپرم خوک داشته و غلظت MDA تولیدی را که از عوامل اکسیداسیونی مخرب به شمار می‌رود، به طور معنی‌داری کاهش داده است (26). استفاده از عصاره آبی گیاه رودیولا ساکرا بر خصوصیات منی خوک بعد از انجماد بررسی و نشان داده شد که غلظت‌های 4، 6 و 8 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه فوق با اثر خنثی‌کنندگی قوی علیه رادیکال آنیون سوپر اکسید و کاهش پراکسیداسیون لیپید موجب افزایش تحرک و یکپارچگی غشای پلاسمایی شده است (45). در مطالعه‌ای دیگر افزودن عصاره آبی رزماری به منی بز باعث بهبود جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و کاهش میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی شد (44). تحقیقات انجام گرفته توسط شهباززاده و همکاران (33) در زمینه تأثیر عصاره مرزه ماکرانثا و مرزه سهندی حاکی از آن است که افزودن عصاره طی فرآیند انجماد، عملکرد سلول اسپرم گاو (تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء و حساسیت به پراکسیداسیون لیپید) را بهبود بخشیده و سطح MDA را نیز کاهش داد اما این کاهش معنی‌دار نبود. باغشاهی و همکاران (7) اثر عصاره جوانه میخک را بر روی پارامترهای حرکتی و سلامت غشاء اسپرم گوسفند بررسی کردند و نشان دادند که عصاره جوانه میخک در غلظت‌های 35 و 75 میکروگرم بر میلی‌لیتر اثرات سودمندی بر پارامترهای تحرک اسپرم داشت. فرهادی و همکاران (18) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه مرزنگوش و مریم‌گلی سهندی را بر روی

افزودن عصاره نسترن در سطح 150 میکرولیتر بر میلی‌لیتر پارامتر زنده‌مانی را به طور مؤثری بالا برده و میزان اسپرم‌های مرده قوچ در مقایسه با سایر سطوح استفاده شده و گروه شاهد را کاهش داد. بنابراین عصاره نسترن در سطح 150 میکرولیتر بر میلی‌لیتر خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را به طور ویژه‌ای بروز داده است. لذا می‌توان گفت که عملکرد مثبت این سطح تیماری بر پارامترهای تحرک کل و تحرک پیش‌رونده احتمالاً با زنده‌مانی اسپرم‌ها در ارتباط می‌باشد. همچنین می‌توان از نتایج این مطالعه استنباط کرد که افزودن 150 میکرولیتر بر میلی‌لیتر عصاره نسترن موجب بهبود یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها شده و غشای پلاسمایی اسپرم‌ها را از آسیب‌های ناشی از فرآیند انجماد حفظ کرد. غلظت بالای عصاره نسترن نه تنها اثر محافظتی بر غشای اسپرم نداشته بلکه بدلیل برهم زدن فشار اسمزی بر غشای اسپرم آسیب وارد کرده است که این کاهش یکپارچگی غشای پلاسمایی معنی‌دار نبود. نتایج ما در مورد میزان اسپرم‌های غیر طبیعی با استفاده از محلول هانکوک نشان دهنده این است که افزودن سطوح 100 و 150 میکرولیتر بر میلی‌لیتر عصاره نسترن درصد اسپرم‌های غیر طبیعی را کاهش داد که این کاهش معنی‌دار نبود و سطح 200 میکرولیتر بر میلی‌لیتر تمایل به افزایش اسپرم‌های غیر طبیعی نسبت به گروه شاهد داشتند. آنالیز داده‌های این آزمایش نشان می‌دهد که غلظت MDA در سطوح تیماری ذکر شده معنی‌دار نبود ولی از لحاظ آماری افزودن سطح 100 میکرولیتر بر میلی‌لیتر عصاره گیاه نسترن سبب کاهش پراکسیداسیون لیپید گردید. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما منی نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشته است. کاهش سطح آنتی‌اکسیدانی پلاسما منی TAC ممکن است نقش معنی‌داری در مورفولوژی اسپرم داشته باشد. زیرا بازدارنده‌های مختلفی شامل SOD، GPX و CAT در اسپرم و پلاسما منی وجود دارد که با حذف رادیکال‌های آلوکسیل و پروکسیل سبب حفظ اسپرم در برابر آسیب اکسیداتیو می‌شود. در این مطالعه میزان فعالیت SOD در گروه تیمار شده با عصاره نسترن 150 میکرولیتر بر میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد بهبود معنی‌داری یافت. همچنین مشاهده شده است که فعالیت SOD پلاسما منی همبستگی معنی‌داری با تحرک و غلظت اسپرم ندارد (39). سیستم‌های دفاع آنزیمی آنتی‌اکسیدان سلول اسپرم می‌تواند زنده‌مانی بعد از یخ‌گشایی را فراهم کند. طی مطالعه‌ای که به منظور مقایسه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و GPX طراحی شد مشاهده گردید که فعالیت SOD نسبت به GPX در اسپرم خرگوش قوی‌تر است (5). نسترن به‌علت داشتن مواد مؤثره همانند کوئرسیتین توانسته SOD و GPX را افزایش دهد که این افزایش با جنبایی رابطه مستقیم دارد و باعث افزایش معنی‌دار جنبایی نیز شده است. جونس و همکاران گزارش کردند که افزودن SOD، GPX و CAT به محیط اسپرم که شامل سیستم تولید رادیکال‌های

لیکوپن، توکوفرول و بیوفلاونوئیدها باشد (15). از طرف دیگر گیاه نسترن به علت داشتن ترکیبات بالای فنولی به عنوان ترکیب دارای اثرات آنتی اکسیدانی و آنتی رادیکالی می باشد (19).

نتیجه گیری کلی

براساس نتایج حاصل از این مطالعات می توان پیشنهاد کرد بهبود فراسنجه های تحرک، زندهمانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی در حضور دوز 150 میکرولیتر بر میلی لیتر عصاره نسترن می تواند ناشی از اثر آنتی اکسیدانی قوی این عصاره و ترکیبات فنولیک آن از جمله الایک اسید، کوئرسیتین و کامفرول باشد و عصاره نسترن می تواند به عنوان منبع آنتی اکسیدان طبیعی قابل دسترس جایگزین آنتی اکسیدان های سنتتیک شود. همچنین وفور این گیاه در مناطق مختلف و روش های ساده عصاره گیری، تهیه و استفاده از این گیاه را مقرون به صرفه کرده است. با این وجود برای بررسی و ارزیابی دقیق تر تأثیر آنتی اکسیدانی گیاه نسترن در راستای فرآوری اسپرم نیاز به تحقیقات و آزمایشات بیشتری است.

پارامترهای اسپرم مطالعه کردند و نتیجه گرفتند که تیمار حاوی 4 میلی لیتر بر دسی لیتر عصاره مرزنگوش و مریم گلی سهندی دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قوی می باشد و سبب بهبود در صفات تحرک، زندهمانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی شده می شود. همچنین این سطح از عصاره گیاه مریم گلی سهندی غلظت MDA را به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد کاهش داد. عصاره مرزنگوش نیز غلظت MDA را کاهش داد ولی با گروه شاهد اختلاف معنی داری نبود.

نتایج تحقیقات انجام شده بر روی اثر عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز بر پارامترهای حرکتی و سلامت غشاء اسپرم قوچ حاکی از آن است که عصاره شبدر قرمز اثر منفی روی تحرک و سلامت غشای اسپرم قوچ دارد و عصاره شبدر قرمز با افزایش غلظت و زمان تمام پارامترهای حرکتی را به طور معنی داری کاهش داده و سلامت غشای اسپرم قوچ با افزایش غلظت عصاره بیشتر کاهش می یابد (34). مکانیسم اصلی که از طریق آن عصاره نسترن در طی فرآیند انجماد- یخ گشایی اسپرم قوچ را محافظت می کند می تواند به دلیل وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال از جمله فنول ها، بتاکاروتن، کاروتنوئیدها،

منابع

- 1- Agarwal, A, and R. A. Saleh. 2002. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urologic Clinics of North America*, 29(4): 817-827.
- 2- Aitken, R. J., D. Buckingham., K. West., F. C. Wu., K. Zikopoulos, and D. W. Richardson. 1992. Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94(2): 451-462.
- 3- Aitken, R. J., H. M. Fisher., N. Fulton., E. Gomez., W. Knox., B. Lewis, and S. Irvine. 1997. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Molecular Reproduction and Development*, 47(4): 468-482.
- 4- Aitken, R. J., D. Harkiss, and D. Buckingham. 1993. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98(1): 257-265.
- 5- Alvarez, J. G., J. C. Touchstone., L. Blasco, and B. T. Storey. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology*, 8(5): 338-48.
- 6- Arora, A., T. M. Byrem, M. G. Nair, and G. M. Strasburg. 2000. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1): 102-109.
- 7- Baghshahi, H., A. Riasi, A. H. Mahdavi, and A. Shirazi. 2014. Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. *Cryobiology*, 69(3): 482-487.
- 8- Bidmeshkipour, A., A. Hosseinzadeh Colagar., M. Gholinezhad Chari, and P. Biparva. 2010. Seminal plasma total antioxidant capacity and vitamin- C levels in asthenozoospermia: a case-control study. *Iranian Journal of Medical Journal*, 67(12): 835-842. (In Persian).
- 9- Blokhina, O., E. Virolainen, and K. V. Fagerstedt. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91(2): 179-194.
- 10- Cagle, P., O. Idassi., J. Carpenter., R. Minor., I. Goktepe, and P. Martin. 2012. Effect of Rosehip (*Rosa canina*) Extracts on Human Brain Tumor Cell Proliferation and Apoptosis. *Journal of Cancer Therapy*, 3(5): 534-545.
- 11- Cocuzza, M., S. C. Sikka., K. S. Athayde, and A. Agarwal. 2007. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *International Braz Journal Urology*, 33(5): 603-621.
- 12- Daghigh-Kia, H., R. Olfati-Karaji., I. Ashrafi, and A. Hosseinkhani. 2014. Comparison of rosemary (*Rosmarinus*

- officinalis) extracts and reduced glutathione antioxidants on bull semen quality after the cryopreservation process. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(1): 98-105.
- 13- De Graaf, S. P., G. Evans., L. Gillan., M. M. P. Guerra., W. M. Maxwell, and J. K. O'Brien. 2007. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, 67(2): 217-227.
 - 14- Dragana, M., S. Stanisavljević Saša., M. Stojičević Sofija., P. Đorđević Branislav., T. Zlatković Dragan., T. Veličković Ivana, and L. Karabegović Miodrag. 2012. Antioxidant activity, the content of total phenols and flavonoids in the ethanol extracts of mentha longifolia (L.) hudson dried by the use of different techniques. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 18(3): 411-420.
 - 15- Ercisli, S. 2007. Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa spp.*) species. *Food Chemistry*, 104(4): 1379-1384.
 - 16- Esterbauer, H. and K. H. Cheeseman. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186: 407-421.
 - 17- Evans, G. and W. C. Maxwell. 1987. *Salamons' artificial insemination of sheep and goats*. Second ed. Butterworths.
 - 18- Farhadi, R., H. Daghigh Kia, and I. Ashrafi. 2016. The Effect of *Salvia Sahendica* Ethanolic Extract as Natural Antioxidant on Quality Parameters of Cryopreserved Holstein Bull Sperm. *Research on Animal Production*, 6(12): 79-86. (In Persian).
 - 19- Fattahi, S., R. Jamei, and S. H. Sarghein. 2012. Antioxidant and antiradical activities of *Rosa canina* and *Rosa pimpinellifolia* fruits from West Azerbaijan. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 2(4): 523-529.
 - 20- Garrido, N., M. Meseguer., C. Simon., A. Pellicer, and J. Remohi. 2004. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 6(1): 59-66.
 - 21- Hancock, J. L. 1956. The morphology of boar spermatozoa. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 76(3): 84-97.
 - 22- Jones, R., T. Mann, and R. Sherins. 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 31(5): 531-537.
 - 23- Khosrowbeygi, A. and N. Zarghami. 2007. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 77(2): 117-121.
 - 24- Koca, Y., O. L. Ozdal., M. Celik., S. Unal, and N. Balaban. 2003. Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men. *Archives of Andrology*, 49(5): 355-359.
 - 25- Lenzi, A., L. Gandini., M. Picardo., F. Tramer., G. Sandri, and E. Panfili. 2000. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. *Frontiers in Bioscience*, 5(1): 1-15.
 - 26- Malo, C., L. Gil., R. Cano., F. Martínez, and I. Galé. 2011. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, 75(9): 1735-1741.
 - 27- Miller, N. J. and C. Rice-Evans. 1997. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS + radical cation assay. *Free Radical Research*, 26(3): 195-199.
 - 28- Osawa, T. 1994. Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. Pages 241-251 in *Postharvest Biochemistry of Plant Food-Materials in the Tropics*, I. Uritani, V. V. Garcia, and E. M. Mendoza, ed. Japan Scientific Societies Press, Japan.
 - 29- Pagila, D. E. and W. N. Valentine. 1967. Methods of glutathione peroxidase activity assay. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(3): 158-9.
 - 30- Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63(3): 215-225.
 - 31- Revell, S. G. and R. A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2): 77-86.
 - 32- Roca, J., M. A. Gil., M. Hernandez., I. Parrilla., J. M. Vazquez, and E. A. Martinez. 2004. Survival and Fertility of Boar Spermatozoa After Freeze-Thawing in Extender Supplemented With Butylated Hydroxytoluene. *Journal of Andrology*, 25(3): 397-405.
 - 33- Shahbazzadeh, R., H. Daghigh Kia., Gh. Moghaddam., Gh. Dehghan., A. Hosseinkhani, and I. Ashrafi. 2015. Effect of different levels of *Satureja sahendica* alcoholic extract on the quality of freeze-thawed Holstein bull spermatozoa. *Journal of Animal Science Research*, 25(1): 1-199. (In Persian).
 - 34- Soufi, P., F. Farrokhi Ardebily., H. Malekinejad, and E. Bernoosy. 2012. Effect of red clover hydroalcoholic extract on motility and membrane integrity of ram sperm. Pages 763-767 in *The Fifth Congress on Animal Science*, Isfahan University of Technology. (In Persian).

- 35- Sroka, Z. 2005. Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(11-12): 833-843.
- 36- Storey, B.T. 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 3(3): 203-213.
- 37- Tavassoli, S, and Z. E. Djomeh. 2011. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of methanol extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Global Veterinaria*, 7(4): 337-341.
- 38- Tavilani, H., M. T. Goodarzi., A. Vaisi-Raygani., S. Salimi, and T. Hassanzadeh. 2008. Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *International Braz Journal Urology*, 34(4): 485-491.
- 39- Tkaczuk-Wlach, J., M. Kankofer, and G. Jakiel. 2002. Activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in human semen in normozoospermia and spermatopathy. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio D: Medicina*, 57(2): 369-375.
- 40- Watson, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, 7(4): 871-891.
- 41- Woolliams, J. A., G. Wiener., P. H. Anderson, and C. H. McMurray. 1983. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Research in Veterinary Science*, 34(3): 253-256.
- 42- Yanishlieva, N. V, and E. M. Marinova. 1996. Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 203(3): 220-223.
- 43- Zalata, A., T. Hafez, and F. Comhaire. 1995. Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Human Reproduction*, 10(6): 1444-1451.
- 44- Zanganeh, Z., M. Zhandi., A. Zare-Shahneh., A. Najafi., M. M. Nabi, and A. Mohammadi-Sangcheshmeh. 2013. Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? *Small Ruminant Research*, 114(1): 120-125.
- 45- Zhao, H. W., Q. W. Li., G. Z. Ning., Z. S. Han., Z. L. Jiang, and Y. F. Duan. 2009. *Rhodiola sacra* aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 71(5): 849-857.
- 46- Ziegler, S. J., B. Meier, and O. Sticher. 1986. Fast and selective assay of L-Ascorbic Acid in rose hips by RP-HPLC coupled with electrochemical and/or spectrophotometric detection. *Planta Medica*, 52(05): 383-387.



Effect of *Rosa Canina* Extract on Microscopic, Biochemical Parameters and Seminal Plasma Enzymes after Freeze-Thawing Process

S. Razavian¹- H. Daghigh Kia^{2*}- A. Najafi³- H. Vaseghi Dodran³

Received: 25-06-2016

Accepted: 14-08-2016

Introduction Semen cryopreservation has detrimental effects on sperm cell organelles, including cell membranes, mitochondria, and DNA due to the increased level of reactive oxygen species (ROS). Oxidation of polyunsaturated fatty acids in the sperm cell membranes is caused by high levels of ROS produced during the freezing-thawing process. This problematic condition causes decreased sperm motility, membrane integrity, increased metabolic changes and, ultimately, decreased fertility of the sperm. The addition of antioxidant compounds to the semen extender before semen cryopreservation can decrease ROS levels and their deleterious effects on spermatozoa. This study was conducted to assess the antioxidant effect of different levels of *Rosa canina* extract on microscopic and biochemical parameters and antioxidant enzyme activities of *Ghezel* ram semen after freezing-thawing process.

Materials and Methods Semen samples were collected from five *Ghezel* rams. Ejaculates were collected twice a week. To eliminate individual effects, ejaculates containing sperm with >80% progressive motility, volume of 0.75-2 mL, sperm concentrations greater than 3×10^9 sperm/mL and sperm abnormalities of less than 10% were pooled. Different concentrations of *Rosa canina* extract (0, 100, 150, 200 μ L/mL) were added into the tris-egg yolk based diluent. After processing and freezing, the samples were stored in liquid nitrogen until the time of evaluation. Sperm motility characteristics were analyzed using computer-assisted sperm analysis (CASA). Sperm motility parameters including total motility, progressive motility, average path velocity, straight-line velocity, curvilinear velocity, linearity, straightness, amplitude of lateral head displacements and beat/cross frequency of sperm, viability, membrane integrity, sperm abnormalities, lipid peroxidation, antioxidant enzymes of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and total antioxidant capacity were evaluated after thawing. Statistical analyses were performed using SAS software. The data were analyzed using the GLM procedure. Tukey-Kramer test were used to determine the significance differences between the experimental treatments. Significant differences were reported at the level of 5 percent.

Results and Discussion The results of lipid peroxidation (LPO) measurements show that adding 100 μ l / ml *Rosa canina* extract to the diluent medium reduced the amount of malondialdehyde, which was not significant in comparison to the control group. This could be indicative of the beneficial effect of *Rosa canina* extract to reduce the process of lipid peroxidation of the sperm membrane. The results showed no significant difference in malondialdehyde and morphology of sperm in treatments containing *Rosa canina* extract compared to the control group. The addition of *Rosa canina* extract was not significantly effect in morphology and structure of sperms compared to the control group. However, the percentage of abnormal sperms decreased at levels of 100 and 150 μ L/mL compared to the control group. The addition of 150 μ L/mL of *Rosa canina* extract significantly improved the viability and plasma membrane integrity of sperms after freezing-thawing compared to the control and other treatment groups ($P < 0.05$). This is probably due to inhibition of free radicals, especially ROS, by the *Rosa canina* extract, which improves the viability of sperms. Previous studies have suggested that phenolic compounds, especially flavonoids, can alter and stop lipid peroxidation by coating lipids. Also through reducing fluidity of cell membranes, preventing excessive production of reactive oxygen species and limiting the peroxidation of phospholipids and unsaturated fatty acids protect cell membranes. (6, 9). Addition of 150 μ L/mL *Rosa canina* extract to diluent significantly improved total motility compared to the control and other treatment groups ($P < 0.05$). Progressive motility was significantly increased due to addition of 150 μ L/mL of the *Rosa canina* extract compared to the control group ($P < 0.05$). Curvilinear velocity and lateral head displacement parameters were significantly higher in the group receiving 100 and 150 μ L/mL of *Rosa canina* extract compared to the control group ($P < 0.05$). The total antioxidant capacity was significantly lower in group receiving 100 and 200 μ L/mL compared to the control group ($P < 0.05$). Reducing the total antioxidant capacity of semen may have a significant role in sperm morphology. Because there are various inhibitors of SOD, GPX and CAT in semen,

1, 2, 3- Professor, Msc Student and PhD student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran, respectively.

(*-Corresponding author email: daghighkia@tabrizu.ac.ir)

which prevent sperm from oxidative damage by eliminating aloxycle and proxyl radicals. The amount of the superoxide dismutase increased significantly at groups receiving 150 and 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of *Rosa canina* extract as compared to control ($P < 0.05$). The activity of glutathione peroxidase at level of 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$ tended to increase. Total antioxidant activity decreased significantly at concentrations of 100 and 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ($P < 0.05$).

Conclusion In conclusion, the findings of this study showed after freezing-thawing process, the diluent containing 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$ *Rosa canina* extract improved sperm parameters significantly when compared to other levels.

Keywords: Antioxidant, Diluent, Freeze-thawing, Ram sperm, *Rosa canina* extract.