# تاثیر عصاره برگ زیتون بر پراکسیداسیون چربی اسپرم خروس طی ذخیره‌سازی در ٤ درجه سانتی‌گراد

سیدمونس جلالی کوهی خیلی[1*]، مهرداد محمدی[1]، محمد روستایی علی‌مهر[1]
*۱- گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان*
*نویسنده مسئول:* s.monesjalali@yahoo.com*

**چکیده**

یکی از کاستی‌های تلقیح مصنوعی، کاهش قدرت باروری اسپرم‌ها با افزایش مدت نگهداری، در پی اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع و تشکیل رادیکال‌های آزاد است. در نتیجه برای کاهش اثرات مضر رادیکالهای آزاد از مواد آنتی اکسیدانی استفاده می‌شود. به منظور تعیین اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ زیتون بر میزان پراکسیداسیون چربی اسپرم، از ۱۵ خروس نژاد راس ۳۰۸ نمونه‌گیری شد. نمونه‌ها بعد از تجمیع با رقیق‌کننده سکستون رقیق و به پنج قسمت تقسیم شدند و به هر قسمت مقدار صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره برگ زیتون اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ٤ °C نگهداری شدند. نتایج نشان داد اختلاف معنی‌داری در تولید مالون‌دی‌آلدهید (MDA) بین تیمارهای ۵۰ (۰/۰٦۷ ± ۰/۷٦) و ۱۵۰ (۰/۰۹٤ ± ۰/۷۹) با گروه شاهد (۰/۰٤۱ ± ۰/۹٤) وجود نداشت در حالیکه میزان تولید MDA در تیمار با غلظت ۱۰۰ (۰/۰۵۲ ± ۰/۵۰) میکروگرم عصاره، به طور معنی‌داری کاسته شد ولی با افزودن ۲۰۰ (۰/۱۵۲ ± ۱/٦۹) میکروگرم عصاره به منی خروس بر میزان تولید MDA به طور معنی داری افزوده شد($p$<۰/۰۵). بنابراین با توجه به پژوهش حاضر جهت ذخیره‌سازی اسپرم خروس به صورت مایع، افزودن ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره برگ زیتون به رقیق‌کننده پیشنهاد می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** *اسپرم خروس، آنتی‌اکسیدانت، پراکسیداسیون، مالون‌دی‌آلدهید*

## مقدمه

از روش‌های نگهداری برون‌تنی اسپرم پرندگان، نگهداری منی به صورت مایع است که همواره سعی شده است با افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدان به رقیق‌کننده‌ها، باروری اسپرم‌ها در مدت نگهداری به صورت مایع حفظ شود. مالون‌دی‌آلدهید[1] (MDA) از جمله ترکیباتی است که از پراکسیداسیون چربی‌ها حاصل می‌شود و افزایش آن در منی باعث کاهش جنبایی اسپرم و کاهش باروری می‌شود. فسفولیپیدها از ترکیبات اصلی غشا بوده و عامل اصلی سیالیت آن هستند که این خصوصیت در فرایند ظرفیت‌پذیری[2] و واکنش آکروزوم در پستانداران و جنبایی در اسپرم‌های انسان، خوک و خروس بسیار حائز اهمیت است (زانیبونی و سرولینی، ۲۰۰۹). در بین آنتی‌اکسیدانهای طبیعی، درخت زیتون به واسطه روغن، میوه و برگهای خود به عنوان یکی از گونه‌های با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالا مورد قبول است و همچنین به علت دارا بودن بعضی از آنتی‌اکسیدانهای مهم و ترکیبات فنولیک از آسیب اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (جیمی و همکاران، ۲۰۰۸).بنابراین هدف از این تحقیق تعیین بهترین غلظت عصاره برگ زیتون جهت ذخیره‌سازی اسپرم خروس در دمای ٤ درجه سانتی گراد است.

---

[1].Malondialdehyde
[2]. Capacitation

**مواد و روش‌ها**

برای اجرای این تحقیق از ۱۵ قطعه خروس سالم نژاد راس ۳۰۸ با سن ۳۲ هفتگی استفاده شد. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی در دمای ۲۰–۱۸ درجه سانتی‌گراد و تحت یک برنامه نوری با ۱٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند.آب به صورت آزاد و جیره غذایی بر اساس توصیه شرکت راس در اختیار پرنده‌ها بود. نمونه‌های منی پس از ۱۰ روز ( عادت‌دهی) و با روش مالش شکمی در ۵ نوبت (تکرار)، جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌های منی با هم مخلوط و غلظت اسپرم با رقیق‌کننده سکستون به دوبرابر غلظت نهایی ($۱۰^{٦}$×٤۰۰۰) در هر میلی‌لیتر رسانده شد.برای تهیه غلظت‌های مختلف عصاره برگ زیتون (تهیه شده از شرکت دانا کاسیان لرستان)، ابتدا ٤۰۰ میلی‌گرم از این عصاره در یک میلی‌لیتر اتانول حل شد و محلول پایه با غلظت٤۰۰mg/mL بدست آمد. ۱۰ میکرولیتر از محلول پایه بوسیله بافر سکستون به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد تا محلول کار با غلظت ٤۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره برگ زیتون و ۰/۱ درصد اتانول تهیه شود. از محلول کار جهت تهیه غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (دوبرابر غلظت نهایی) در بافر سکستون استفاده شد. در ادامه نمونه‌های منی به ۵ قسمت مساوی تقسیم شدند و به هر بخش، رقیق‌کننده سکستون حاوی صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره برگ زیتون به صورت حجم به حجم ۱:۱ اضافه شد. غلظت نهایی اسپرم به $۱۰^{٦}$×۲۰۰۰ در mL و عصاره برگ زیتون به صفر(شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رسید.سپس تیمارها به کمک دستگاه سردکننده به صورت تدریجی (۰/۲۵ °C/min) تا ٤ °C سرد شدند. برای تعیین غلظت مالون‌دی‌آلدهید از روش کومارسان و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد. نتایج بدست آمده در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS و رویه GLM ارائه و سطوح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

**نتایج و بحث**

با توجه به نتایج بین تیمارهای ۵۰ و ۱۵۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱و $P$>۰/۰۵). اگرچه با افزودن ۱۰۰ میکروگرم عصاره به منی از تولید مالون‌دی‌آلدهید به طور معنی داری کاسته شد ولی با افزایش غلظت به ۲۰۰ میکروگرم، بر میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید افزوده شد ($p$<۰/۰۵). گزارش شده است عصاره برگ زیتون باعث کاهش معنی‌داری در غلظت مالون‌دی‌آلدهید سرم خون و کلیه موشها شد. همچنین باعث پاک‌سازی آنیون‌های سوپراکسیدی و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود (ویسیولی و همکاران، ۱۹۹۸). فلاوونوئیدها (از محتویات برگ زیتون) می‌توانند جلوی اکسایش خودبخودی لینولئیک اسید در شرایط آزمایشگاهی یا پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشا و پراکسیداسیون میتوکندریایی را بگیرند (تراو و همکاران، ۱۹۹٤). با توجه به این تحقیقات به نظر می‌رسد علت کاهش MDA در غلظت ۱۰۰ میکروگرم عصاره به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی و پاک‌کنندگی رادیکالهای آزاد عصاره برگ زیتون است. علاوه براین نتایج نشان داد افزودن ۲۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون به منی خروس باعث افزایش معنی‌داری در میزان تولید MDA شد ($p$<۰/۰۵). برگهای زیتون دارای متابولیتهای ثانویه‌ای چون تانن، ساپونین، استروئید، آلکالوئیدها، استرول غیر اشباع و ترپن است. همچنین برخی ترکیبات موجود در زیتون و روغن آن باعث القای آپوپتوز در سلولهای لوسمی میلوسیتیک انسانی شد. علاوه بر این، تحقیقات نشان داد الئونولیک اسید (موجود در برگ زیتون) در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند از تحرک اسپرم موش جلوگیری کند و اثرات زیان‌آوری روی تولیدمثل جنس نر داشته باشد. در مطالعه‌ای ثابت شد الئونولیک اسید دارای عمل هم‌افزایی با اثرات اسپرم‌کشی ساپونین است (کومار و همکاران، ۲۰۰۷). با توجه به این گزارشات، افزایش تولید MDA با غلظت ۲۰۰ میکروگرم عصاره برگ زیتون احتمالا به دلیل خاصیت اسپرم‌کشی و القای آپوپتوز عصاره برگ زیتون است. نتیجه اینکه غلظت ۱۰۰ میکروگرم عصاره برگ

زیتون به طور معنی‌داری سبب کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید طی ٤٨ ساعت ذخیره‌سازی منی خروس شد و افـزودن آن بـه رقیـق-کننده پیشنهاد می‌شود.

**منابع**

Jemai H, Bouaziz M, Fki I, Feki AEl,Sayadi S. 2008. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative- rich extracts from Chemlali olive leaves. Chemico-Biological Interactions, 176: 88–98.

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

Kumaresan A, Kadirvel G, Bujarbaruah KM, Bardoloi RK, Anubrata Das, Kumar S, Naskar S. 2009. Preservation of boar semen at 18 ◦C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. Animal Reproduction Science, 110: 162–171.

Terao J, Piskula M, Yao Q.1994. Protective effect of epicatechin, epicatechingallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers, Arch. Biochemical and Biophysical Research Communications, 308: 278–284.

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

Zaniboni L, Cerolini S. 2009. Liquid storage of turkey semen: Changes in quality parameters, lipid composition and susceptibility to induced in vitro peroxidation in control, n-3 fatty acids and alpha-tocopherol rich spermatozoa. Animal Reproduction Science, 112: 51– 65.

**جدول۱: اثر تیمار بر میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید منی خروس بعد از ٤٨ ساعت ذخیره سازی**

| عصاره برگ زیتون (میکروگرم در میلی‌لیتر) | (میکرومول در $۱۰^{٦}$×۳۰۰) |
|---|---|
| ۰ | ۰/۹٤ ± ۰/۰٤۱[b] |
| ۵۰ | ۰/۷٦ ± ۰/۰٦۷[ab] |
| ۱۰۰ | ۰/۵۰ ± ۰/۰۵۲[a] |
| ۱۵۰ | ۰/۷۹ ± ۰/۰۹٤[b] |
| ۲۰۰ | ۱/٦۹ ± ۰/۱۵۲[c] |

[a-c]حروف غیر مشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($p$<۰/۰۵).