DOI: 10.22092/vj.2020.342182.1696
شماره ۱۳۱ تابستان ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

اثر عصاره هیدروالکلی *Ceratonia siliqua* بر روی کیفیت منی سگ در طول نگهداری در یخچال

• **محمد معین سبزه ای**
گروه مامایی و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
• **علی سلیمان زاده (نویسنده مسئول)**
گروه مامایی و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
• **اسماعیل آین**
گروه مامایی و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت:۱۲-۱۲-۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۲۰-۰۱-۱۳۹۹
Email: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

چکیده

سرد کردن و ذوب کردن منجر به آسیب‌های اکسیداتیو و تغییرات فیزیکی و شیمیایی در اسپرم می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره هیدروالکلی *Ceratonia siliqua* (خرنوب) بر روی کیفیت منی سگ در طول نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد است. در این بررسی از ۳ قلاده سگ نر سن ۷-۳ ساله برای جمع‌آوری منی استفاده شد. نحوه اخذ منی بصورت دستی می‌باشد. در این بررسی از قسمت دوم انزال که بخش غنی از اسپرم می‌باشد استفاده شد. نمونه‌های بالای $۱۰^{۶} \times ۲۰۰$ برای انجام آزمایش استفاده شد. نمونه‌گیری در هفته دو مرتبه انجام پذیرفت و برای از بین بردن تنوع بین نمونه‌ها اسپرم، هر بار همه اسپرم انزالی سگ‌ها با یکدیگر ادغام می‌شوند. اسپرم، توسط سانتریوفوژ با دور ۷۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریوفوژ شد و پلاسمای منی دورانداخته شد. پس از رقیق‌سازی، اسپرم ها به ۵ گروه : ۱- کنترل، ۲-کنترل شم، ۳-۱۰ µg/mL عصاره خرنوب، ۴- ۲۰ µg/mL عصاره خرنوب و ۵- ۴۰ µg/mL عصاره خرنوب، تقسیم شدند. عصاره هیدرو الکلی خرنوب در بین گروه‌های درمانی درگروه ۲۰ میکروگرم توانست نسبت به سایر گروه‌های درمانی بیشترین اثر در بهبود پارامترهای اسپرم را داشته باشد و همچنین تفاوت معنی‌داری با گروه‌های کنترل و کنترل شم داشت($P<۰/۰۵$). این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی خرنوب به دلیل داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند اسپرم را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از نگهداری در دمای یخچال محافظت کند.

کلمات کلیدی: آنتی اکسیدان، پارامترهای اسپرم، عصاره هیدروالکلی خرنوب، سگ

● Veterinary Researches & Biological Products No 131 pp: 110-120

The effect of *Ceratonia siliqua* aqueous extract on canine semen quality on during storage at Refrigerator

By: Sabzeie, M. M., Department of Theirogenology, *Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran. Soleimanzadeh, A., (Corresponding Author) Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, West Azarbaijan, Iran. and Ayen, E., Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, West Azarbaijan, Iran.*

Received: 2020-03-02 **Accepted: 2020-04-08**

Email: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

Cooling and thawing result in oxidative damage, physical and chemical changes in the sperm. The aim of the present study was to evaluate the effect of hydroalcoholic extract of *Ceratonia siliqua* (carob) on semen quality during storage at 4 ° C. In this study, three male dogs aged 3-7 years were used for semen collection. The method of collection semen is manual. In this study, the second part of the ejaculate, which is rich in sperm, was used. Samples above 200 × 106 were used for the experiments. Sampling was performed twice a week, and to eliminate the diversity of sperm samples, all ejaculate dogs were pooled each time. The pooled sperm was centrifuged by centrifugation at 700 g for 5 minutes and the seminal plasma was discarded. After dilution, spermatozoa were divided into 5 groups: 1) Control, 2) control Sham, 3) 10 µg/ml of carob extract, 4) 20 µg/ml of carob extract, 5) 40 µg/ml of carob extract.

Hydroalcoholic extract of carob had the highest effect on sperm parameters improvement in the 20 µg/ml group compared to the other treatment groups and also had a significant difference with the control and control sham groups (P <0.05). This study demonstrates that Ceratonia siliqua hydroalcoholic extract, due to its antioxidant properties, can protect sperm against oxidative damage caused by refrigerated storage.

Keyword: Antioxidant, sperm parameters, carob hydroalcoholic, canine

مقدمه

جانوران و جاندران برای حفظ بقای نسل خود به سیستم تولید مثلی نیاز دارند که نقص در هر یک از اعضای این سیستم، تولیدمثل و باروری را مختل می‌کند. امروزه تلقیح مصنوعی به عنوان یک روش کارامد در جانوران مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد، پس شناسایی روش‌هایی که بتواند اسپرم را در بهترین حالت حفظ کند ضروری است. استفاده از تلقیح مصنوعی و استفاده از منی تازه-سرد شده و منی منجمد شده فواید متعددی نسبت به جفت‌گیری طبیعی دارد که می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد: کاهش نیاز برای انتقال حیوانات و عدم نیاز برای قرنطینه‌سازی، افزایش ذخیره ژنتیک موجود در کشور، کاهش ریسک انتقال بیماری در مواقعی‌که حیوان ناشناخته وارد سگ‌دانی برای جفت‌گیری شود و کاهش گسترش بیماری‌های عفونی و همچنین مواقعی که جفتگیری طبیعی دشوار است. تلقیح مصنوعی می‌تواند در سگ ماده توسط منی تازه-سرد شده و یخ زده-ذوب شده انجام شود (۱۸).

در دام کوچک، حین انزال اسپرماتوزوآی بالغ از مجرای دفران به میزراه عبور می‌کند که در آنجا پلاسمای منی به انزال افزوده می‌شود، که عمدتا ترشحات غده پروستات می‌باشد (۸). منی سگ با pH ۳/۶ نسبتا اسیدی به حساب می‌آید. انزال در این دام، دارای سه مرحله است. اولین مرحله قسمت پیش از اسپرم می‌باشد که دارای حجم ۰/۱ تا ۲ میلی‌لیتر بوده و شامل مایع شفاف به همراه یا بدون اسپرم است. دومین مرحله قسمت غنی از اسپرم می‌باشد که بین ۰/۲ تا ۴ میلی‌لیتر بوده و سفید یا شیری است و شامل تعداد زیادی اسپرماتوزوآ می‌باشد و سومین مرحله، قسمت پس از اسپرم یا مایع پروستاتیک است که بین ۳-۱ میلی‌لیتر بوده و یک مایع شفاف می‌باشد و حاوی تعداد کمی اسپرم است و به صورت ضربانی در فواصل زمانی ۱ تا ۴۵ دقیقه رها می‌شود (۱۸).

غلظت اسپرم در انزال سگ بارور بین $۱۰^{۶}$ × ۵۰۰ تا $۱۰^{۶}$ × ۹۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر است و ۷۵ تا ۸۵ درصد این اسپرم‌ها دارای حرکت رو به جلو می‌باشند (۸). بهترین ابزار اندازه‌گیری باروری در جنس نر، توانایی اسپرماتوزوآ در بارور کردن اووسیت و در نتیجه ایجاد جنین می‌باشد (۱۸). از سه قسمت انزال، دو قسمت اول دور ریخته می‌شود و قسمت سوم که غنی از اسپرم می‌باشد را داخل لوله‌ای که تا دمای ۳۷ درجه گرم شده است، جمع‌آوری می‌شود (۱۶).

تحرک اسپرم عامل مهمی در ارزیابی کیفیت مایع منی است. تحرک ناکافی اسپرم به عنوان یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش و یا ناباروری در نظر گرفته شده است. ظرفیت لقاح اسپرم نه تنها به تحرک بلکه به پارامترهای دیگری همچون قابلیت زنده ماندن و میزان یکپارچگی DNA

اسپرم بستگی دارد (۱۶). در مطالعات مختلف نشان داده شده است که، سرد کردن و انجماد سبب اثرات اکسیداتیو قوی بر روی اسپرم شده و با تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، باعث پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) در غشاء اسپرم و انواع تغییرات فیزیکی و شیمیایی همچون آسیب DNA، یکپارچگی غشاء و تحرک اسپرم می‌شود (۶).

برای ذخیره‌سازی کوتاه یا بلند مدت منی، انزال بایستی با یک رقیق‌کننده، رقیق شود تا از اسپرم در حین سرد کردن، انجماد و گرم کردن محافظت کند، همچنین این رقیق‌کننده علاوه بر اینکه منبع انرژی برای اسپرم می‌باشد، pH، اسمولاریته و قدرت یونی اسپرم را نیز در حد تعادل نگه می‌دارد. مواد محافظتی که ممکن است در رقیق‌کننده‌ها استفاده شوند شامل پروتئین‌های شیر، زرده تخم‌مرغ و آلبومین سرم گاو می‌باشد که از غشاهای آکروزومی و میتوکندریایی در برابر شوک سرمایی محافظت می‌کنند (۸). در سال‌های اخیر محققان مواد مختلفی را جهت محافظت از اسپرم در گونه‌های مختلف از جمله نریان (۱۵)، گاو (۱۷) و گاومیش (۷) در هنگام نگهداری منی بصورت سرد و یا منجمد مورد استفاده قرار داده‌اند. یکی از این مواد که بطور سنتی برای محافظت اسپرم سگ استفاده می‌شود زرده تخم‌مرغ می‌باشد (۴). همچنین در مطالعه‌ای دیگر استفاده از گلوکوز و فروکتوز در رقیق‌کننده اسپرم سگ‌ها پیشنهاد شده است (۱۸).

عصاره خرنوب حاوی ویتامین های E و D و C و B۶ و نیاسین و فولیک اسید و پلی فنول و مواد معدنی همچون سدیم، پتاسیم، کلسیم و آهن و فسفر است و همچنین مطالعات گذشته نشان می‌دهد که خرنوب دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد (۲۴). بدلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی خرنوب و اینکه تا به حال به عنوان محافظ اسپرم سگ مورد استفاده قرار نگرفته است، هدف از این مطالعه بررسی اثرات افزودن عصاره خرنوب در رقیق‌کننده اسپرم سگ در طول نگهداری در دمای یخچال می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نحوه تهیه گیاه خرنوب

گیاه خرنوب در این مطالعه از بازار محلی شهر ارومیه تهیه و توسط مرکز منابع طبیعی ارومیه (کد: ۷۱۲۳) شناسایی و تایید گردید.

نحوه عصاره‌گیری *Ceratonia siliqua*

در مرحله اول گیاه خرنوب به همراه دانه‌ها با خردکن، پودر گردیدند. سپس پودر گیاه خرنوب درون اتانول ۹۶ درصد (Merck, Germany) و آب مقطر با نسبت ۵۰-۵۰ ریخته شد و به مدت ۷۲ ساعت باقی ماند. پس از این زمان بوسیله فیلترهای شماره ۴۰ شرکت واتمن، عصاره تهیه شده فیلتر شدند. پس از مراحل فوق عصاره در دمای ۵۰ درجه بوسیله دستگاه روتاری تغلیظ شد و در نهایت عصاره قهوه ای باقی مانده درون آون در دمای ۴۰ درجه خشک گردیدند. عصاره خرنوب بعد از تهیه شدن تا زمان مورد استفاده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۶).

نحوه جمع‌آوری منی

در این بررسی از ۳ قلاده سگ نر سن ۷-۳ ساله برای جمع‌آوری منی استفاده شد. منی سگ‌ها به روش دستی جمع‌آوری گردید و سپس نمونه‌های انزالی از جهت نرمال بودن مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌های منی که دارای $۱۰^{۶} \times ۵۰۰$ به بالا اسپرم و بالای ۸۰ درصد تحرک بودند در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌گیری در هفته دو مرتبه انجام پذیرفت و برای از بین بردن تنوع بین نمونه‌های دامی، هر بار انزال سگ‌ها با یکدیگر ادغام شدند. در ادامه کار، منی توسط سانتریوفوژ با دور ۷۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریوفوژ گردیدند و پلاسمای منی آن دور انداخته شد (۹).

گروه‌بندی نمونه‌های اسپرم

ابتدا منی در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ (حاوی: ۲/۴ گرم تریس هیدروکسی متیل، ۱/۴ گرم اسید سیتریک، ۰/۸ گرم گلوکز، ۱۰۰۰۰۰ IU بنزیل پنی‌سیلین، ۰/۱ گرم استرپتومایسین سولفات، ۲۰ ml زرده تخم مرغ، ۸۰ ml آب مقطر) بطوری که غلظت نهایی آنها $۱۰^{۶} \times ۲۰۰$ اسپرم در میلی‌لیتر باشد، رقیق گردیدند. سپس منی آماده شده با رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ در گروه‌های مختلف آزمایشی شامل: ۱) گروه اول (کنترل) با صفر µg/mL از عصاره هیدروالکلی *Ceratonia siliqua*، ۲) گروه دوم با ۱۰ µg/mL از عصاره هیدروالکلی *Ceratonia siliqua*، ۳) گروه سوم با ۲۰ µg/mL از عصاره هیدروالکلی *Ceratonia siliqua*، ۴) گروه چهارم با ۴۰ µg/mL از عصاره هیدروالکلی *Ceratonia siliqua*، ۵) گروه شم (آب مقطر به عنوان حلال) تقسیم شدند(۳). نمونه‌ها پس از جمع‌آوری، برای کیفیت و توانایی نگهداری آن در دمای یخچال در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی تحرک و شاخص‌های تحرک توسط CASA

جهت بررسی تحرک و شاخص‌های تحرک، از سیستم آنالیز اسپرم کاسا (Videotest, St. Petersburg, Russia ;۳,۲ Test Sperm) استفاده شد. در این بررسی ۵ µl از هر گروه بر روی لام قرار گرفته بر روی صفحه گرم میکروسکوپ نوری (Tokyo, Japan ,Olympus, BX۴۱) ریخته و در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از نگهداری در دمای یخچال، تحرک کلی، حرکت پیشرونده روبه جلو و شاخصه‌های حرکتی اسپرم شامل: VCL, VSL, VAP, LIN, STR, BCF مورد ارزیابی قرار گرفتند(تعداد ۵۰۰ اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت).

بررسی قابلیت زنده مانی

جهت بررسی میزان قدرت زنده‌مانی اسپرم‌ها رنگ‌آمیزي ائوزین-نگروزین مورد استفاده قرار گرفت. مبنای تشخیص اسپرم‌هاي زنده از اسپرم‌هاي مرده در این روش رنگ‌آمیزی بر این اصل استوار است که در اثر آسیب به غشاء پلاسمایی، اسپرم‌ها در برابر رنگ مذکور نفوذپذیر می‌گردند. بنابراین آن دسته از اسپرم‌هایی که رنگ گرفته بودند به عنوان اسپرم‌هاي مرده در نظر گرفته شدند. در این مطالعه، تعداد ۲۰۰ اسپرم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل در قالب درصد بیان شدند (۳۱).

بررسی آسیب DNA اسپرم

جهت بررسی آسیب DNA اسپرم‌ها از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج استفاده گردید. اسمیرهای تهیه شده، بعد از فیکس شدن در محلول فیکساتور

کارنوی، ، به مدت ۵ دقیقه با رنگ آکریدین اورانج رنگ‌آمیزی شدند. سپس اسلایدها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Model GS۷, Nikon Co., Tokyo, Japan) بررسی گردیدند. در این بررسی ۲۰۰ عدد اسپرم مورد بررسی قرار گرفت که اسپرم‌های با DNA یکپارچه به رنگ سبز و DNA دناتوره به رنگ زرد تا نارنجی دیده شدند (۲۷).

بررسی یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم

بررسی یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم با استفاده از روش hypo-osmotic swelling test (HOST)مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۸). برای این بررسی، ۵۰ میکرولیتر از مایع منی به ۵۰۰ میکرولیتر محلول HOST (سدیم سیترات ۰/۷۳۵ گرم و فروکتوز ۱/۳۵۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) اضافه شد و در حمام آب گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۴۰ دقیقه انکوبه گردیدند. بعد از گذشت ۶۰ دقیقه، ۵ میکرولیتر از محلول فوق بر روی لام قرار داده شده و اسپرم‌های با دم خمیده (سالم) و دم صاف(ناسالم) مورد شمارش قرار گرفتند.

آنالیزهای آماری

داده‌های این مطالعه با استفاده از بسته نرم‌افزاری SPSS نسخه ۲۶ مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند و تمامی نتایج بر اساس میانگین ± خطای استاندارد بیان شدند. جهت مقایسه بین گروه‌ها آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن تست‌های مقایسه‌ای چندگانه توکی مورد استفاده قرار گرفت و مقدار P<۰/۰۵ برای تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

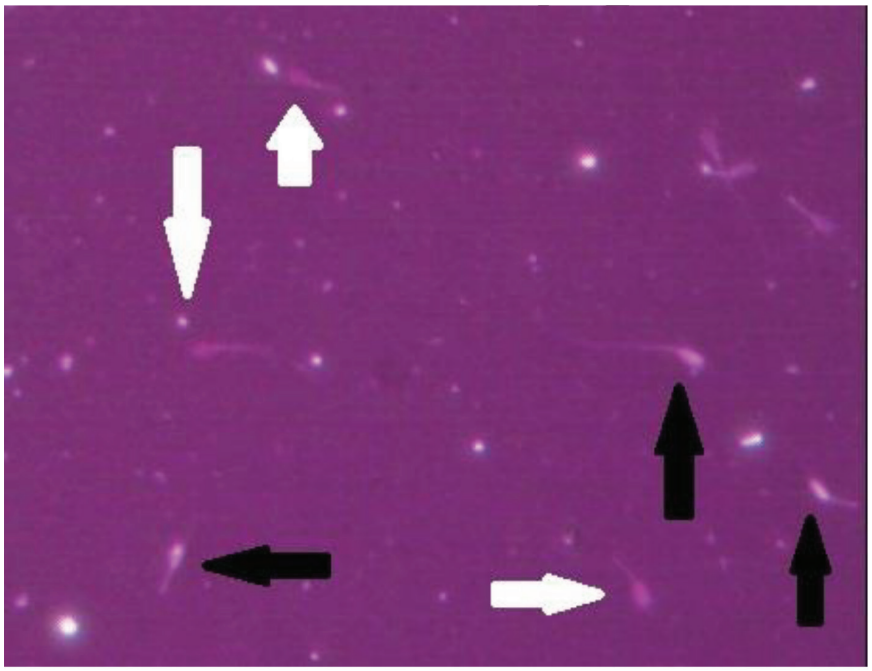
بر اساس نتایج بدست آمده حاصل از بررسی تحرک کلی اسپرم نشان داد که بیشترین تحرک کلی در بین گروه‌های درمانی، در گروه ۲۰ میکروگرم عصاره خرنوب می‌باشد که به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر از گروه کنترل و کنترل شم بود. گروه‌های درمانی ۱۰ میکروگرم عصاره خرنوب و ۴۰ میکروگرم عصاره خرنوب تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل و کنترل شم نداشتند (جدول ۱).

حرکت پیش‌رونده رو به جلو

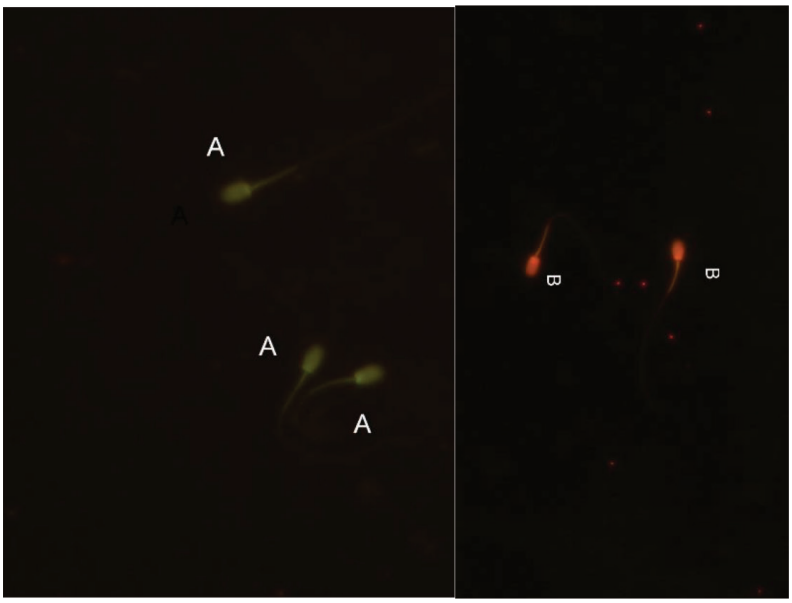
نتایج حاصل از حرکت پیش‌رونده رو به جلو به وسیله نرم‌افزار کاسا مشخص نمود که بیشترین حرکت پیش رونده رو به جلو در بین گروه‌های درمانی، مختص گروه ۲۰ میکروگرم عصاره خرنوب می‌باشد که تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) با گروه‌های کنترل و کنترل شم داشتند (جدول ۱).

شاخص میانگین سرعت اسپرم در حرکت منحنی شکل (VCL)

نتایج حاصل از بررسی شاخص VCL در نرم‌افزار کاسا نشان داد که شاخص VCL در بین گروه‌های درمانی در گروه ۲۰ میکروگرم بیشترین مقدار را داراست که به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر از گروه کنترل



شکل ۱- ارزیابی قابلیت زنده ماندن؛ فلش سیاه) اسپرم های قرمز رنگ نشان دهنده اسپرم های مرده می باشد؛ فلش سفید) اسپرم های بی رنگ نشان دهنده اسپرم های زنده می باشد. رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین. بزرگنمایی ۲۰۰x.



شکل ۲- ارزیابی آسیب DNA در اسپرم ها ؛ A) اسپرم های با سر سبز رنگ نشان دهنده DNA طبیعی و دست نخورده می باشد؛ B) اسپرم های با سر نارنجی نشان دهنده DNA دناتوره شده می باشد. رنگ آمیزی آکریدین اورنج. بزرگنمایی X ۴۰۰.

شکل ۳- انجام تست HOS در گروه های مختلف درمانی عصاره هیدروالکلی خرنوب. A) اسپرماتوزوئید دارای غشاء پلاسمایی سالم، B) اسپرماتوزوئید دارای غشاء پلاسمایی آسیب دیده.

و کنترل شم بود (جدول ۲).

شاخص سرعت اسپرم در حرکت مستقیم (VSL)

میزان شاخص VSL نشان داد که دوز ۲۰ میکروگرم عصاره هیدروالکلی خرنوب بالاترین (P<۰/۰۵) تاثیر را بر روی این شاخص داشته است (جدول ۲).

شاخص سرعت متوسط اسپرم در مسیر میانگین (VAP)

شاخص VAP نیز نشان داد همانند VSL بالاترین میزان تاثیر را دوز ۲۰ میکروگرم خرنوب، نسبت به گروه کنترل و کنترل شم دارا بود (جدول ۲).

شاخص درصد خطی بودن حرکت اسپرم (LIN) و شاخص مستقیم‌الخط بودن مسیر میانگین حرکت اسپرم (STR)

بررسی شاخص LIN و STR نشان داد که بین گروه‌های درمانی و گروه کنترل و کنترل شم هیچ گونه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۲).

شاخص فرکانس حرکت جانبی اسپرم (BCF)

ارزیابی شاخص BCF نشان داد که گروه ۲۰ میکروگرم می‌تواند بیشترین (P<۰/۰۵) تاثیر را نسبت به گروه ۴۰ و ۱۰ میکروگرم خرنوب در مقایسه با گروه‌های کنترل و کنترل شم بر روی اسپرم‌ها داشته باشد (جدول ۲).

شاخص حداکثر دامنه حرکت جانبی اسپرم (ALH)

شاخص ALH نشان داد بیشترین تأثیر این شاخص (P<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل و کنترل شم را گروه ۲۰ میکروگرم خرنوب داشت (جدول ۲).

قابلیت زنده‌مانی

براساس نتایج بدست آمده از رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین جهت ارزیابی قابلیت زنده‌مانی اسپرم‌ها نشان داده شد که بیشترین درصد اسپرم‌های زنده (شکل ۱) پس از ساعات صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ در گروه درمانی µg/ml ۲۰ عصاره خرنوب مشاهده گردید که به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر از گروه‌های کنترل، کنترل شم و گروه‌های درمانی ۱۰ و ۴۰ میکروگرم عصاره خرنوب بود. همچنین نتایج نشان داد که در بین گروه درمانی ۱ میکروگرم عصاره خرنوب با گروه کنترل و کنترل شم اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، ولی با گروه درمانی ۴۰ میکروگرم عصاره خرنوب اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) وجود دارد (جدول ۳).

یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم (تست HOS)

نتایج حاصل از بررسی یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم در جدول ۳ آمده است. براساس این نتایج نشان داده شد که بیشترین یکپارچگی غشایی (شکل ۲) در گروه ۲۰ میکروگرم عصاره خرنوب و سپس در گروه ۴۰ میکروگرم عصاره خرنوب وجود دارد (P<۰/۰۵). همچنین این نتایج نشان داد که بین گروه درمانی ۱۰ میکروگرم عصاره خرنوب و گروه‌های کنترل و کنترل شم، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۳).

آسیب DNA اسپرم

نتایج بدست آمده از بررسی میزان آسیب DNA اسپرم، نشان داد که گروه ۲۰ میکروگرم عصاره خرنوب کمترین آسیب DNA اسپرم (شکل ۳) را در بین گروه‌های درمانی به خود اختصاص داده است که به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) کمتر از گروه کنترل و کنترل شم بود. این نتایج

جدول ۱- مقایسه میانگین تحرک کلی اسپرم و حرکت پیشرونده رو به جلو اسپرم سگ در گروه های مختلف درمانی عصاره هیدروالکلی خرنوب.

	ساعت	کنترل	کنترل شم	۱۰ µg/mL	۲۰ µg/mL	۴۰ µg/mL
تحرک کلی (٪)	صفر	۸۳/۷۵ ± ۲/۱۴#a	۸۱/۹۸ ± ۳/۳۵#a	۸۴/۷۰ ± ۲/۵۰#a	۸۴/۵۸ ± ۲/۳۱#a	۸۳/۱۲ ± ۳/۲۶#a
	۲۴	۷۰/۴۴ ± ۲/۷۰ aψ	۷۰/۱۵ ± ۳/۶۲ aψ	۷۲/۴۲ ± ۳/۳۴ acψ	۸۱/۴۳ ±۲/۱۶#b	۷۵/۳۷ ±۲/۲۱ cψ
	۴۸	۵۵/۰۱ ± ۲/۸۶ aφ	۵۴/۴۲ ± ۲/۲۰ aφ	۵۷/۶۴ ±۲/۵۱ acφ	۶۴/۹۵ ±۳/۷۵ bψ	۵۹/۴۵ ±۳/۰۷ cφ
	۷۲	۳۱/۸۹ ± ۱/۰۹ aϒ	۳۱/۵۹ ± ۲/۱۶ aϒ	۳۳/۳۲ ±۲/۱۹ aϒ	۴۵/۰۷ ±۱/۵۰ bφ	۳۸/۱۰ ±۱/۴۳ cϒ
حرکت پیشرونده (٪)	صفر	۴۷/۲۰ ± ۱/۵۳#a	۴۷/۹۱ ± ۱/۲۹#a	۴۷/۲۲ ± ۱/۴۰#a	۴۸/۸۷ ± ۱/۹۸#a	۴۷/۲۴ ± ۲/۴۴#a
	۲۴	۳۵/۸۶ ± ۲/۰۷ aψ	۳۵/۱۹ ± ۱/۱۶ aψ	۳۷/۰۱ ± ۲/۵۳ acψ	۴۶/۳۵ ±۱/۴۱#b	۴۰/۷۸ ±۲/۵۰ cψ
	۴۸	۲۴/۰۵ ± ۱/۳۸ aφ	۲۳/۳۷ ± ۱/۲۴ aφ	۲۷/۵۴ ±۱/۶۰ acφ	۳۵/۴۹ ±۲/۸۵ bψ	۳۰/۲۵ ±۱/۱۴ cφ
	۷۲	۱۶/۳۹ ± ۱/۶۳ aϒ	۱۶/۶۷ ± ۱/۳۵ aϒ	۱۷/۴۹ ±۱/۱۴ acϒ	۲۴/۰۸ ±۱/۰۲ bcφ	۲۰/۳۷ ±۰/۶۷ cϒ

- حروف مختلف (a, b, c, d) نشانگر اختلاف معنی دار بین داده ها می باشد (P<۰/۰۵). (داده ها به صورت ردیفی با هم مقایسه شدند).

- اشکال مختلف (ψ, φ, ϒ ,#) نشانگر اختلاف معنی دار بین داده ها می باشد (P<۰/۰۵). (داده ها به صورت ستونی با هم مقایسه شدند).

جدول ۲- مقایسه میانگین شاخص VCL ، میانگین شاخص VSL ، میانگین شاخص VAP ، میانگین درصد شاخص LIN ، میانگین درصد شاخص STR ، فرکانس حرکات جانبی (BCF) و حداکثر دامنه حرکات جانبی (ALH) در اسپرم سگ در گروه های مختلف درمانی عصاره خرنوب.

	ساعت	کنترل	کنترل شم	۱۰ µg/mL	۲۰ µg/mL	۴۰ µg/mL
VCL (µm/S)	صفر	۱۰۶/۱۴ ± ۴/۵۰#a	۱۰۴/۴۶ ± ۶/۲۷#a	۱۰۶/۸۲ ± ۴/۷۵#a	۱۰۷/۳۵ ± ۵/۲۲#a	۱۰۶/۰۱ ± ۴/۴۱#a
	۲۴	۹۲/۵۶ ± ۴/۴۸ aψ	۹۳/۷۹ ± ۴/۲۹ aψ	۹۵/۵۷ ± ۴/۸۶ acψ	۱۰۲/۲۱ ±۳/۱۰#b	۹۶/۸۳ ±۴/۱۹ aψ
	۴۸	۷۸/۱۸ ± ۳/۱۵ aφ	۷۷/۱۸ ± ۳/۷۴ aφ	۸۰/۹۱ ±۵/۴۵ aφ	۸۵/۶۰ ±۴/۹۸ bψ	۸۲/۲۵ ±۳/۷۲ abφ
	۷۲	۵۷/۰۱ ± ۴/۴۲ aϒ	۵۷/۶۱ ± ۳/۲۷ aϒ	۵۸/۱۰ ±۳/۳۹ aϒ	۶۲/۸۳ ±۳/۵۰ bφ	۶۰/۱۹ ±۳/۳۴ abϒ
VSL (µm/S)	صفر	۷۲/۴۷ ± ۲/۵۶#a	۷۲/۲۳ ± ۱/۱۳#a	۷۲/۶۸ ± ۱/۶۷#a	۷۵/۲۰ ± ۲/۳۴#a	۷۴/۵۱ ± ۲/۳۶#a
	۲۴	۶۵/۹۹ ± ۲/۳۲ aψ	۶۴/۴۷ ± ۲/۵۰ aψ	۶۶/۹۱ ± ۲/۵۹ acψ	۷۰/۴۸ ±۱/۴۷#b	۶۷/۶۸ ±۲/۹۲ abψ
	۴۸	۵۳/۵۹ ± ۱/۴۹ aφ	۵۳/۱۹ ± ۱/۱۶ aφ	۵۶/۶۰ ±۱/۷۲ acφ	۶۶/۰۹ ±۲/۳۰ bψ	۵۹/۱۴ ±۱/۳۵ cφ
	۷۲	۴۸/۰۱ ± ۱/۲۰ aϒ	۴۹/۴۶ ± ۱/۰۹ aϒ	۵۰/۲۵ ±۱/۴۵ abϒ	۵۳/۹۷ ±۱/۱۸ bφ	۵۱/۵۰ ±۱/۸۳ abϒ
VAP (µm/S)	صفر	۷۹/۲۶ ± ۳/۸۱#a	۷۹/۴۸ ± ۲/۵۸#a	۸۰/۹۴ ± ۳/۷۴#a	۸۰/۲۵ ± ۳/۴۲#a	۸۰/۹۲ ± ۴/۸۹#a
	۲۴	۶۵/۲۴ ± ۳/۵۹ aψ	۶۵/۹۱ ± ۳/۴۴ aψ	۶۷/۲۵ ± ۳/۶۲ acψ	۷۴/۶۳ ±۲/۲۱ bψ	۶۹/۸۵ ±۳/۳۶ cψ
	۴۸	۵۸/۰۷ ± ۲/۶۴ aφ	۵۹/۱۳ ± ۳/۴۱ aφ	۵۹/۷۳ ±۳/۹۵ acφ	۶۴/۰۱ ±۳/۰۹ bφ	۶۲/۵۰ ±۲/۴۳ bcφ
	۷۲	۵۱/۴۹ ± ۲/۹۷ aϒ	۴۹/۵۱ ± ۱/۶۵ aϒ	۵۰/۰۷ ±۲/۸۴ aϒ	۵۵/۲۲ ±۲/۲۳ bϒ	۵۲/۳۸ ±۲/۱۵ aϒ
(٪) LIN	صفر	۶۱/۱۴ ± ۱/۶۷#a	۶۱/۴۹ ± ۲/۲۱#a	۶۱/۵۴ ± ۲/۰۷#a	۶۱/۰۱ ± ۱/۴۳#a	۶۰/۸۳ ± ۲/۲۵#a
	۲۴	۶۰/۲۰ ± ۲/۱۴#a	۶۱/۳۹ ± ۱/۹۴#a	۶۰/۵۹ ± ۲/۱۹ a#ψ	۶۱/۱۷ ±۱/۰۵#a	۶۱/۶۵ ±۱/۴۹#a
	۴۸	۵۷/۳۲ ± ۱/۳۶ aψ	۵۷/۶۵ ± ۲/۵۳ aψ	۵۸/۱۵ ±۱/۲۳ aψ	۵۹/۴۰ ±۲/۳۴#a	۵۸/۰۷ ±۲/۴۱#a
	۷۲	۵۴/۲۶ ± ۱/۶۵ aψ	۵۳/۸۲ ± ۱/۳۹ aψ	۵۴/۳۹ ±۱/۷۸ aψ	۵۵/۲۴ ±۱/۸۵ aψ	۵۴/۵۶ ±۱/۷۸ aψ
(٪) STR	صفر	۸۵/۶۷ ± ۳/۳۱#a	۸۴/۱۵ ± ۳/۲۶#a	۸۵/۵۲ ± ۳/۴۳#a	۸۵/۷۰ ± ۳/۲۰#a	۸۵/۹۸ ± ۳/۳۹#a
	۲۴	۸۳/۱۹ ± ۳/۷۵#a	۸۳/۷۶ ± ۳/۴۴#a	۸۳/۲۹ ± ۲/۹۸#a	۸۴/۴۶ ±۳/۷۵#a	۸۴/۶۲ ±۳/۴۸#a
	۴۸	۷۸/۴۳ ± ۳/۵۴ aψ	۷۶/۲۰ ± ۳/۸۶#a	۷۷/۴۷ ±۲/۶۶ aψ	۷۷/۵۱ ±۲/۲۹ aψ	۷۷/۰۶ ±۳/۹۶ aψ
	۷۲	۷۳/۰۹ ± ۳/۶۷ aφ	۷۲/۴۵ ± ۳/۷۹ aψ	۷۳/۷۹ ±۳/۹۳ aφ	۷۴/۲۲ ±۳/۴۶ aψ	۷۳/۳۵ ±۲/۰۴ aφ
BCF (Hz)	صفر	۲۳/۱۰ ± ۱/۲۳#a	۲۳/۴۵ ± ۱/۴۹#a	۲۳/۲۴ ± ۱/۷۱#a	۲۳/۶۲ ± ۱/۳۶#a	۲۳/۱۰ ± ۱/۵۲#a
	۲۴	۲۱/۶۸ ± ۱/۴۶#a	۲۰/۱۹ ± ۱/۹۲#a	۲۱/۹۱ ± ۱/۰۹ a#ψ	۲۳/۳۹ ±۱/۴۷#a	۲۳/۲۵ ±۱/۷۹#a
	۴۸	۱۷/۲۵ ± ۱/۳۸ aψ	۱۷/۷۸ ± ۱/۰۶ a#ψ	۱۸/۸۵ ±۱/۵۴ aψφ	۲۲/۶۰ ±۱/۴۱#b	۱۹/۵۴ ±۱/۸۵ abψ
	۷۲	۱۵/۴۸ ± ۱/۵۵ aψ	۱۵/۹۳ ± ۱/۳۴ aψ	۱۵/۶۷ ±۱/۲۹ aφ	۲۰/۱۹ ±۱/۸۳#b	۱۶/۷۳ ±۱/۱۹ aψ
ALH (µm)	صفر	۴/۹۳ ± ۰/۳۰#a	۴/۲۵ ± ۰/۲۳#a	۴/۳۶ ± ۰/۳۵#a	۴/۹۹ ± ۰/۲۷#a	۴/۸۱ ±۰/۲۲#a
	۲۴	۴/۷۴ ± ۰/۲۴#a	۴/۸۹ ± ۰/۲۰#a	۴/۷۳ ± ۰/۱۷#a	۴/۴۹ ±۰/۰۷#a	۴/۴۵ ±۰/۱۹#a
	۴۸	۳/۸۶ ± ۰/۱۸ aψ	۳/۵۰ ± ۰/۲۶ *aψ*	۳/۴۸ ±۰/۱۹ aψ	۴/۱۷ ±۰/۳۶ a#ψ	۴/۹۳ ±۰/۱۳#a
		۲/۳۵ ± ۰/۱۱ aφ	۲/۷۶ ± ۰/۱۳ acφ	۲/۹۵ ±۰/۲۲ acφ	۳/۷۹ ±۰/۱۸ bψ	۳/۱۲ ±۰/۲۴ bcψ

- حروف مختلف **(a, b, c, d)** نشانگر اختلاف معنی دار بین داده ها می باشد (P<۰/۰۵). (داده ها به صورت ردیفی با هم مقایسه شدند).

- اشکال مختلف **(ψ, φ, ϒ ,#)** نشانگر اختلاف معنی دار بین داده ها می باشد (P<۰/۰۵). (داده ها به صورت ستونی با هم مقایسه شدند).

همچنین نشان داد که گروه درمانی ۱۰ میکروگرم عصاره خرنوب تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل و کنترل شم ندارد (جدول ۳).

میزان فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی

نتایج حاصل از بررسی فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی مشخص نمود که در بین گروه‌های درمانی، بیشترین فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی مربوط به گروه ۲۰ میکروگرم عصاره خرنوب است که تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) با گروه کنترل و کنترل شم دارد (جدول ۴).

میزان پراکسیداسیون لیپیدی

بررسی نتایج حاصل از بررسی پراکسیداسیون لیپیدی نشان داد که بیشترین میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه کنترل و کنترل شم دیده شد و گروه ۲۰ میکروگرم عصاره خرنوب توانست میزان پراکسیداسیون لیپیدی را بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) کاهش دهد (جدول ۴).

بحث

بدون تردید کیفیت مایع منی به طور مداوم در طول سردخانه در ۴ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد (۱۸) که می‌تواند توسط تحقیقات ما اثبات شود. در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی خرنوب در رقیق‌کننده بر پایه تریس در حین نگهداری در دمای یخچال مورد بررسی قرار گرفت. Michael و همکاران (۱۳) نشان دادند که کاهش کیفیت اسپرم به افزایش گونه‌های اکسیژن فعال مربوط می‌باشد. اسپرم حاوی نسبت بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) و نسبت پایین کلسترول به فسفولیپیدها است که باعث می‌شود مورفولوژی غشاء اسپرم نسبت به تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد با پراکسیداسیون متعاقب لیپید حساس باشد (۱۱). رادیکال‌های آزاد می‌توانند بطور سریع و غیراختصاصی با مولکول‌های زیستی واکنش نشان دهند. که این امر منجر به ایجاد و توسعه انواع آسیب‌های سلولی از جمله پراکسیداسیون غشاء پلاسمایی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و اسید نوکلئیک، آپوپتوزیس و نکروز می‌شوند که خود در نهایت منجر به کاهش قدرت زیست‌پذیری و تکوین جنین‌های آزمایشگاهی می‌شود (۲۵). مطالعات مختلف نشان‌دهنده پتانسیل محافظتی گیاه خرنوب در برابر استرس اکسیداتیو می‌باشد (۲۹، ۲۱)، همچنین در مطالعات دیگر نشان داده شده است که عصاره گیاه خرنوب می‌تواند، دستگاه گوارش را در برابر اثرات مصرف الکل محافظت کند (۲۰). همچنین مشخص شده است که عصاره خرنوب دارای اثرات آنتی‌باکتریال (۱۲)، ضد سرطانی (۱) و آنتی‌اکسیدانی (۲) نیز می‌باشد، که

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم، میانگین درصد قابلیت زنده مانی اسپرم و میانگین درصد آسیب DNA اسپرم سگ در گروه های مختلف درمانی عصاره هیدروالکلی خرنوب.

	ساعت	کنترل	کنترل شم	۱۰ µg/mL	۲۰ µg/mL	۴۰ µg/mL
زنده مانی (٪)	صفر	۸۱/۲۳ ± ۲/۵۵#a	۸۱/۳۹ ± ۳/۴۱#a	۸۲/۴۳ ± ۳/۵۸#a	۸۲/۰۴ ± ۳/۵۰#a	۸۱/۲۶ ± ۴/۷۹#a
	۲۴	۶۹/۷۵ ± ۳/۳۶ aψ	۶۹/۰۵ ± ۳/۲۲ aψ	۷۲/۹۰ ± ۳/۲۵ acψ	۷۹/۱۰ ±۲/۹۶#bc	۷۵/۳۴ ±۳/۴۳ cψ
	۴۸	۵۰/۱۱ ± ۲/۵۳ aφ	۵۱/۳۶ ± ۲/۰۹ aφ	۵۵/۳۴ ±۴/۹۲ bφ	۶۴/۵۶ ±۳/۴۶ cψ	۵۸/۰۵ ±۳/۵۶ bφ
	۷۲	۳۴/۶۷ ± ۲/۱۲ aϒ	۳۴/۲۱ ± ۳/۷۴ aϒ	۳۶/۰۲ ±۲/۵۶ aϒ	۴۷/۹۴ ±۲/۴۹ bφ	۴۰/۸۷ ±۲/۴۲ cϒ
HOST (٪)	صفر	۸۶/۵۹ ± ۳/۲۰#a	۸۶/۲۰ ± ۲/۸۱#a	۸۷/۲۵ ± ۲/۴۴#a	۸۶/۴۹ ± ۳/۶۱#a	۸۶/۷۳ ± ۳/۲۹#a
	۲۴	۷۳/۱۰ ± ۲/۰۹ aψ	۷۳/۰۵ ± ۳/۲۹ aψ	۷۴/۶۳ ± ۳/۸۰ acψ	۸۲/۵۹ ±۴/۱۵#bc	۷۸/۳۶ ±۲/۹۴ cψ
	۴۸	۶۰/۸۷ ± ۳/۳۸ aφ	۵۹/۱۷ ± ۳/۰۶ aφ	۶۲/۹۲ ±۴/۲۵ acφ	۷۰/۸۳ ±۲/۰۴ bcψ	۶۶/۳۱ ±۲/۴۱ cφ
	۷۲	۴۸/۵۰ ± ۲/۲۳ aϒ	۴۸/۶۳ ± ۲/۵۹ aϒ	۵۰/۲۸ ±۳/۳۲ aϒ	۶۱/۹۰ ±۲/۰۸ bφ	۵۷/۸۴ ±۳/۶۲ bϒ
آسیب DNA (٪)	صفر	۳/۲۱ ± ۰/۴۰#a	۳/۳۰ ± ۱/۱۵#a	۳/۵۴ ± ۰/۲۳#a	۳/۰۶ ± ۰/۱۹#a	۳/۳۹ ± ۱/۰۲#a
	۲۴	۵/۷۶ ± ۱/۸۳#a	۵/۶۴ ± ۰/۵۴#a	۵/۲۸ ± ۰/۹۸ a#ψ	۳/۱۵ ±۰/۴۶#a	۴/۷۸ ±۱/۳۹#a
	۴۸	۱۰/۱۷ ± ۱/۵۸ aψ	۱۰/۲۵ ± ۱/۱۹ aψ	۹/۰۳ ±۱/۵۰ acψφ	۴/۴۳ ±۱/۳۳#bc	۶/۴۲ ±۱/۱۵ c#ψ
	۷۲	۱۴/۳۰ ± ۱/۷۴ aφ	۱۵/۰۶ ± ۱/۳۱ aφ	۱۳/۴۹ ±۱/۲۷ aφ	۵/۱۰ ±۱/۴۵#b	۹/۸۵ ±۱/۸۲ cψ

- حروف مختلف (a, b, c, d) نشانگر اختلاف معنی دار بین داده ها می باشد (P<۰/۰۵). (داده ها به صورت ردیفی با هم مقایسه شدند).
- اشکال مختلف (ψ, φ, ϒ ,#) نشانگر اختلاف معنی دار بین داده ها می باشد (P<۰/۰۵). (داده ها به صورت ستونی با هم مقایسه شدند).

مطالعه حاضر نیز موید این موضوع می‌باشد.
نتایج حاصل از مطالعه حاضر به روشنی نشان داد که دوز ۲۰ میکروگرم عصاره هیدروالکلی خرنوب در مایع منی سگ در حین نگهداری در یخچال، می‌تواند از تحرک اسپرم و شاخص‌های حرکتی، محافظت کند. در این مطالعه، تحرک کلی و حرکت پیش رونده رو به جلو، در طول روز اول بالا باقی ماند و متعاقباً، همانطور که انتظار می‌رفت، با زمان ذخیره‌سازی کاهش یافت. کاهش درصد کل تحرک اسپرم ممکن است به این دلیل باشد که اسپرم سگ دارای حساسیت‌های مختلفی نسبت به تغییرات محیط، به ویژه کاهش دما هستند. کاهش تحرک اسپرم پس از سرد شدن و گرم شدن مجدد، به دلیل حساس بودن دما پمپ سدیم و پتاسیم وابسته به ATPase و متعاقباً نشت یون‌ها فرض شده است (۲۳). تحرک اسپرم، که یک معیار مهم در ارزیابی کیفیت مایع منی سگ محسوب می‌شود، باید در یک نمونه عادی بیشتر از ۷۰ درصد باشد (۹). تحرک کلی بالای ۷۰ درصد، به طور قابل ملاحظه‌ای به مواد افزودنی به رقیق‌کننده در طی ذخیره‌سازی بستگی دارد (۹). Verstegen و همکاران نشان دادند که پارامترهای حرکت VAP، VCL و VSL از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند و این پارامترها در میان رقیق‌کننده‌ها و زمان به طور قابل توجهی تفاوت می‌کنند (۳۰). در این مطالعه نشان داده شد که افزودن عصاره خرنوب می‌تواند شاخص‌های حرکتی (VAP، VSL، VCL، LIN، BCF و ALH) را افزایش دهد. این افزایش تحرک مایع منی بدنبال استفاده از عصاره خرنوب را می‌توان بدلیل محتوای بالای مواد فنولیک و فلاونوئیدها موجود در گیاه خرنوب دانست که سبب می‌شود خاصیت آنتی‌اکسیدانی رقیق‌کننده افزایش یافته و در نتیجه باعث جلوگیری از افزایش رادیکال‌های آزاد و یا از بین بردن رادیکال‌های آزاد در حین سرد کردن مایع منی‌شود. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها همچون ویتامین C و E در محیط رقیق‌کننده منی با کاهش تولید ROS در اسپرم و بهبود تحرک اسپرم همراه بوده است (۵). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شده است که تجویز ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم عصاره میوه خرنوب در موش نر، باعث بهبود پارامترهای اسپرم شده است (۲۲). در مطالعه‌ای دیگر که روی موش‌های نابارور صورت گرفته است نشان داده شده است که دوز ۸۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از عصاره خرنوب منجر به افزایش تحرک اسپرم‌ها می‌شود (۲۹).
از آنجا که تحرک یک شاخص از زنده ماندن اسپرم است و همچنین نشان‌دهنده آسیب کمتر DNA اسپرم می‌باشد، نتایج در این مطالعه نشان داد که اسپرم سگ ذخیره‌شده در رقیق‌کننده بر پایه تریس و عصاره هیدروالکلی خرنوب، در شرایط یخچال، می‌تواند برای بیش از ۳ روز زنده بماند و درصد کمتری از DNA آن دچار آسیب می‌شود. کاهش درصد آسیب DNA اسپرم‌ها و همچنین زنده‌مانی اسپرم‌ها را می‌توان بدلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی خرنوب بدلیل دارا بودن اسیدگالیک، اسید کافئیک، اسید کلوروژنیک و اسید سینامیک دانست که باعث می‌شود میزان ROS در سطح اسپرم را کاهش دهد و سبب کاهش آسیب DNA و افزایش زنده‌مانی اسپرم‌ها شود. در مطالعه‌ای نشان داد شده است که اسپرم سگهای نگهدارنده شده در پلاسما مایع منی در ۴ درجه سانتی‌گراد، تنها ۲ روز زنده باقی می‌مانند (۱۹). در اکثر مطالعات مربوط به مایع منی سگ سرد تحرک تا ۴ روز مشاهده شد و میزان تحرک در روز ۴ ذخیره‌سازی بین ۴ تا ۸۰ درصد متغیر بود (۱۸، ۱۳).
استفاده از گیاهان دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌تواند یکی از راه‌های

جدول ۴- مقایسه میانگین میزان تام آنتی اکسیدانی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم سگ در گروه های مختلف درمانی عصاره خرنوب.

	ساعت	کنترل	کنترل شم	۱۰ µg/mL	۲۰ µg/mL	۴۰ µg/mL
(TAC (mmol/L	صفر	۱/۹۸ ± ۰/۲۴#a	۱/۹۷ ± ۰/۲۰#a	۱/۹۸ ± ۰/۲۷#a	۱/۹۹ ± ۰/۱۵#a	۱/۹۸ ± ۰/۱۹#a
	۲۴	۱/۷۵ ± ۰/۱۶ aψ	۱/۷۵ ± ۰/۱۱ aψ	۱/۸۰ ± ۰/۱۳ acψ	۱/۹۵ ±۰/۱۱#b	۱/۸۶ ±۰/۲۳ cψ
	۴۸	۱/۰۷ ± ۰/۱۱ aφ	۱/۰۶ ± ۰/۰۹ aφ	۱/۱۳ ±۰/۲۱ aφ	۱/۸۳ ±۰/۱۹ bψ	۱/۴۵ ±۰/۱۵ cφ
	۷۲	۰/۶۳ ± ۰/۱۵ aϒ	۰/۶۴ ± ۰/۱۷ aϒ	۰/۷۹ ±۰/۰۸ bϒ	۱/۳۶ ±۰/۱۰ cφ	۰/۹۳ ±۰/۱۷ dϒ
(MDA (nmol/ml	صفر	۱/۰۸ ± ۰/۳۲#a	۱/۱۲ ± ۰/۲۱#a	۱/۰۵ ± ۰/۰۷#a	۱/۰۳ ±۰/۱۵#a	۱/۰۳ ± ۰/۱۹#a
	۲۴	۲/۴۵ ± ۰/۲۷ aψ	۲/۴۶ ± ۰/۱۴ aψ	۲/۴۰ ± ۰/۱۹ aψ	۱/۱۹ ±۰/۲۶ bψ	۱/۷۴ ±۰/۰۸ bψ
	۴۸	۵/۶۸ ± ۰/۰۹ aφ	۵/۷۱ ± ۰/۱۸ aφ	۵/۳۲ ±۰/۲۲ aφ	۲/۹۳ ±۰/۱۸ bφ	۳/۴۵ ±۰/۱۳ cφ
	۷۲	۶/۱۳ ± ۰/۲۰ aϒ	۶/۱۰ ± ۰/۱۳ aϒ	۵/۹۱ ±۰/۳۱ aϒ	۲/۲۵ ±۰/۱۰ bϒ	۵/۳۲ ±۰/۲۷ cϒ

- حروف مختلف **(a, b, c, d)** نشانگر اختلاف معنی دار بین داده ها می باشد (P<۰/۰۵). (داده ها به صورت ردیفی با هم مقایسه شدند).
- اشکال مختلف **(ψ, φ, ϒ ,#)** نشانگر اختلاف معنی دار بین داده ها می باشد (P<۰/۰۵). (داده ها به صورت ستونی با هم مقایسه شدند).

مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو اسپرم در زمان نگهداری آن بصورت سرد شده و یا منجمد باشد (۱۰). در مطالعات انجام گرفته قبلی نشان داده شده است که پس از تجویز عصاره خرنوب، سطح سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز افزایش می‌یابد. این اثرات وابسته به دوز بودند و نشان داده شده است که تأثیر دوز بالاتر خرنوب از دوز کم بهتر می‌باشد. این نشان‌دهنده آن است که آنتی‌اکسیدان‌ها شمشیر دو لبه هستند. دوز و مدت زمان مصرف بسیار مهم است و دوز نامناسب یا کوتاه‌مدت می‌تواند مقدار زیادی ROS تولید کند و یا از تولید زیاد ROS جلوگیری کند (۱۴). در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که استفاده از عصاره خرنوب در رقیق‌کننده اسپرم سگ می‌تواند باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش آنتی‌اکسیدان تام نسبت به گروه‌های کنترل و کنترل شم بعد از نگهداری اسپرم در یخچال شود. این کاهش MDA و افزایش TAC به این دلیل است که گیاه خرنوب داراي تركيباتي مانند توكوفرول و استرول‌هاي گياهي می‌باشد که مي‌توانند با اثرات مخرب راديكال‌هاي آزاد تولید شده در هنگام نگهداری منی در یخچال مقابله نموده واسترس اکسیداتیو درون سلولي را به حداقل برسانند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاضر اثرات مفیدی از افزودن ۲۰ میکروگرم عصاره هیدروالکلی خرنوب در رقیق‌کننده مبتنی بر تریس بر تحرک کلی، حرکت پیشرونده و شاخص‌های حرکتی تا ۷۲ ساعت نگهداری منی سگ در ۴ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. علاوه بر این، مشخص شد که عصاره خرنوب می‌تواند میزان پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم‌ها را تا ۷۲ ساعت کاهش و میزان آنتی‌اکسیدانی تام را تا ۷۲ ساعت در اسپرم‌ها افزایش دهد. علاوه بر این، عصاره هیدروالکلی خرنوب توانست میزان زنده‌مانی و یکپارچگی اسپرم را افزایش و میزان آسیب DNA اسپرم را در طول نگهداری منی در یخچال کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که با تصویب و حمایت مالی امکان انجام مطالعه را فراهم آوردند تشکر به عمل می‌آید.

منابع مورد استفاده

1.Corsi, L., Avallone, R., Cosenza, F., Farina, F., Baraldi, C. and Baraldi, M., 2002. Antiproliferative ef-fects of Ceratonia siliqua L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. Fitoterapia, 73(7-8), pp.674-684.

2.Custódio, L., Escapa, A.L., Fernandes, E., Fajardo, A., Aligué, R., Alberício, F., Neng, N., Nogueira, J.M.F. and Romano, A., 2011. Phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic activities of the carob tree (Ceratonia siliqua L.) germ flour extracts. *Plant foods for human nutrition,* 66(1), pp.78-84.

3.Faramarzi, A., Aghaz, F., Bakhtiari, M. and Khazaei, M., 2020. In vitro application of Ceratonia siliqua improved sperm parameters and chromatin quality after vitrifacation in normozoospermic aged men. *Middle East Fertility Society Journal*, 24(1), p.6.

4.Farstad, W., 2009. Cryopreservation of canine semen–new challenges. *Reproduction in Domestic Ani-mals,* 44, pp.336-341.

5.Griveau, J.F. and Lannou, D.L., 1997. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International journal of andrology*, 20(2), pp.61-69.

6.Kim, S.H., Yu, D.H. and Kim, Y.J., 2010. Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Animal reproduction science*, 119(1-2), pp.106-114.

7.Kumar, P., Saini, M., Kumar, D., Balhara, A.K., Yadav, S.P., Singh, P. and Yadav, P.S., 2015. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (Bubalus bubalis) semen. *Animal reproduction science,* 159, pp.38-45.

8.Lecewicz, M., Strzeżek, R., Kordan, W. and Majewska, A., 2018. Effect of extender supplementation with low-molecular-weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine sperma-tozoa. *Journal of veterinary research*, 62(2), pp.221-227.

9.Linde-Forsberg, C., 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended se-men. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 21(3), pp.467-485.

10.Mahdiani, E., 2018. Effect of Carob (Ceratonia siliqua L.) oral supplementation on changes of semen parameters, oxidative stress, inflammatory biomarkers and reproductive hormones in infertile men. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences,* 23(3).

11.Maxwell, W.M.C. and Watson, P.F., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science,* 42(1-4), pp.55-65.

12.Meziani, S., Oomah, B.D., Zaidi, F., Simon-Levert, A., Bertrand, C. and Zaidi-Yahiaoui, R., 2015. Anti-bacterial activity of carob (Ceratonia siliqua L.) extracts against phytopathogenic bacteria Pectobacte-rium atrosepticum. *Microbial pathogenesis*, 78, pp.95-102.

13.Michael, A.J., Alexopoulos, C., Pontiki, E.A., Hadjipavlou-Litina, D.J., Saratsis, P., Ververidis, H.N. and Boscos, C.M., 2009. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Animal reproduction science*, 112(1-2), pp.119-135.

14.Mohammadi, S., Safari, F., Seyedi, Z., Seyed Hosseini, E., Karimi, F., Mohammadi, M., Karimi, M., Del-shad, A., Abtahi, H. and Mohammadzadeh, F., 2016. The effect of different doses of N-acetyl cysteine on biochemical and histopathological parameters in kidney of formalin-treated mice. *Journal of Ker-man University of*

Medical Sciences, 23(5), pp.607-617.
15.Mutalik, S., Salian, S.R., Avadhani, K., Menon, J., Joshi, H., Hegde, A.R., Kumar, P., Kalthur, G. and Adi-ga, S.K., 2014. Lipo-some encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently re-place chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Systems biology in reproductive medicine,* 60(3), pp.183-188.
16.Nabeel, A.H.T., Jeon, Y. and Yu, I.J., 2019. Use of polyvinyl alcohol as a chemically defined compound in egg yolk-free ex-tender for dog sperm cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals,* 54(11), pp.1449-1458.
17.Pillet, E., Labbe, C., Batellier, F., Duchamp, G., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E. and Magistrini, M., 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extend-er. *Theriogenology*, 77(2), pp.268-279.
18.Ponglowhapan, S., Essén-Gustavsson, B. and Forsberg, C.L., 2004. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 62(8), pp.1498-1517.
19.Rota, A., Ström, B. and Linde-Forsberg, C., 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on ca-nine semen stored at 4 C. *Theriogenology*, 44(6), pp.885-900.
20.Rtibi, K., Jabri, M.A., Selmi, S., Souli, A., Sebai, H., El-Ben-na, J., Amri, M. and Marzouki, L., 2015. Gas-troprotective effect of carob (Ceratonia siliqua L.) against ethanol-induced oxidative stress in rat. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), p.292.
21.Rtibi, K., Selmi, S., Grami, D., Saidani, K., Sebai, H., Amri, M., Eto, B. and Marzouki, L., 2017. Ceratonia siliqua L.(immature carob bean) inhibits intestinal glucose absorption, improves glu-cose tolerance and protects against alloxan-induced diabetes in rat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8), pp.2664-2670.
22.Sadat, S.S., Mohammadi, S., Sazegar, G., Fazel, A., Ebrahimza-deh, A., Mobarhan, M.G., Beheshti, F., Attari, S.S. and Tavallaei, S., 2019. Effects of Carob Fruit Extract on Spermatogenesis, Anti-oxidant Sta-tus, and Apoptosis in Adult Male Mice. *Pharmaceuti-cal Sciences*, 25(3), pp.184-189.
23.Saito, K., Kinoshita, Y., Kanno, H. and Iwasaki, A., 1996. The role of potassium ion and extracellular alkalization in reinitiation of human spermatozoa preserved in electrolyte-free solution at 4° C. *Fertility and sterility*, 65(6), pp.1214-1218.
24.Sęczyk, Ł., Świeca, M. and Gawlik-Dziki, U., 2016. Effect of carob (Ceratonia siliqua L.) flour on the antioxidant potential, nutritional quality, and sensory characteristics of fortified durum wheat pas-ta. *Food Chemistry*, 194, pp.637-642.
25.SIKKA, S.C., Rajasekaran, M.A.H.A.D.E.V.A.N. and Hellstrom, W.J., 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of andrology,* 16(6), pp.464-468.
26.Soleimanzadeh, A., Kian, M., Moradi, S. and Mahmoudi, S., 2020. Carob (Ceratonia siliqua L.) fruit hydro-alcoholic extract alleviates reproductive toxicity of lead in male mice: Evidence on sperm param-eters, sex hormones, oxidative stress biomarkers and expression of Nrf2 and iNOS. *Avicenna Journal of Phytomedicine,* 10(1), p.35.
27.Talebi, A.R., Sarcheshmeh, A.A., Khalili, M.A. and Tabibnejad, N., 2011. Effects of ethanol consump-tion on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. Alcohol, 45(4), pp.403-409.
28.Tartaglione, C.M. and Ritta, M.N., 2004. Prognostic value of sper-matological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology,* 62(7), pp.1245-1252.
29.Vafaei, A., Mohammadi, S., Fazel, A., Soukhtanloo, M., Pour, A.M. and Beheshti, F., 2018. Effects of carob (Ceratonia siliqua) on sperm quality, testicular structure, testosterone level and oxidative stress in busulfan-induced infertile mice. *Pharmaceutical Sciences,* 24(2), pp.104-111.
30.Verstegen, J., Iguer-Ouada, M. and Onclin, K., 2002. Computer as-sisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), pp.149-179.
31.Wyrobek, A.J., Gordon, L.A., Burkhart, J.G., Francis, M.W., Kapp Jr, R.W., Letz, G., Malling, H.V., Top-ham, J.C. and Whorton, M.D., 1983. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 115(1), pp.1-72.