DOI: 10.22055/ivj.2018.81971.1895

اثر کاتچین بر پراکسیداسیون لیپیدی و پارامترهای حیاتی اسپرم گاو هلشتاین پس از فرایند انجماد- ذوب

حشمت سپهری‌مقدم[1*]، مژده عمادی[2] و تکتم‌سادات وفا[2]

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۲

چکیده

هدف از مطالعه‌ی حاضر، تأثیر خواص آنتی‌اکسیدانی کاتچین بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی و پارامترهای حیاتی اسپرم گاو نژاد هلشتاین پس از فرایند انجماد- ذوب می‌باشد. در این پژوهش از چهار رأس گاو بالغ نژاد هلشتاین، دو بار در هفته به کمک مهبل مصنوعی نمونه‌های منی جمع‌آوری شد. جهت از بین بردن اثرات فردی دام‌ها، انزال ها به نسبت‌های مساوی با هم مخلوط شدند. نمونه‌ها به صورت مساوی به چهار گروه (۸ تکرار) تقسیم شدند. مقادیر صفر (شاهد)، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاتچین به همراه رقیق‌کننده بر پایه‌ی سیترات- زرده‌ی تخم به نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌های منی پس از طی مراحل سردسازی و تعادل، به مدت ۳۰ روز در داخل تانک ازت نگهداری شدند. پس از فرایند ذوب، میزان مالون‌دی‌آلدئید در نمونه‌های اسپرم با روش الایزا سنجش شد. همچنین، یکپارچگی غشا، میزان تحرک و درصد اسپرم‌های زنده مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج، یکپارچگی غشا، میزان تحرک و درصد اسپرم‌های زنده در نمونه‌های اسپرم تحت تیمار با غلظت‌های ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاتچین در مقایسه با گروه شاهد به صورت وابسته به دوز به طور معنی‌داری افزایش و میزان مالون‌دی‌آلدئید به صورت وابسته به دوز به طور معنی‌داری کاهش یافت. بنابراین، استفاده از کاتچین در رقیق کننده‌ی مایع منی گاو موجب بهبود پارامترهای حیاتی اسپرم و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم پس از فرایند انجماد- ذوب می‌شود.

کلمات کلیدی: کاتچین، پراکسیداسیون لیپیدی، اسپرم، گاو

مقدمه

یکی از فناوری‌های مهم جهت حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی و افزایش ماندگاری اسپرم، حفاظت انجمادی است و به منظور دستیابی به مزایای تلقیح مصنوعی و ذخیره‌سازی طولانی مدت مایع منی به صورت منجمد یک امر ضروری محسوب می‌شود (Purdy 2006). مکانیسم انجماد بر این پایه استوار است که هرگاه سیتوپلاسم موجود در سلول در اثر کاهش دما منجمد شود، فرآیندهای بیوشیمیایی و مولکولی سلول کاهش و یا متوقف می‌شود، در نتیجه بقای سلول افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر فرآیند انجماد با کاهش فعالیت‌های متابولیکی اسپرم امکان ذخیره‌سازی طولانی مدت آن را مهیا می‌کند (Moce and Vicente 2009). طی فرآیند انجماد- ذوب، تنش‌های فیزیکی و شیمیایی در غشای اسپرم به وجود می‌آید و موجب آسیب آکروزوم، تخریب غشا و اختلال در ساختمان میتوکندری‌ها می‌شوند. همچنین کیفیت، زنده‌مانی، تحرک و قدرت باروری اسپرم‌ها کاهش می‌یابد (Vilela et al. 2017).

طی تحقیقات انجام شده، فرایند انجماد اسپرم با تشکیل گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن سبب آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود. این امر از عوامل مهم در کاهش تحرک و باروری اسپرم پس از یخ‌گشایی است (Chatterjee and Gagnon 2001). طی فرایند انجماد، مایع منی در معرض شوک سرمایی قرار می‌گیرد، در نتیجه میزان اکسیداسیون غشا به واسطه درصد بیش‌تر واکنش‌های

[1*] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران E-mail: he.sepehrimoghadam@pnu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[2] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

اکسیداتیو افزایش می‌یابد (Yue et al. 2005). اسپرم پستانداران مملو از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، فسفولیپید و استرول است که بسیار مستعد اثر انواع اکسیژن‌های فعال می‌باشد. این امر سبب به وجود آمدن آسیب‌های ساختمانی اسپرم می‌شود. به طور کلی اغلب اثرات مهم پراکسیداسیون لیپیدی در تمام سلول‌ها، آسیب در ساختار غشا، اختلال در ارگانل‌های داخل سلولی و تغییر فرآیندهای انتقال غشا و اختلال در گیرنده‌های غشایی است (Lucio et al. 2016).

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که سنتز رادیکال‌های آزاد را مهار کرده و یا با فعالیت آن‌ها مقابله می‌کنند (Glasauer and Chandel 2014). سلول‌های اسپرم و مایع منی دارای مکانیسم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشند ولی در فرآیند رقیق‌سازی مایع منی جهت انجماد و ذخیره‌سازی، آنتی‌اکسیدان‌های داخلی موجود در مایع منی کاهش می‌یابند. بنابراین جهت جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو اسپرم، نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدان با منشاء خارجی است (Farhadi et al. 2016). لازم به ذکر است آنتی‌اکسیدان‌های متنوعی مانند بتاهیدروکسی تولوئن، بوتیلایتد هیدروکسی آنیزول و پروپیل گالات جهت محافظت اسپرم در طول فرایند انجماد- ذوب مورد استفاده قرار می‌گیرد (Malo et al. 2011). با این حال، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک (مصنوعی) دارای عوارض متنوعی است که اخیراً محققین و تولید کننده‌های اسپرم منجمد را به جایگزینی آنتی-اکسیدان‌های صناعی با آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی متمایل کرده است (Daghighkia et al. 2015). از طرفی رقیق کردن مایع منی در زمان ذخیره‌سازی امری اجتناب‌ناپذیر است بنابراین افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به مایع منی در زمان ذخیره‌سازی می‌تواند مفید باشد.

کاتچین با فرمول $C_{15}H_{14}O_6$ و وزن مولکولی ۲۹۰/۲۶ گرم بر مول از فراوان‌ترین فلاونوئیدهای چای سبز به شمار می‌رود (Gadkari and Balaraman 2015). کاتچین یک فلاوان۳--ال است و حدود ۲۵ تا ۳۵ درصد از وزن خشک چای سبز را شامل می‌شود، همچنین از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های چای سبز به شمار می‌رود (Gadkari and Balaraman 2015). کاتچین‌های چای سبز شامل اپی‌کاتچین، اپی‌کاتچین گالات، اپی‌گالوکاتچین و اپی-گالوکاتچین-۳- گالات می‌باشند. فراوان‌ترین و فعال‌ترین کاتچین از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی اپی‌گالوکاتچین گالات می‌باشد (Choi et al. 2016). طی تحقیقات انجام شده تجویز عصاره‌ی چای سبز می‌تواند قابلیت تحرک، مورفولوژی طبیعی اسپرم و همچنین قطر لوله‌های اسپرم-ساز، قطر لومن و ضخامت اپی‌تلیوم زایا را در موش‌های صحرایی مصرف کننده‌ی سدیم آرسنیت تا حدود زیادی بهبود بخشد (Shariatzadeh and Mohammadi 2015). همچنین مشخص شده است کاتچین موجود در عصاره‌ی چای سبز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی با مهار استرس-اکسیداتیو ناشی از سدیم آرسنیت، پراکسیداسیون لیپیدی را در اسپرم کاهش داده و بدین ترتیب از مرگ اسپرم‌ها جلوگیری می‌نماید (Shariatzadeh and Mohammadi 2015). تحقیقات نشان داده است کاتچین دارای خواص مهار کننده‌ی رادیکال‌های آزاد بوده و به عنوان آنتی-اکسیدان بیولوژیک عمل می‌کند (Spadiene et al. 2014). همچنین مشخص شده است کاتچین می‌تواند رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل را مهار کند (Spadiene et al. 2014). گزارش شده است کاتچین‌ها علاوه بر اثرات آنتی‌اکسیدانی مستقیم، می‌توانند به طور غیرمستقیم آنتی-اکسیدان‌های درون سلولی بدن را افزایش دهند (Lambert and Elias 2010). همچنین مشخص شده است موش-هایی که کاتچین دریافت کرده‌اند افزایش سطوح آنتی-اکسیدان‌های درونی، از قبیل گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR)، سوپراکسید دسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) را نشان داده‌اند (Lambert and Elias 2010). تحقیقات نشان داده است کاتچین موجود در چای سبز از طریق مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش آسیب اکسیداتیو DNA از القاء آپوپتوز (A) در سلول‌های آسیب دیده جلوگیری می‌کند (Ishii et al. 2008). مطابق

مطالعات انجام شده، گزارشی از تأثیر کاتچین بر اسپرم گاو هلشتاین مشاهده نشد، از طرفی خواص آنتی‌اکسیدانی کاتچین در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است، هدف از این مطالعه تعیین اثر کاتچین بر پراکسیداسیون لیپیدی و پارامترهای حیاتی اسپرم گاو نژاد هلشتاین پس از فرایند انجماد- ذوب می‌باشد.

مواد و روش کار

مطالعه‌ی تجربی حاضر تحت نظارت معاونت آموزشی – پژوهشی دانشگاه پیام نور استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۵ طراحی و اجرا شد. در این پژوهش از منی ۴ راس گاو هلشتاین با شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان و سلامت عمومی و ویژگی‌های تولید مثلی مطلوب در سن ۲ سالگی استفاده شد. گاوها از یک گاوداری خصوصی واقع در جاده‌ی میامی مشهد انتخاب شدند. با استفاده از واژن مصنوعی و به تعداد دو بار در هفته اسپرم‌گیری انجام شد. سپس با هدف از میان برداشتن تأثیرات فردی دام‌ها، نمونه‌های منی هر دام به مقدار مساوی در هر تکرار آزمایشی با هم مخلوط شدند. لازم به ذکر است قبل از انجام اسپرم‌گیری، تمام اجزای واژن مصنوعی به مدت حداقل یک ساعت در دمای ۴۲-۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از جمع‌آوری مایع منی، به منظور بررسی‌های ابتدایی بی درنگ به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌های منی ابتدا از نظر رنگ، عدم آلودگی به ادرار و خون مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه‌هایی که دارای رنگ کرمی، حجم بین ۱۲-۵ میلی‌لیتر، غلظت بیش‌تر از 1×10^{9} سلول اسپرم در هر میلی‌لیتر، درصد حرکت پیشرونده بیش‌تر از ۷۰ درصد و مورفولوژی کم‌تر از ۱۰ درصد غیرطبیعی در هر انزال بودند، به عنوان منی طبیعی در نظر گرفته شد (Gil et al. 2003). در غیر این صورت منی‌های جمع-آوری شده حذف شدند. غلظت اسپرم‌ها توسط دستگاه فتومتر و درصد تحرک پیش رونده به کمک سیستم کاسا تعیین شد.

در این تحقیق از رقیق‌کننده بر پایه سیترات- زرده‌ی تخم مرغ استفاده شد بدین صورت که ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق‌کننده پایه دارای ۶۷ میلی‌لیتر محلول سیترات ۳ درصد، ۲۵ میلی‌لیتر زرده‌ی تخم‌مرغ، ۷ میلی‌لیتر گلیسرول، ۵ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، ۰/۳ میلی-لیتر لینکوپک، ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر تایلوزین می‌باشد. همچنین pH رقیق‌کننده در حدود ۶/۹ تنظیم شد. در رقیق‌سازی اسپرم‌ها از روش دو مرحله‌ای استفاده شد، به نحوی که در مرحله‌ی اول محلول رقیق‌کننده با ۳ درصد گلیسرول (رقیق‌کننده A) و در مرحله‌ی دوم محلول رقیق‌کننده با ۱۱ درصد گلیسرول (رقیق‌کننده‌ی B) به مایع منی افزوده شد. لازم به ذکر است ترکیبات و حجم رقیق‌کننده‌ها به جر درصد گلیسرول، کاملاً یکسان بوده است (Ashrafi et al. 2013). کاتچین (Sigma-Aldrich, Germany) با غلظت‌های ۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به محلول رقیق‌کننده‌ی A افزوده شد.

نمونه‌های منی به ۴ گروه مساوی تقسیم شدند (در هر گروه ۸ تکرار). گروه شاهد (غلظت صفر کاتچین) و سه گروه تحت تیمار با غلظت‌های ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاتچین. پس از ارزیابی اولیه، نمونه‌های منی با غلظت ۵۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده به لوله‌های فالکون حاوی سطوح مختلف کاتچین و رقیق‌کننده‌ی A (رقیق‌کننده حاوی ۳ درصد گلیسرول) اضافه شدند. سپس فالکون‌ها به داخل ظرف آب ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از سرد شدن و تعادل در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد رقیق‌کننده‌ی B (رقیق‌کننده حاوی ۱۱ درصد گلیسرول) با دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به فالکون‌ها اضافه شد تا غلظت نهایی گلیسرول به ۷ درصد برسد. نمونه‌های منی در پایوت-های نیم میلی‌لیتری ریخته شد و توسط پودر پلی‌وینیل الکل بسته‌بندی شدند (Daghighkia et al. 2015). نمونه‌ها به ترتیب به دمای ۴-، ۲۰- و ۸۰-، درجه‌ی سانتی‌گراد رسیدند. سپس پایوت‌ها به تانک ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند و به مدت

۳۰ روز در این دما نگهداری شدند (Shahbazzadeh et al. 2015). پس از ۳۰ روز پایوت‌های حاوی منی منجمد شده از تانک ازت خارج شدند و در داخل حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه یخ‌گشایی شدند. سپس محتویات پایوت درون میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتر تخلیه شد (Daghighkia et al. 2015).

جهت ارزیابی میزان مالون‌دی‌آلدئید، میکروتیوپ‌ها با سرعت ۳۵۰۰ دور دقیقه (RPM)، نیروی نسبی (RCF) g۱۲۳۵ و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس توسط بافر سیترات شستشو و سه مرتبه سانتریفوژ تکرار شد. در نهایت محلول سطحی حذف و اسپرم‌های باقی‌مانده به همراه بافر تریس (Sigma-Aldrich, Germany) به مدت ۲ دقیقه توسط دستگاه هموژنایزر با ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه و در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شدند. جهت جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تمامی مراحل در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد (سانتریفوژ یخچال‌دار) انجام شد و از محلول ۰/۵ میلی‌مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید به عنوان مهارکننده‌ی آنزیم‌های اسپرم استفاده شد (Malek-Mohammadi et al. 2015). میزان مالون دی-آلدئید در پژوهش حاضر توسط روش ELISA، کیت‌های ساخت شرکت فاین تست (Finetest, China) و دستگاه الایزاریدر (Stat Fax-2100, USA) سنجش شد. کیت مالون دی‌آلدئید دارای حساسیت <۱۸/۷۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده‌ی ۲۰۰۰- ۳۱/۲۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

در این پژوهش، جهت بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از آزمون Hypo Osmotic Swelling استفاده شد. پس از یخ‌گشایی، نمونه‌های اسپرم به داخل میکروتیوب تخلیه و به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. سپس قسمت بالای میکروتیوب که حاوی رقیق‌کننده است، جداسازی و پس از آن ۱۰ میکرولیتر اسپرم به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک که حاوی فروکتوز و سیترات سدیم بوده است، اضافه شد. نمونه‌های اسپرم با قرارگرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به سرعت واکنش نشان می‌دهد. واکنش اسپرم‌ها در محیط هایپواسمول به صورت تورم دم نمایان می‌شود. در این حالت اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالمی دارند در محلول واکنش داده ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. در واقع پس از انجام این آزمایش اسپرم-های با دم تاب خورده به عنوان اسپرم‌های زنده و اسپرم-هایی که دم آن‌ها صاف است به عنوان اسپرم مرده تلقی می‌شوند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه از نمونه‌های اسپرم توسط میکروسکوپ معکوس مدل CKX31 (Olympus, Japan) مجهز به دوربین عکاسی و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر تصویربرداری شد. حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید شمارش شد و درصد اسپرم‌های با دم طبیعی (تاب خورده) نسبت به غیر طبیعی (صاف) محاسبه شد (Sadeghipanah et al. 2015).

ارزیابی جنبانی اسپرم‌ها پس از یخ‌گشایی، توسط سیستم آنالیز کامپیوتری مایع منی (CASA) ثبت شد. در این آزمایش فراسنجه‌های ارزیابی جنبانی مانند درصد جنبانی کل (Total Motility: TM)، درصد اسپرم‌های پیش‌رونده (Progressive Movement: PM)، درصد خطی بودن جنبانی اسپرم (Linearity: LIN)، جنبانی عرضی سر (Lateral Displacement of Sperm Head: ALH)، میانگین سرعت اسپرم در مسیر منحنی (Curvilinear Velocity: VCL)، میانگین سرعت اسپرم در مسیر (Average Path Velocity: VAP) و میانگین سرعت اسپرم در مسیر مستقیم (Straight Line Velocity: VSL) محاسبه شد (Mohammadian et al. 2016).

جهت تعیین درصد اسپرم زنده از رنگ‌آمیزی ائوزین – نگروزین استفاده شد. اساس این رنگ‌آمیزی بدین صورت است که رنگ ائوزین به اسپرم‌های مرده نفوذ می-کند، در حالی که اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی ۲۰ ماکرولیتر از نمونه‌های اسپرم روی لام قرار گرفت سپس ۲۰ ماکرولیتر از رنگ مذکور روی آن ریخته شد . پس از ترکیب رنگ با اسپرم و تهیه‌ی گسترش، نمونه‌های اسپرم توسط میکروسکوپ معکوس

مجهز به دوربین عکاسی با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌هایی که صورتی کم رنگ بودند یا تنها بخشی از آن‌ها رنگ گرفته بود، اسپرم زنده در نظر گرفته شد. جهت شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف گسترش تهیه شده تصویربرداری شد و حداقل ۲۰۰ اسپرم مورد شمارش قرار گرفت (Mohammadian et al. 2016, De Graaf et al. 2007).

اطلاعات به دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۰ تحلیل شد. با توجه به این که نتایج به دست آمده کمی است، توسط آزمون کلوموگروف اسمیرنوف فرض طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها بررسی شد (P>۰/۰۵). جهت مقایسه میانگین بین گروه‌های مورد آزمایش از آنالیز واریانس یک‌طرفه و جهت مقایسه زوج گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. همچنین نتایج به دست آمده به همراه محاسبات آماری مربوطه به صورت میانگین±خطای معیار میانگین گزارش شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

تحلیل داده‌های این مطالعه نشان داد افزودن سطوح ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاتچین به رقیق‌کننده‌ی اسپرم، در مقایسه با گروه شاهد (غلظت صفر کاتچین) به صورت وابسته به دوز مصرفی درصد جنبانی کل (TM)، درصد اسپرم‌های پیش‌رونده (PM)، جنبانی عرضی سر (ALH)، میانگین سرعت اسپرم در مسیر منحنی (VCL)، میانگین سرعت اسپرم در مسیر (VAP) و میانگین سرعت اسپرم در مسیر مستقیم (VSL) را به طور معنی‌داری افزایش داد (P<۰/۰۵). این مقایسه برای درصد خطی بودن جنبانی اسپرم (LIN) اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) (جدول ۱).

جدول ۱: تغییرات میانگین ± انحراف معیار جنبانی و فراسنجه‌های سرعتی اسپرم گاو نژاد هلشتاین در اثر غلظت‌های مختلف کاتچین

گروه / شاخص		TM (درصد)	PM (درصد)	LIN (درصد)	ALH (µm)	VCL (µm/s)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)
شاهد		۴۳/۲۵±۶/۲۴	۲۸/۴۰±۳/۱۱	۰/۳۵±۰/۰۸	۱/۵۸±۰/۱۳	۴۰/۶۴±۵/۰۸	۲۰/۷۸±۱/۸۸	۱۳/۴۹±۲/۴۵
کاتچین	۲۰ mg/ml	[a]۶۱/۴۸±۴/۰۵	[a]۴۵/۴۲±۲/۷۱	۰/۳۲±۰/۰۵	[a]۲/۴۹±۰/۲۵	[a]۶۲/۰۵±۲/۳۷	[a]۴۲/۳۵±۲/۱۱	[a]۲۵/۴۶±۳/۴۳
	۳۰ mg/ml	۷۵/۳۰±۵/۱۹ ab	۵۱/۷۵±۲/۵۳ ab	۰/۳۶±۰/۱۱	[ab]۳/۶۳±۰/۳۰	۷۰/۲۲±۵/۴۸ ab	۵۰/۵۷±۳/۲۱ ab	۳۲/۷۵±۲/۵۰ ab
	۴۰ mg/ml	۸۱/۳۰±۳/۷۸ abc	۶۰/۷۱±۴/۰۶ abc	۰/۳۳±۰/۰۶	[abc]۴/۱۸±۰/۵۲	۹۴/۳۴±۴/۱۹ abc	۶۳/۵۲±۳/۰۸ abc	۴۸/۱۹±۳/۱۳ abc
One-way ANOVA p-value		۰/۰۰۶	۰/۰۰۴	۰/۰۶۱	۰/۰۰۸	۰/۰۱۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

نتایج پژوهش حاضر نشان داد درصد یک‌پارچگی غشای سلولی و درصد زنده‌مانی اسپرم در گروه‌های تحت تیمار با سطوح ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاتچین در مقایسه با گروه شاهد به صورت وابسته به دوز مصرفی به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

بر اساس نتایج پژوهش حاضر افزودن سطوح ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاتچین به رقیق‌کننده‌ی اسپرم، در مقایسه با گروه شاهد به صورت وابسته به دوز مصرفی سبب کاهش معنی‌دار مالون دی‌آلدئید شد (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

جدول ۲: تغییرات میانگین ± انحراف معیار درصد یکپارچگی غشای سلولی، درصد زنده‌مانی و میزان مالون‌دی‌آلدئید اسپرم گاو نژاد هلشتاین در اثر غلظت‌های مختلف کاتچین در گروه‌های مختلف

گروه / شاخص		یک‌پارچگی غشا (درصد)	میزان زنده‌مانی (درصد)	مالون دی‌آلدئید (ng/ml)
شاهد		۴۰/۸۵±۲/۸۳	۵۲/۶۰±۳/۶۱	۸۶/۵۱±۳/۸۸
کاتچین	۲۰ (mg/ml)	[a]۵۸/۳۰±۴/۵۵	[a]۶۹/۸۰±۴/۰۲	[a]۶۵/۱۸±۴/۳۰
	۳۰ (mg/ml)	[ab]۷۲/۷۳±۵/۲۸	[ab]۷۷/۱۴±۲/۵۲	[ab]۴۱/۳۰±۳/۴۶
	۴۰ (mg/ml)	[abc]۸۸/۷۳±۴/۵۲	[abc]۸۴/۳۲±۴/۴۰	[abc]۳۲/۵۲±۳/۱۲
One-way ANOVA p-value		۰/۰۰۶	۰/۰۱۴	۰/۰۰۲

بحث

فلاونوئیدها هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در بدن موجود زنده خواص آنتی‌اسیدانی و آنتی‌سرطان دارند (Shariatzade and Mohammadi 2015). مصرف چای سبز موجب افزایش فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز می شود که نشان‌دهنده‌ی اثر آنتی‌اکسیدانی چای سبز می‌باشد و این اثر به کاتچین موجود در آن نسبت داده می‌شود (Lambert and Elias 2010). در پژوهش حاضر اثر کاتچین بر پراکسیداسیون لیپیدی و پارامترهای حیاتی اسپرم گاو نژاد هلشتاین پس از فرایند انجماد- ذوب مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مشخص شد فرایند انجماد- ذوب سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی سلول‌های اسپرم و موجب کاهش کمی پارامترهای حیاتی اسپرم می‌شود. همسو با نتایج پژوهش حاضر محققین نشان دادند فرایند انجماد- ذوب سبب افزایش میزان مالون دی‌آلدئید سلول‌های اسپرم می‌شود که گویای افزایش پراکسیداسیون لیپیدی است (Farhadi et al. 2015). نتایج پژوهشی نشان داد فرایند انجماد- ذوب با افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء اسپرم سبب تغییر یکپارچگی غشاء اسپرم می‌شود (Amini-Pour et al. 2013). در پژوهشی مشخص شد میزان تحرک اسپرم، درصد زنده ماندن و یکپارچگی غشاء اسپرم پس از فرایند انجماد- ذوب کاهش می‌یابد. این امر در نتیجه تنش‌های اکسیداتیو ایجاد می‌شود که با تغییر در سیالیت غشاء، سبب اختلال در تحرک اسپرم می‌شود. از سوی دیگر تغییر در سیالیت غشاء به پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشاء اسپرم نسبت داده شده است (Mohammadian, et al. 2016). در پژوهشی دیگر مشخص شد شاخص‌های میکروسکوپی اسپرم یخ‌گشایی شده مانند میزان تحرک و درصد زنده ماندن و یکپارچگی اسپرم در نتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپیدی کاهش می‌یابد (Daghighkia et al. 2015). محققین به بررسی شاخص‌های حرکتی، میزان گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم منجمد پرداختند و مشخص شده است فرایند انجماد- ذوب با تشکیل گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن و با تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اسپرم، سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود، که از عوامل مهم در کاهش تحرک و باروری اسپرم پس از یخ‌گشایی است (Liu et al. 2016).

پژوهشی به بررسی کیفیت اسپرم منجمد نژادهای مختلف قوچ پرداخت و مشخص شد درصد تحرک، حرکت پیش-رونده و درصد اسپرهای زنده و طبیعی کاهش می‌یابد. این امر به افزایش آسیب‌های اکسیداتیو DNA و تغییر فشار اسمزی در نتیجه تشکیل کریستال‌های یخ، طی فرایند انجماد نسبت داده شد (Dolati Doorbash et al. 2015). همسو با نتایج پژوهش حاضر محققین نشان داده‌اند انجماد اسپرم انسان با ایجاد شوک سرمایی سبب کاهش تحرک اسپرم و کاهش یکپارچگی غشای اسپرم می‌شود (Oberoi et al. 2014). همسو با نتایج پژوهش حاضر مشخص شد فرایند انجماد- ذوب با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی سبب کاهش کیفیت و پارامترهای حیاتی اسپرم از نظر میزان جنبانی، درصد زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء اسپرم و سلامت آکروزوم می‌شود (Farhadi et al. 2015). پژوهشی به بررسی فاکتورهای میکروسکوپیک اسپرم گاومیش پس از فرایند یخ‌گشایی پرداخت و گزارش شد در فرآیند انجماد و رفع انجماد در اثر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشاء، مولکول‌های فعال و رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد می-شود که تحرک پس از یخ‌گشایی، قابلیت زنده‌مانی، فعالیت آنزیمی درون سلولی، باروری و عملکرد اسپرم را مختل می‌کند (Beheshti et al. 2012, Swami et al. 2017). پژوهشی دیگر به بررسی فراسنجه‌های میکروسکوپی اسپرم گاو پس از فرایند انجماد- ذوب پرداخت و مشخص شده است آسیب‌های اکسیداتیو به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد در طی فرایند انجماد- ذوب، یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش باروری اسپرم می‌باشد. همچنین گزارش شده است فرایند انجماد- ذوب سبب کاهش پارامترهای سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی و سرعت میانگین می‌شود و درصد تحرک پیش‌رونده، تحرک کل، درصد زنده‌مانی و میزان یک-پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌های انجماد- یخ‌گشایی شده کاهش می‌یابد (Daghighkia et al. 2015). مقایسه‌ی نتایج پژوهش حاضر با سایر مطالعات انجام شده در این زمینه نشان‌دهنده‌ی همسو بودن اطلاعات به دست آمده است.

در مطالعه‌ی حاضر مشخص شد استفاده از کاتچین در رقیق‌کننده‌ی مایع منی گاو نژاد هلشتاین سبب بهبود پارامترهای حیاتی اسپرم و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم پس از فرایند انجماد- ذوب می‌شود. تحقیقات نشان داده است حفاظت انجمادی توسط آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند با کاهش تشکیل رادیکال آزاد، شرایط سلولی را طوری تغییر دهد که در نهایت سبب حفاظت اسپرم طی فرایند انجماد- ذوب شود (Purdy 2006). از آن جایی که پارامترهای اسپرم بر میزان لقاح مؤثر است لذا به نظر می‌رسد که آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش اثرات منفی شوک‌های اکسیداتیو و نیز بهبود پارامترهای اسپرم و حفظ پارامترهای اسپرم پس از مراحل انجماد به طور قطع می-توانند بر میزان لقاح مؤثر باشد (Purdy 2006). همسو با گزارش‌های موجود مشخص شده است افزودن آنتی-اکسیدان‌های درون سلولی مانند کاتالاز به رقیق‌کننده، سبب بهبود پارامترهای حیاتی اسپرم اسب‌های ترکمن پس از فرایند انجماد- ذوب می‌شود (Seifi Jamadi et al. 2016). همچنین گزارش شده است ترکیبات آنتی-اکسیدانی می‌توانند شاخص‌های حرکتی مانند میانگین شتاب در مسیر مستقیم، شتاب اسپرم در خط مستقیم و دامنه حرکت‌های جانبی اسپرم، همچنین یکپارچگی غشای پلاسمایی و درصد زنده‌مانی اسپرم را به طور مثبتی تحت تأثیر قرار داده و بهبود بخشد (Seifi Jamadi et al. 2016, Mostek et al. 2017). نتایج پژوهشی که به بررسی اثر عصاره‌ی چای سبز بر کیفیت اسپرم قوچ پس از فرایند انجماد- ذوب پرداخته است حاکی از اثر مثبت افزودن عصاره‌ی چای سبز در کاهش میزان پروکسیداسیون لیپیدی در نمونه‌های اسپرم منجمد می-باشد. همچنین مشخص شده است افزودن عصاره‌ی چای سبز به رقیق‌کننده می‌تواند سبب بهبود کیفیت اسپرم قوچ پس از فرایند انجماد- ذوب شود و این امر به پلی‌فنول‌های موجود در چای سبز، مانند کاتچین نسبت داده شده است

(Mehdipour et al. 2016). در پژوهشی به بررسی اثر نقش حفاظتی عصاره‌ی هیدروالکلی چای سبز بر پارامترهای اسپرم در موش‌های آزمایشگاهی در معرض سدیم آرسنیت پرداخته شد و محققین نشان دادند عصاره‌ی چای سبز با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی موجب افزایش تحرک، افزایش درصد زنده‌مانی و افزایش درصد اسپرم-هایی با مورفولوژی طبیعی در موش‌های آزمایشگاهی در معرض سدیم آرسنیت می‌شود (Shariatzadeh and Mohammadi 2015). محققین احتمال داده‌اند کاهش قابلیت حیات و تحرک اسپرم موش پس از فرایند شوک گرمایی، از القاء استرس‌اکسیداتیو در سلول‌های اسپرم ناشی می‌شود و نیز کاتچین موجود در عصاره‌ی چای سبز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، با مهار استرس‌اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی از کاهش کیفیت اسپرم‌ها جلوگیری می‌نماید. همچنین از طریق تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مایع منی، موجب افزایش قابلیت حیات و تحرک اسپرم می‌شود (Abshenas et al. 2011). به علاوه چای سفید به علت دارا بودن مقادیر فراوانی کاتچین می‌تواند با کاهش شرایط استرس‌اکسیداتیو بیضه سبب بهبود پارامترهای حیاتی اسپرم در موش‌های صحرایی مبتلا به پیش دیابت شود (Oliveira et al. 2015). همچنین محققین نشان دادند کاتچین به صورت وابسته به دوز مصرفی می‌تواند سبب افزایش تحرک اسپرم بز پس از فرایند انجماد- یخ‌گشایی شود (Purdy et al. 2004) که با نتایج پژوهش حاضر همسو است.

در انتها لازم به ذکر است ارزیابی اسپرم از طریق فراسنجه‌های دینامیکی و مورفولوژی، همراه با اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی ممکن است اطلاعات کاملی در مورد توانایی باروری اسپرم یخ‌گشایی شده ارائه ندهد. بنابراین نیاز است بررسی‌های تکمیلی در زمینه‌ی جنبه-های مختلف پارامترهای حیاتی اسپرم یخ‌گشایی شده انجام شود. همچنین پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی سطوح متفاوت کاتچین جهت ارزیابی چنین سازوکاری مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به این که در پژوهش حاضر تنها پارامترهای حیاتی اسپرم و میزان پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم‌های یخ‌گشایی شده مورد بررسی قرار گرفته است، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی اثر کاتچین بر فرآیند آپوپتوزیس و میزان آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی اسپرم پس از فرایند انجماد- ذوب مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین عدم بررسی مکانیسم دقیق اثر کاتچین در مورد نتایج به دست آمده از جمله محدودیت-های این مطالعه می‌باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت افزودن کاتچین به عنوان مکمل به مایع رقیق‌کننده‌ی اسپرم می-تواند تأثیر مثبتی بر کاهش پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از فرایند انجماد- ذوب داشته باشد. همچنین کاتچین موجب بهبود پارامترهای حیاتی اسپرم بعد از فرایند انجماد- ذوب می‌شود. از این رو می‌توان کاتچین را به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در بهبود آسیب‌های ناشی از فرایند انجماد- ذوب اسپرم معرفی نمود. مطابق نتایج این آزمایش بهترین عملکرد از سطح ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌داند از حمایت‌های دانشگاه پیام نور کمال تشکر و قدردانی را به عمل آورند. به علاوه لازم به ذکر است که این مقاله از طرح پژوهشی مصوب در جلسه‌ی شورای پژوهشی دانشگاه پیام نور استان خراسان رضوی استخراج گردید.

منابع

Abshenas, J.; Babaei, H.; Zare, M.H.; Allahbakhshi, A. and Sharififar, F. (2011). The effects of green tea (*Camellia sinensis*) extract on mouse semen quality after scrotal heat stress. Veterinary Research Forum, 2(4): 242-247.

Amini-Pour, H.; Tahmasbi, A.M. and Naserain, A.A. (2013). The influence of vitamin E on semen characteristics of ghezel rams in during cooling and frozen process. European Journal of Zoological Research, 2(5): 94-99.

Ashrafi, I.; Kohram, H. and Tayefi-Nasrabadi, H. (2013). Antioxidant effects of bovine serum albumin on kinetics, microscopic and oxidative characters of cryopreserved bull spermatozoa. Spanish Journal of Agricultural Research, 11(3): 695-701.

Beheshti, R.; Yousefi Asl, M. and Ghiasi, J. (2012). Effects of addition of glutamine to semen extenders on microscopic factors of buffalo bulls. Journal of Comprehensive Photobiology, 9(38): 727-732.

Chatterjee, S. and Gagnon C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. Molecular Reproduction and Development, 59(4): 451-458.

Choi, S.J.; Park, S.Y.; Park, J.S.; Park, S.K. and Jung, M.Y. (2016). Contents and compositions of policosanols in green tea (*Camellia sinensis*) leaves. Food Chemistry, 204: 94-101.

Daghighkia, H.; Shahbaz Zadeh, R. and Ashrafi, I. (2015). Antioxidant effect of Macrantha Satureja extraction on microscopic and biochemical parameters of bull sperm after freeze -thawing process. Pajouhesh and Sazandegi, 28(108): 101-112. (In Persian)

De Graaf, S.P.; Evans, G.; Gillan, L.; Guerra, M.M.; Maxwell, W.M. and O'Brien, J.K. (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.

Dolati Doorbash, P.; Moghaddam, G.; Daghighkia, H.; Taghizadeh, A. and Rafat S.A. (2015). The effect of adding different raffinose concentrations in the diluents in semen cryopereservation of different breeds of ram at the reproductive season. Animal Science Researches (Agricultural Sciences), 25(2): 109-132.

Farhadi, F.; Towhidi, A. and Shakeri, M. (2015). The effect of adding different levels of zinc sulfate to semen diluent on quality of frozen-thawed sperm in bull. Iranian Journal of Animal Science, 45(4): 335-342.

Farhadi, R.; Daghighkia, H.; Hosseinkhani, A.; Ghasemi Panahi, B.; Dehghan, G. and Ashrafi, I. (2016). Effect of Origanum vulgare ethanol extract on quality parameters and malondialdehyde concentration of cryopreserved Holstein bull sperm. Iranian Journal of Applied Animal Science, 6(4): 783-789.

Gadkari, P.V. and Balaraman, M. (2015). Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. Food and Bioproducts Processing, 93: 122-138.

Gil, J.; Lundeheim, N.; Soderquist, L. and Rodriiuez-Martinez, H. (2003). Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology, 59(5-6): 1241-1255.

Glasauer, A. and Chandel, N.S. (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. Biochemical Pharmacology, 92(1): 90-101.

Ishii, T.; Mori, T.; Tanaka, T.; Mizuno, D.; Yamaji, R.; Kumazawa, S. et al. (2008). Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (-) - epigallocatechin - 3 - gallate through autoxidation. Free Radical Biology & Medicine, 45(10): 1384-1394.

Lambert, J.D. and Elias, R.J. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. Archives of Biochemistry and Biophysics, 501(1): 65-72.

Liu, T.; Gao, J.; Zhou, N.; Mo, M.; Wang, X.; Zhang, X. et al. (2016). The effect of two cryopreservation methods on human sperm DNA damage. Cryobiology, 72(3): 210-215.

Lucio, C.F.; Regazzi, F.M.; Silva, L.C.G.; Angrimani, D.S.R.; Nichi, M. and Vannucchi C.I. (2016). Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. Theriogenology, 85(9): 1568-1575.

Malek-Mohammadi, R.; Roghani, M. and Salami, M. (2015). The effect of aqueous extracts of *Melissa officinalis* on the oxidative stress indices in the midbrain tissue. Feyz, 19(1): 8-14.

Malo, C.; Gil, L.; Cano, R.; Martínez, F. and Galé, I. (2011). Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology, 75(9): 1735-1741.

Mehdipour, M.; Daghigh-Kia, H.; Najafi, A.; Vaseghi Dodaran, H. and García-Álvarez, O. (2016). Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. Cryobiology, 73(3): 297-303.

Mocé, E. and Vicente, J.S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: A review. Animal Reproduction Science, 110(1-2): 1-24.

Mohammadian, T.; Khodaei Motlagh, M. and Zare Shahneh, A. (2016). The effect of using different levels of royal jelly in semen extender on some quality and quantity parameters of Mahabadi goat semen. Iranian Journal of Animal Science, 46(4): 457-463.

Mostek, A.; Dietrich, M.A.; Słowińska, M. and Ciereszko, A. (2017). Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. Theriogenology, 92(1): 95-102.

Oberoi, B.; Kumar, S. and Talwar. P. (2014). Study of human sperm motility post cryopreservation. Medical Journal Armed Forces India, 70(4): 349-353.

Oliveira, P.F.; Tomás, G.D.; Dias, T.R.; Martins, A.D.; Rato, L.; Alves, M.G. et al. (2015). White tea consumption restores sperm quality in prediabetic rats preventing testicular oxidative damage. Reproductive BioMedicine Online, 31(4): 544-556.

Purdy, P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research, 63(3): 215-225.

Purdy, P.H.; Ericsson, S.A.; Dodson, R.E.; Sternes, K.L. and Garner D.L. (2004). Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. Small Ruminant Research, 55(1-3): 239-243.

Sadeghipanah, H.; Naijian, H.R. and Masoudi, R. (2015). Evaluation of antioxidant effects of butylated hydroxytoluene in the soybean lecithin based extender on frozen-thawed semen quality in Markhoz goat. Iranian Veterinary Journal, 11(2): 77-126. (In Persian)

Seifi Jamadi, A.; Zareh, A.; Kohram, H.; Akbari, A.; Zamen, M. and Vakhideh, A. (2016). The potential of catalase as an enzymatic antioxidant to improve freezability of Turkmen stallions sperm. Iranian Journal of Animal Science, 42(2): 215-222.

Shahbazzadeh, R.; Daghigh-Kia, H.; Moghaddam, G.; Dehghan, G.; Hosseinkhani, A. and Ashrafi, I. (2015). Effect of different levels of Satureja sahendica alcoholic extract on the quality of freeze-thawed Holstein bull spermatozoa. Animal Science Researches (Agricultural Sciences), 25(1): 13-24.

Shariatzadeh, M.A. and Mohammadi, M. (2015). Protective role of green tea (*Camellia sinensis*) hydroalcholic extract on sperm parameters and testicular tissue in NMRI mice exposed to sodium arsenite. Journal of Birjand University of Medical Sciences, 21(4): 432-443.

Spadiene, A.; Savickiene, N.; Ivanauskas, L.; Jakstas, V.; Skesters, A.; Silova, A. et al. (2014). Antioxidant effects of *Camellia sinensis L.* extract in patients with type 2 diabetes. Journal of Food and Drug Analysis, 22(4): 505-11.

Swami, D.S.; Kumar, P.; Malik, R.K.; Saini, M.; Kumar, D. and Jan, M.H. (2017). The cryoprotective effect of iodixanol in buffalo semen cryopreservation. Animal Reproduction Science, 179: 20-26.

Vilela, C.G.; Marquez, J.M.; Graham, J.K. and Barfield, J.P. (2017). Cryopreservation of bison epididymal sperm: A strategy for improving post-thaw quality when collecting sperm in field conditions. Theriogenology, 89: 155-161.

Yue, H.X.; Li, P.; Jiang, M.; Lin, L. and Xu, K.H. (2005). Influence of cryopreservation with glycerol and freezing-thawing procdures on the motility of human sperm. National journal of andrology, 11(3): 204-206.

Effect of catechin on lipid peroxidation and vital parameters of Holstein bull sperm after freeze-thawing process

Sepehri-moghaddam, H.[1]; Emadi, M.[1] and Vafa, T.S.[1]

Received: 15.11.2017 Accepted: 12.06.2018

Abstract

The aim of this study was to determine the antioxidant properties of catechin on lipid peroxidation and vital parameters of Holstein bull sperm after the freeze-thawing process. In this experimental study, semen samples were collected from four mature Holstein bull, twice a week using an artificial vagina. Ejaculates were pooled in order to eliminate the individual effects of bull. Semen samples were divided into four equal groups (8 reps). Zero (control), 20, 30 and 40 mg/ml of catechin with diluents based on egg yolk-citrate were added to the semen samples. Following cooling and equilibration stage of semen samples, the samples were stored in a nitrogen tank for a period of 30 days. After thawing procedure, the level of malondialdehyde in sperm samples were measured using the ELISA method. Also, membrane integrity, motility and viability of sperm were also examined. Results showed, membrane integrity, motility and viability of sperm samples treated with a concentration of 20, 30 and 40 mg/ml catechin in dose-dependent manner significantly increased and level of malondialdehyde dose-dependent manner significantly decreased, compared to the control groups. Therefore, the use of catechin in bull semen diluent can improve sperm vital parameters and decreases lipid peroxidation of sperm after the freeze-thawing process.

Key words: Catechin, Lipid Peroxidation, Bull, Sperm

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Sepehri-moghaddam, H., E-mail: he.sepehrimoghadam@pnu.ac.ir