اولین همایش ملی گیاهان دارویی، کارآفرینی و تجاری سازی
۱۹ و ۲۰ آبان ۱۴۰۰
MPEC 2021
1st National Conference on Medicinal Plants, Entrepreneurship and Commercialization
10-11th Nov 2021, University of Jiroft
وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه جیرفت

اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی میخک بر زنده‌مانی اسپرم تازه گوسفند

ماریه کشاورزمنش[۱]، هادی حجاریان*[۱]، حامد کرمی شبانکاره[۱]، لیلا سلطانی[۱]
۱- گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
رایانامه: h.hajarian@razi.ac.ir

چکیده

اثرات استرس اکسیداتیو بر تحرک و زنده‌مانی، منجر به کاهش کیفیت اسپرم و باروری می‌شود. ترکیبات نشأت‌گرفته از گیاهان دارویی معمولاً ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قوی دارند. یکی از گیاهان دارویی با خواص آنتی‌اکسیدانی قوی، میخک است. هدف از این مطالعه بررسی اثر افزودن غلظت‌های مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی شکوفه میخک به رقیق‌کننده‌ی منی تازه گوسفند بر میزان زنده‌مانی با کمک آزمون MTT(3-(4,5-dimethyl thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) بود. برای این منظور، پس از تهیه‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه میخک، نمونه‌های منی از سه گوسفند بالغ و بارور نژاد سنجابی با سن ۴-۳ سال جمع‌آوری شد. بعد از رقیق‌سازی منی با رقیق‌کننده‌ی تریس-بازی، غلظت‌های متفاوت عصاره‌ی هیدروالکلی (۲۵، ۱۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به آن اضافه شد. گروهی که هیچ‌گونه مکملی دریافت نکرده بود، به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. محلول MTT به هر گروه اضافه شد و در انکوباتور برای مدت ۲ ساعت در ۳۷ سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از طی زمان انکوباسیون، خوانش با کمک دستگاه الایزا ریدر انجام گرفت. اثر افزودن عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه میخک به رقیق‌کننده‌ی منی وابسته به غلظت بود. افزودن غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی هیدروالکلی سبب بهبود زنده‌مانی اسپرماتوزوییدهای گوسفندی در مقایسه با سایر گروه‌های تیماری و گروه شاهد شده بود ($P<0.05$). به نظر می‌رسد عصاره‌ی هیدروالکلی میخک سبب حفظ بهتر زنده‌مانی منی در شرایط ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌شود.

کلمات کلیدی: عصاره‌ی هیدروالکلی میخک، استرس اکسیداتیو، گوسفند، منی.

مقدمه

یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در پایین بودن کیفیت مایع منی، استرس اکسیداتیو است. استرس اکسیداتیو به‌عنوان اختلال در تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) و دفاع آنتی اکسیدان در بدن تعریف‌شده است. زمانی که تولید گونه‌های فعال اکسیژن در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی افزایش پیدا می‌کند، منجر به آسیب اکسیداتیو لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA در سلول اسپرم می‌شود که به آسیب یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول، کاهش تحرک و زنده‌مانی منجر می‌شود (Jang et al, 2009). استرس اکسیداتیو به‌وسیله‌ی رادیکال آزاد ایجاد می‌شود (Bucak et al., 2009). آنتی‌اکسیدان‌ها مانع فعالیت رادیکال‌های آزاد شده و از اکسیداسیون آن‌ها جلوگیری می‌کنند و با غیرفعال کردن آن‌ها، سلول های بدن را از اثرات مخرب این ترکیبات مصون نگاه می‌دارند و به‌عنوان ترکیبات مناسب برای بهبود زنده مانی و تحرک سلول‌های اسپرم منجمد شناخته شده‌اند (Maxwell and Watson, 1996). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم به خاطر حجم کم سیتوپلاسم اندک است بااین‌حال سیستم آنتی‌اکسیدانی داخل سلول شامل مجموعه آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (سوپراکسیدازدیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز) و غیر آنزیمی (آلفا-توکوفرول، بتا-کاروتن، آسکوربات و گلوتاتیون) هستند (Wai-Sum et al., 2006).

متابولیت‌های ثانویه مشتق از گیاهان مانند فنل و فلاونوئید تام، دارای پتانسیل قوی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌باشند که در تمام قسمت‌های گیاهی مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارند. این ترکیبات در حذف اثرات مضر رادیکال‌های آزاد در سلول‌های اسپرم می‌توانند مؤثر باشند. در رابطه با نقش میخک بر روی اسپرم مطالعات کمی صورت گرفته است. مطالعه‌ی Chikere و همکاران (۲۰۱۵) اثر عصاره هیدروالکلی میخک بر روی بافت‌شناسی بیضه‌های موش صحرایی نر ویستار موردبررسی قرار دادند و نشان دادند که مصرف میخک می‌تواند بر افزایش تعداد اسپرم اثر بگذارد و بافت بیضه را حفظ کند؛ اما مصرف بیش‌ازحد آن باعث آسیب به بافت بیضه می‌شود. در مطالعه‌ی باغ شاهی و همکاران، ضمن تهیه عصاره‌های مذکور، به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی، فنولی و فلاونوئیدی آن‌ها پرداخته و سپس غلظت‌های مختلف آن‌ها به محیط انجماد منی گوسفند اضافه شد. همچنین در مطالعات دیگری اثر آنتی اکسیدانی میخک در زنده‌مانی اسپرم قوچ یخ‌گشایی شده موردبررسی قرارگرفته است (Baghshahi et al., 2014). در ارتباط با عصاره‌ی هیدروالکلی میخک اضافه‌شده به رقیق‌کننده‌ی منی تازه گوسفند مطالعات کمی وجود دارد. برای این منظور در این مطالعه به بررسی افزودن عصاره‌ی هیدروالکلی میخک در غلظت-های مختلف، بر زنده‌مانی منی تازه رقیق‌شده گوسفند با کمک آزمون MTTپرداخته شد.

مواد و روش ها

گوسفندان در فارم دانشگاه رازی تحت شرایط تغذیه‌ایی یکسان نگهداری می‌شدند. نمونه‌های اسپرم از قوچ‌های نژاد سنجابی با سن ۳-۴ سال با کمک واژن مصنوعی در فصل تولیدمثلی جمع‌آوری شد. نمونه-های اسپرم به‌منظور حذف اثرات فردی با همدیگر مخلوط شدند. بعد از جمع‌آوری، نمونه‌ها در فلاسک آب ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به آزمایشگاه برای ارزیابی آغازین منتقل شد. در آزمایشگاه یک قطره نمونه اسپرم بر روی اسلاید گرم قرار داده شد و تحرک آن‌ها تحت میکروسکوپ نوری موردبررسی قرار گرفت. برای شمارش نمونه‌های اسپرم از لام نئوبار استفاده شد. در مطالعه جاری، از رقیق‌کننده‌ی تریس-بازی استفاده شد (Salamon and Maxwell, 2000). در این بافر ترکیباتی نظیر بافر تریس، فروکتوز، سیتریک اسید، گلیسرول ۶٪ و زرده‌ی تخم مرغ ۱۵-۲۰٪ استفاده شد.

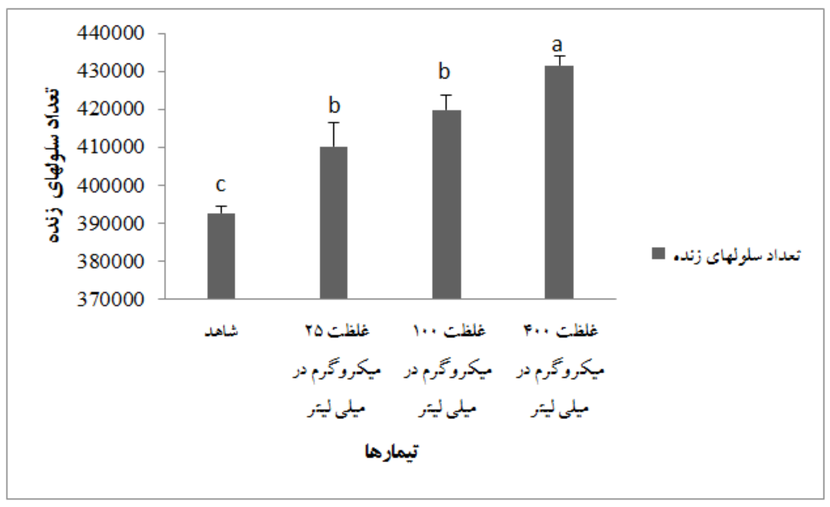
نمونه اسپرم به ۴ بخش تقسیم و با رقیق‌کننده‌ی تریس بازی با نسبت ۹:۱ رقیق شد. گروه‌های آزمایشی عبارت بودند از: ۱- گروه شاهد (هیچ‌گونه عصاره‌ایی را دریافت نکرده بود)؛ ۲- گروه شاهد + غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی هیدروالکلی میخک؛ ۳- گروه شاهد + غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی هیدروالکلی میخک؛ و ۴- گروه شاهد + غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی هیدروالکلی میخک.

برای بررسی زنده‌مانی اسپرم از آزمون 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)استفاده‌شد. برای این منظور، پودر MTT به میزان ۵ میلی‌گرم در یک سی‌سی بافر Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) حل شد. برای بررسی زنده‌مانی، ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT به ۵۰۰ میکرولیتر اسپرم رقیق‌شده اضافه شد و نمونه‌ها در شرایط ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و هوای اتمسفری مرطوب برای مدت زمان ۲ ساعت و درجه حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. در ادامه، تیوپ‌ها سانتریفیوژ شد محلول رویی دور انداخته شد و به آن ۲۰۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه شد و کاملاً مخلوط گشت تا کریستال‌های بنفش رنگ حل شد. جذب مایع رویی در پلیت ۹۶ خانه-ایی در طول موج ۵۷۰ نانومتر با کمک دستگاه الایزا ریدر بررسی شد. نرخ تعداد سلول‌های زنده با کمک آزمون MTT برای هر نمونه از طریق فرمول نمودار استاندارد (بر این منظور نسبت‌های مختلف سلول‌های زنده و مرده تهیه شد و زنده‌مانی با آزمون MTT بررسی شد، از Optical Density (OD) این‌ها برای تهیه نمودار استاندارد استفاده شد) تهیه‌شده و جذب نمونه‌های مربوط محاسبه گردید (Mohammadi and Soltani, 2021).

آنالیز آماری در این مطالعه بر اساس طرح کامل تصادفی و به‌وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS انجام گرفت، تعداد تکرارهای موردبررسی ۳ تکرار بود. نتایج به صورت میانگین ± اشتباه استاندارد بیان شد سطح معنیداری مورد استفاده در این مطالعه ۵ درصد بود.

نتایج و تحلیل

نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان داد که میزان زنده‌مانی اسپرم تازه‌ی گوسفند در پی افزودن غلظت-های مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی میخک وابسته به غلظت است. افزودن حداکثر غلظت عصاره‌ی هیدروالکلی میخک به رقیق‌کننده‌ی منی گوسفند سبب حفظ زنده‌مانی در مقایسه با سایر غلظت‌ها و گروه شاهد شده بود ($p<0.05$). در ارتباط با غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ میکروگرم هرچند که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بهبود زنده‌مانی در مقایسه با غلظت ۲۵ میکروگرم عصاره‌ی هیدروالکلی مشاهده می‌شد اما این اختلاف معنی‌دار نبود (شکل ۱).



شکل ۱: بررسی میزان زنده‌مانی منی تازه رقیق‌شده گوسفند نژاد سنجابی پس از افزودن غلظت‌های مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی میخک

نتیجه گیری

نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه اثرات مثبت عصاره‌ی هیدروالکلی شکوفه میخک را بر حفظ زنده‌مانی اسپرم تازه گوسفند در تمامی غلظت‌ها را نشان می‌دهد. بیشترین غلظت عصاره‌ی هیدروالکلی میخک نسبت به سایر غلظت‌ها اثرات بهتری را نشان داد. مطالعات بیشتری لازم است که به بررسی سایر پارامترها در شرایطی نظیر ذخیره‌ی سرد و انجماد منی پرداخته شود.

منابع

Baghshahi, H., Riasi, A., Mahdavi, A. H., & Shirazi, A. (2014). Antioxidant effects of clove bud (Syzygium aromaticum) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. Cryobiology, 69(3), 482-487.

Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sarıözkan, S., & Ulutaş, P. A. (2009). Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on postthawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. Small Ruminant Research, 81,13-17.

Chikere, O. U., Liman, F. L., Nnabuihe, E. D., Uchechi, E. E., & Jesse, A. C. (2015). The effects of methanolic extract of Syzygium aromaticum (clove bud) on the histology of testis in adult male Wistar rats. Journal of Natural Sciences Research, 5(12), 1-7.

Jang, H. Y., Kim, Y. H., Cheong, H. T., Kim, J. T., Park, I. C., Park, C. K., & Yang, B. K. (2009). Curcumin attenuates hydrogen peroxide induced oxidative stress on semen characteristics during in vitro storage of boar semen. Reproductive and Developmental Biology, 33(2), 99-105.

Maxwell, W. M. C., & Watson, P. F., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. Animal Reproduction Science, 42, 55–65.

Mohammadi, T., & Soltani, L. (2021). Effects of hydroethanolic extracts of Terminalia chebula and Thymbra spicata on ram fresh semen under normal and oxidative stress conditions. Veterinary Medicine and Science. 7(5), 1778-1785.

Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. Animal reproduction science, 62(1-3), 77-111.

Wai-Sum, O., Chen, H., & Chow, P. H. (2006). Male genital tract antioxidant enzymes—their ability to preserve sperm DNA integrity. Molecular and cellular endocrinology, 250(1-2), 80-83.