تحقیقات تولیدات دامی
سال چهارم /شماره اول/بهار ۱۳۹۴ (۲۴-۱۵)

اثر عصاره علف چشمه بر ذخیره‌سازی منی خروس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

محمد روستائی علی مهر[۱*]، بهروز آدیشی[۲]

۱- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۱)

چکیده

به منظور بررسی اثر عصاره علف چشمه بر ذخیره‌سازی اسپرم خروس در دمای ۴ ^{o}C از ۱۵ قطعه خروس بالغ استفاده شد. جمع-آوری منی دو بار در هفته در ۵ نوبت انجام شد. انزال‌ها در هر نوبت بعد از تجمیع به پنج قسمت تقسیم شد. مقدار صفر (شاهد)، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰ و ۱۲۰۰ mg/mL عصاره علف چشمه به هر قسمت اضافه شد. سپس نمونه‌ها تا ۴ ^{o}C سرد و به مدت ۷۲ ساعت در این دما نگهداری شدند. در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی، سلامت غشای پلاسمایی، زنده‌مانی (رنگ‌آمیزی هوخست ۳۳۲۵۸) و تحرک اسپرم ارزیابی شد. به منظور بررسی پراکسیداسیون چربی‌های اسپرم پس از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی، غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) در $۱۰^{۶}$ × ۳۰۰ اسپرم تعیین شد. نتایج نشان داد که کمترین غلظت MDA (۱/۰ µM/mL) در تیمار ۶۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه مشاهده شد (P<۰/۰۵). اثر مستقل عصاره علف چشمه بر زنده‌مانی اسپرم نشان داد که کمترین زنده‌مانی (۷۳/۴٪) در تیمار ۱۲۰۰ µg/mL عصاره مشاهده شد (P<۰/۰۵). اثر متقابل عصاره علف چشمه و زمان ذخیره-سازی بر سلامت غشای پلاسمایی و تحرک پیش‌رونده اسپرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). پس از ۴۸ ساعت ذخیره سازی، سلامت غشای پلاسمایی در مقدار ۶۰۰ mg/mL عصاره (۹۰/۷۰٪) بیشتر از شاهد بود (P<۰/۰۵). در ساعت ۷۲، تحرک پیش‌رونده اسپرم در مقدار ۶۰۰ mg/mL (۵۱٪) عصاره با ۳۰۰ mg/mL (۴۲/۶۰٪) عصاره تفاوتی را نشان نداد (P>۰/۰۵) ولی بیشتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵). بنابراین افزودن ۶۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه به منی سبب بهبود ماندگاری اسپرم خروس در ۴ ^{o}C می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، آنتی‌اکسیدان، خروس، فلاونوئید

* نویسندهٔ مسئول: roostaei@guilan.ac.ir

مقدمه

تلقیح مصنوعی به عنوان مهم‌ترین روش قابل دسترس، جهت پیشبرد و تسریع برنامه‌های توسعه نژادها و پیشرفت ژنتیکی شناخته می‌شود. از سویی دیگر بر کسی پوشیده نیست که ذخیره‌کردن منی سبب حذف محدودیت زمانی در استفاده از روش تلقیح مصنوعی می‌شود. انجماد منی روشی متداول برای نگهداری طولانی مدت اسپرم در گاوهای شیری است (Seidel, 2003). لیکن در سایر حیوانات اهلی به‌ویژه طیور عدم موفقیت‌های چشمگیر در انجماد منی، بازدهی پایین و باروری کم اسپرم منجمد موجب شده است که روش ذخیره‌سازی منی به‌صورت مایع در سرما به منظور ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت منی و انجام تلقیح مصنوعی مورد توجه قرار گیرد (Foote, 2002).

تولید مواد مضر از جمله رادیکال‌های آزاد اکسیژن در هنگام ذخیره‌کردن اسپرم به‌صورت مایع در سرما متوقف نمی‌شود (Douard *et al.*, 2004). از جمله عوامل موثر در سرعت پیر شدن سلول (cell senecence) افزایش غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژن است (He *et al.*, 2014). در مایع منی موجودات زنده ترکیبات متعددی مانند سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز شناسایی شده‌اند که سبب حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند (Breque *et al.*, 2003). از طرفی باید خاطر نشان کرد که رقیق‌کردن منی در زمان ذخیره‌سازی اجتناب‌ناپذیر است. بنابراین افزودن مواد آنتی‌اکسیدان به منی در زمان ذخیره‌سازی می‌تواند سبب بهبود منی در زمان ذخیره‌سازی شود.

پلی‌فنول‌های گیاهی از جمله فلاوونوئیدها، مواد محلول در آب با قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار زیاد هستند (Catoni *et al.*, 2008; Rice-Evans *et al.*, 1996). فلاوونوئیدها قادرند به سرعت رادیکال‌های آزاد را در محیط حذف کنند (Halvorsen *et al.*, 2002). علف چشمه با نام علمی *Nasturtium Officinal l.* گیاهی دائمی از خانواده کراسیفرا یا چلیپائیان است (آخوند زاده، ۱۳۷۹) که دارای مقادیر قابل توجه از ترکیبات فنولی مثل کاروتنوئیدها، بتاکاروتن، لوتئین، زئاگزانتین و فلاوونوئید کوئرستین است (Gill *et al.*, 2007). مطالعات نشان داده‌اند که بعضی از ترکیبات فنولی موجود در علف چشمه مانند کوئرسیتن دارای اثر آنتی‌اکسیدان (Poli, 1993)، ضد ویروس (Nair *et al.*, 2002)، ضد باکتری و قارچ (Elangovan *et al.*, 2000) است. همچنین، مشخص شده است که مصرف عصاره علف چشمه سبب بهبود سلامتی و کاهش بروز سرطان در انسان می‌شود (Gill *et al.*, 2007; Casanova *et al.*, 2011).

تاکنون اثر عصاره علف چشمه بر ذخیره‌سازی منی مورد مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین هدف از این تحقیق بررسی عصاره علف چشمه بر ماندگاری اسپرم خروس در دمای ۴ درجه سانتی گراد است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. عصاره الکلی گیاه علف چشمه با اصلاح روش Yazdanparast *et al.* (2008) تهیه شد. قسمت‌های هوازی گیاه علف چشمه از نواحی اطراف خرم‌آباد (استان لرستان) در پایان بهار تهیه شد. جهت زدودن خاک و مواد خارجی، گیاه جمع‌آوری شده شسته شد. از آنجایی که خشک کردن سبزیجات برگی در سایه برخلاف خشک کردن آنها در معرض نور خورشید منجر به کاهش معنی‌دار غلظت کارتنوئیدهای آنها از جمله لوتئین نمی‌شود (Mosha *et al.*, 1997)، لذا گیاه علف چشمه در سایه و به دور از تابش مستقیم نور خورشید خشک و سپس به وسیله آسیاب پودر شد. مقدار ۴۰ گرم پودر خشک علف چشمه با ۱ لیتر اتانول و آب مقطر به نسب ۳:۷ مخلوط شد و به مدت یک ساعت روی دستگاه شیکر (Shaker, Heidolph, Germany) تکان داده شد و سپس به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در آون قرار داده شد. مخلوط بدست آمده از صافی عبور داده شد و این مراحل روی بقایای گیاهی جدا شده ۴ بار تکرار شد. مایع بدست آمده با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخشی (Rotary evaporator, Switzerland) در دمای ۷۵ درجه سلسیوس تغلیظ و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس خشک شد. مقدار کوئرستین موجود در پودر

خشک علف چشمه به وسیله روش HPLC[1] برابر با mg/kg ۸۲ تعیین شد (Penarrieta *et al.*, 2007).

این آزمایش با استفاده از ۱۵ قطعه خروس سالم نژاد راس ۳۰۸ با سن ۳۲ هفتگی انجام شد. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی به ابعاد ۷۵×۵۰×۶۰ سانتیمتر در دمای ۱۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد و تحت یک برنامه نوری با ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. آب و غذا به صورت آزاد در اختیار پرندها بود. جیره غذایی بر اساس توصیه شرکت راس تهیه شد. نمونه‌های منی پس از ۱۰ روز (عادت‌دهی) و با استفاده از روش مالش شکمی بر اساس روش Burrows and Quinn (1937) به وسیله یک تکنسین مجرب جمع‌آوری شدند. نمونه‌های منی در ۵ نوبت با فاصله دو روز (حداقل از ۱۲ خروس در هر نوبت) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بعد از جمع‌آوری به وسیله رقیق‌کننده سکستون (سیترات پتاسیم منوهیدرات ۰/۶۴ g، L-گلوتامات سدیم ۸/۰۷g، کلرید منیزیم ۰/۳۴ g، فروکتوز ۵ g، فسفات دی-پتاسیم تری هیدرات ۱۲/۷ g، فسفات منوپتاسیم ۰/۶۵ g، TES[2] ۳/۹۵ g، استات سدیم ۴/۳ g در یک لیتر آب مقطر؛ pH= ۷/۴) به نسبت ۱ به ۲ رقیق شدند و بلافاصله به وسیله فلاکس عایق حرارتی حاوی آب °C ۳۹، به دور از هرگونه نور به آزمایشگاه منتقل شدند (Moce *et al.*, 2010). تحرک پیش‌رونده اسپرم و غلظت اسپرم با توجه به رقیق‌سازی اولیه در هر نمونه تعیین شد. نمونه‌هایی که تحرک کمتر از ۷۰ درصد و غلظت کمتر از $۱۰^۶$ × ۳۰۰۰ اسپرم در میلی‌لیتر داشتند از آزمایش حذف شدند.

مقدار ۲/۴ g عصاره خشک علف چشمه در ۱ میلی‌لیتر الکل مطلق حل شد و با استفاده از رقیق‌کننده سکستون ۱۰۰۰ برابر رقیق شد. سپس محلول عصاره علف چشمه از فیلتر µm ۰/۴۵ عبور داده شد تا استریل شود و با استفاده از رقیق-کننده سکستون غلظت‌های۴۰۰، ۶۰۰، ۱۲۰۰ و µg/mL ۱۸۰۰ عصاره علف چشمه در میلی‌لیتر تهیه شد. در آزمایشگاه انزال‌ها ابتدا تجمیع و بعد به وسیله رقیق‌کننده سکستون تا غلظت mL/اسپرم $۱۰^۹$ × ۴ رقیق شدند. در ادامه نمونه به پنج قسمت تقسیم شد و هر قسمت با رقیق-کننده سکستون حاوی صفر، ۶۰۰، ۱۲۰۰، ۱۸۰۰، µg/mL ۲۴۰۰ عصاره علف چشمه (v/v) مخلوط شد تا در نهایت غلظت اسپرم به $۱۰^۹$× ۲ در هر میلی‌لیتر و غلظت عصاره علف چشمه به صفر، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰ و µg/mL ۱۲۰۰ رسید. نمونه‌ها به دستگاه تست چمبر منتقل شدند و تا °C ۴ با سرعت °C/min ۰/۲۵ سرد شدند. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای °C ۴ ذخیره شدند و در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سلامت غشای‌پلاسمایی، تحرک و زنده‌مانی اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت. بعد از ۴۸ ساعت ذخیره-سازی جهت بررسی پراکسیداسیون چربی‌های اسپرم و غلظت مالون‌دی‌آلدهید، ۱۵۰ میکرولیتر از هر تیمار که حاوی $۱۰^۶$ × ۳۰۰ اسپرم بود با کمک بافر فسفات به حجم ۱/ ۵ میلی‌لیتر رسید. نمونه‌ها با قدرت g× ۱۵۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و بعد مایع رویی حذف شد. رسوب (اسپرم‌ها) در ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات حل شد و غلظت مالون‌دی‌آلدهید بر اساس روش Kumaresan *et al.* (2009) تعیین شد. این روش بر پایه واکنش یک مولکول مالون‌دی‌آلدهید با ۲ مولکول اسید تیوباربیتوریک و تولید مولکولی صورتی رنگ است که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد.

غلظت اسپرم با کمک لام هموسایتومتر و میکروسکوپ (Olympus, Japan) با بزرگنمایی ۴۰۰ × بعد از رقیق کردن (۱/۲۰۰) نمونه‌ها با آب تعیین شد. به منظور بررسی تحرک پیش‌رونده اسپرم از روش Tabatabaei *et al.* (2011) استفاده شد. پنج میکرولیتر از نمونه رقیق شده روی یک لام قرار داده شده و با گذاشتن یک لامل روی آن تحرک اسپرم با کمک میکروسکوپ فاز متضاد مجهز به صفحه گرم با بزرگنمایی ۴۰۰ × به وسیله یک تکنسین مجرب بررسی شد. تحرک اسپرم در هر نمونه حداقل در ۵ میدان دید میکروسکوپی با اختلاف ۱۰ درصد تخمین زده شد و در انتها میانگین حاصل از این تخمین‌ها به عنوان درصد تحرک پیش‌رونده ثبت شد. ارزیابی زنده‌مانی اسپرم با استفاده از رنگ هوخست بیس بنزامید H33258 (AppliChem, Germany) انجام شد (Leeuw *et al.*, 1991). بطور خلاصه، نمونه‌ها به غلظت mL/اسپرم $۱۰^۶$ × ۳۰ رسانده شد و µL -

[1] High-perormance liquid chromatograph
[2] 2-[(1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)amino]ethanesulfonic acid

۱۰ از این نمونه‌ها با µL ۱۰ از محلول رنگ هوخست بیس-بنزامید (µg/mL ۲۰ از هوخست بیس بنزامید H33258 در بافر M ۰/۱۵۴ سدیم کلرید و M ۰/۰۱۵ تری سدیم سیترات pH=۷) مخلوط شد و بعد از ۳۰ ثانیه در دمای اتاق µL ۵ از نمونه روی لام قرار داده شده و با گذاشتن لامل روی آن، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus, Japan) و فیلتر WU با بزرگنمایی۴۰۰×، ۲۰۰ عدد اسپرم در شرایط نور بسیار کم بررسی و اسپرم‌های با رنگ آبی به عنوان پاسخ منفی (مرده) و اسپرم‌های بدون رنگ به عنوان پاسخ مثبت (زنده) در نظر گرفته شدند. برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم µL ۲۵ از نمونه‌ی اسپرم با µL ۵۰۰ از محلول هایپواسموتیک (۱ گرم سیترات سدیم در ۱۰۰میلی‌لیتر آب مقطر با فشار اسمزی معادل ۱۰۰ میلی اسمول در کیلوگرم، pH=۷) مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه آون با دمای °C ۳۷ قرار گرفت (Moreno *et al.*, 2009). سپس با استفاده از میکروسکوپ فاز متضاد با بزرگنمایی ۴۰۰×، حداقل در ۵ میدان دید ۲۰۰ عدد اسپرم بررسی شد. اسپرم‌های دارای دم متورم به عنوان پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌های با دم بدون تورم به عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی ناسالم) در نظر گرفته شدند.

جدول ۱- اثر عصاره علف چشمه بر پراکسیداسیون چربی اسپرم (اسپرم ۳۰۰×۱۰^{۶}) پس از ۴۸ ساعت ذخیره سازی در °C ۴ (Lsmeans ± SE).

Table 1. Effect of Watercress extract on lipid peroxidation of spermatozoa (300×10^6 spermatozoa) after 48h incubation at 4 °C (Lsmeans ± SE).

Treatment	Level	Malondialdehyde µM/mL
Grass water extract (µg/mL)	0	$1.9^{a}\pm0.19$
	300	$1.6^{a}\pm0.19$
	600	$1.0^{b}\pm0.19$
	900	$1.8^{a}\pm0.19$
	1200	$2.2^{a}\pm0.19$

[a-b] Different superscripts indicate significant differences ($P<0.05$)

جدول ۲- اثر اصلی عصاره علف چشمه و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک، زنده مانی و سلامت غشای‌پلاسمایی اسپرم

Table 2. Main effect of Watercress extract and storage time on sperm motility, viability and membrane integrity

Variables		Sperm motility (%)	Membrane integrity (%)	Sperm viability (%)
Grass water extract (µg/mL)	0	$59.8^{b}\pm1.55$	$88.0^{b}\pm0.53$	$77.2^{b}\pm1.02$
	300	$64.1^{ab}\pm1.55$	$88.9^{ab}\pm0.53$	$78.6^{ab}\pm1.02$
	600	$68.2^{a}\pm1.60$	$89.8^{a}\pm0.57$	$80.6^{a}\pm1.02$
	900	$60.4^{b}\pm1.60$	$85.8^{c}\pm0.57$	$80.2^{a}\pm1.02$
	1200	$52.7^{c}\pm1.60$	$81.8^{d}\pm0.56$	$73.4^{c}\pm1.02$
Storage time (h)	0	$84.36^{a}\pm1.35$	$95.1^{a}\pm0.46$	$89.6^{a}\pm0.91$
	24	$68.7^{b}8\pm1.44$	$91.0^{b}\pm0.50$	$80.4^{b}\pm0.91$
	48	$52.84^{c}\pm1.41$	$85.8^{c}\pm0.49$	$74.5^{c}\pm0.91$
	72	$38.14^{d}\pm1.44$	$80.1^{d}\pm0.53$	$67.4^{d}\pm0.91$

[a-d] Different superscripts show significant differences ($P<0.05$)

نتایج بدست آمده از غلظت MDA در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS و رویه GLM تجزیه شد. نتایج بدست‌آمده از تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت داده-های تکرار شده در زمان با استفاده از نرم افزار SAS و رویه Mixed آنالیز شدند. نتایج به صورت Lsmeans ± SE ارائه و سطوح معنی‌داری در سطح ۵ درصد (P <۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج تعیین غلظت MDA پس از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی در ۴ °C در جدول ۱ ارائه شده است. کمترین غلظت MDA در تیمار ۶۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه مشاهده شد (P<۰/۰۵) و سایر تیمارها تفاوتی را نشان ندادند (P>۰/۰۵).

اثر مستقل عصاره علف چشمه بر تحرک پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم و سلامت غشای پلاسمایی معنی‌دار بود (جدول۲، P<۰/۰۵). تحرک اسپرم و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در سطح ۳۰۰ و ۶۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه تفاوتی را نشان نداد (P>۰/۰۵) و بیشتر از سطح صفر µg/mL عصاره علف چشمه بود (P<۰/۰۵). سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در سطح صفر و ۹۰۰ µg/mL تفاوتی را نشان نداد (P>۰/۰۵). زنده‌مانی اسپرم در سطح ۶۰۰ و ۹۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه تفاوتی را نشان نداد (P>۰/۰۵) و بیشتر از سطح صفر µg/mL عصاره علف چشمه بود (P<۰/۰۵). کمترین تحرک پیش-رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم مربوط به مقدار ۱۲۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه بود (P<۰/۰۵). بیشترین و کمترین تحرک پیش‌رونده، سلامت غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم به ترتیب مربوط به زمان‌های صفر و ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی بود (P<۰/۰۵).

اثر متقابل علف چشمه و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در زمان صفر، تحرک و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم بین تیمارها تفاوتی را نشان نداد (شکل ۱-A و B؛ ۰/۰۵< P). در زمان ۲۴، تحرک پیش‌رونده اسپرم در مقدار صفر (۷۰/۶±۳/۰۱٪)، ۳۰۰ (۷۳/۷۵±۳/۰۱٪) و ۶۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه (۷۲/۸±۳/۰۱٪) بیشتر از ۱۲۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه (۵۷/۰±۳/۱۰٪) بود (شکل ۱-A؛ P<۰/۰۵) و با تحرک اسپرم در مقدار ۹۰۰ µg/mL عصار علف چشمه (۶۹/۷۵±۳/۰۱٪) تفاوتی را نشان نداد (P>۰/۰۵). در زمان ۴۸، تحرک پیش‌رونده اسپرم در مقدار ۶۰۰ µg/mL علف چشمه (۶۳/۸±۳/۳۷٪) بیشتر از صفر (۴۹/۳±۳/۳۷٪)، ۹۰۰ (۵۰/۸±۳/۰۱٪) و ۱۲۰۰ µg/mL (۴۴/۶±۳/۰۱٪) عصاره علف چشمه بود (۰/۰۵> P) ولی تفاوتی با ۳۰۰ µg/mL (۵۵/۸±۳/۰۱٪) عصاره علف چشمه نداشت (P>۰/۰۵). در زمان ۷۲، تحرک اسپرم در مقدار ۶۰۰ µg/mL (۵۱±۳/۳۷٪) عصاره علف چشمه بیشتر از صفر (۳۶/۶±۳/۰۱٪) و ۹۰۰ µg/mL (۳۶/۵±۳/۳۷٪) عصاره علف چشمه بود (P<۰/۰۵). ولی با مقدار ۳۰۰ µg/mL (۴۲/۶±۱/۰۳٪) عصاره علف چشمه تفاوتی را نشان نداد (P>۰/۰۵). پس از ۷۲ ساعت ذخیره-سازی اسپرم، کمترین تحرک در مقدار ۱۲۰۰ µg/mL میکروگرم عصاره علف چشمه (۲۴/۰±۳/۳۷٪) بود (P>۰/۰۵).

در زمان ۲۴ ساعت ذخیره‌سازی، سلامت غشای‌پلاسمایی اسپرم در مقدار ۶۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه (۹۳/۶±۱/۰۴٪) بیشتر از ۹۰۰ (۸۸/۰±۱/۱۶٪) و ۱۲۰۰ µg/mL (۸۹±۱/۴۳٪) عصاره علف چشمه بود (شکل ۱-B؛ P<۰/۰۵). در زمان ۴۸ ذخیره‌سازی، سلامت غشای - پلاسمایی اسپرم در مقدار ۶۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه (۹۰/۲۵±۱/۱۶٪) بیشتر از مقدار صفر (۸۵/۸±۱/۰۴٪)، ۹۰۰ (۸۴/۲±۱/۰۴٪) و ۱۲۰۰ µg/mL (۸۱/۶±۱/۰۴٪) عصاره علف چشمه بود (P<۰/۰۵) و با سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در مقدار ۳۰۰ µg/mL (۸۷/۷۵±۱/۱۶٪) عصاره علف چشمه تفاوتی را نشان نداد (P>۰/۰۵). در زمان ۷۲ ذخیره‌سازی، سلامت غشای-پلاسمایی در مقدار ۶۰۰ µg/mL (۷۹/۷±۱/۳۴٪) عصاره علف چشمه بیشتر از ۹۰۰ µg/mL (۷۷/۳±۱/۳۴٪) عصاره علف چشمه بود و با مقدار صفر (۸۰/۰±۱/۱۶٪) و ۳۰۰ µg/mL (۷۹/۶±۱/۰۴٪) عصاره علف چشمه تفاوت نشان نداد (P>۰/۰۵).

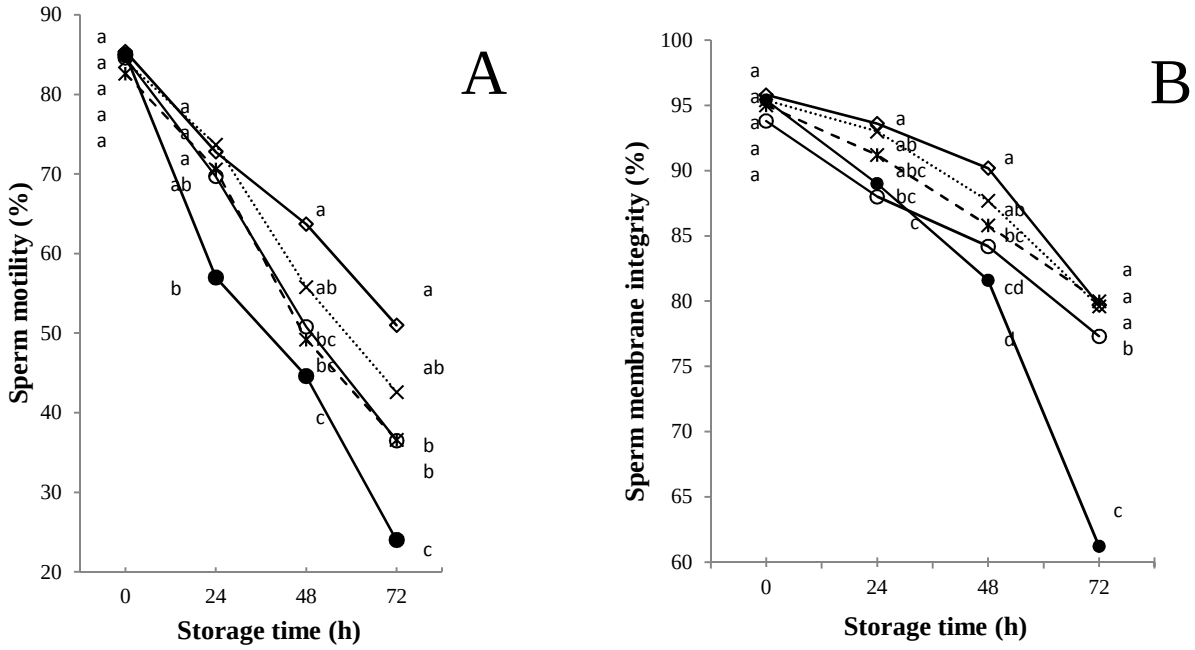

Fig. 1. (A) Percentage of motility and (B) membrane integrity of rooster spermatozoa treated with either 0 (*), 300 (×), 600 (◊), 900 (○) or 120 g/mL (●) Watercress extract during storage at 4°C.[a-d] Different superscripts indicate significant differences among treatments in each storage time ($P < 0.05$)

شکل ۱- درصد تحرک و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم خروس تحت تاثیر مقدار صفر، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰ یا µg/mL ۱۲۰۰ عصار علف چشمه در طول خیره سازی در °C ۴. [a-d] حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در هر زمان است (P<۰/۰۵)

کمترین سلامت غشای پلاسمایی در مقدارµg/mL۱۲۰۰ (۱/۰۴±۶۱/۲٪) عصاره علف چشمه و در زمان ۷۲ مشاهده شد (P<۰/۰۵).

بحث

نتایج نشان داد که غلظت MDA در تیمارهای کمتر و بیشتر از µg/mL ۶۰۰ عصاره علف چشمه تفاوتی با شاهد نداشتند و کمترین غلظت MDA در تیمار µg/mL ۶۰۰ عصاره علف چشمه مشاهد شد. بنابراین به نظر می‌رسد تولید MDA در هنگام افزودن عصاره علف چشمه به منی خروس وابسته به غلظت عصاره علف چشمه است. به علاوه، بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره علف چشمه در غلظت µg/mL ۶۰۰ حاصل می‌شود. عصاره علف چشمه حاوی مقدار قابل توجه از فلاوئونیدی به نام کوئرسیتین است که به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قدرتمند شناخته شده است (Gill *et al.*, 2007). گزارش شده است که افزودن کوئرسیتین به میزان۳۰ (Moretti *et al.*, 2012)، ۵۰ (Zribi *et al.*, 2012) و µM ۱۰۰-۲۰ (Ben Abdallah *et al.*, 2011) به منی انسان مانع از آثار مخرب رادیکال‌های آزاد در روند ذخیره‌سازی اسپرم می‌شود. همچنین، اثر آنتی‌اکسیدانی کوئرسیتین در کشت سلول-های بیضه جنین جوجه به اثبات رسیده است (Mi *et al.*, 2009; Mi *et al.*, 2010). همچنین، کوئرستین سبب کاهش تنش اکسیداتیو در بافت بیضه و کلیه موش صحرایی می‌شود (Aldemir *et al.*, 2013). مشخص شده است که کوئرسیتین در غلظت کم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌های سویه A549 را افزایش می‌دهد، در حالیکه غلظت‌های زیاد کوئرسیتین قدرت زنده‌مانی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم سوپر دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون ترانسفراز را کاهش می‌دهد (Robaszkiewicz *et al.*, 2007). همچنین، Sanocka and Kurpisz (2004) نشان دادند که عملکرد بهینه آنتی‌آکسیدان‌ها در غلظت-های معینی به وقوع می‌پیوندد، به طوریکه با افزایش غلظت، عملکرد آن‌ها معکوس شده و سبب القای

اکسیداسیونی می‌شوند. این موضوع در مورد سایر آنتی-اکسیدان‌ها با منشا گیاهی مانند عصاره چای سبز (Chung *et al.*, 2001) و سیلی‌مارین (Gharagozloo and Amirghofran, 2007) نیز به اثبات رسیده است. بنابراین اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره علف چشمه وابسته به غلظت آن است و در غلظت‌های زیاد عصاره علف چشمه قادر به مهار پراکسیداسیون چربی‌ها نیست.

نتایج نشان داد که پس از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی در °C ۴، سلامت غشای پلاسمایی و تحرک اسپرم در تیمار ۶۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه بیشتر از شاهد بود. همچنین، تحرک اسپرم در تیمار ۶۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه پس از ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی بیشتر از شاهد بود. بعلاوه، اثر مستقل عصاره علف چشمه بر زنده‌مانی اسپرم نشان داد که افزودن ۶۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه سبب بهبود زنده‌مانی اسپرم می‌شود. گزارش شده است که افزودن ۳۰-۵۰ µM کوئرسیتن به منی انسان سبب بهبود سلامت DNA، تحرک و زنده‌مانی اسپرم می-شود (Moretti *et al.*, 2012; Zribi *et al.*, 2012). افزودن کوئرسیتن به منی اسب در روند انجماد سبب بهبود سلامت DNA و تحرک اسپرم شده است (Gibb et al., 2012). تزریق روزانه ۱۵ mg/Kg کوئرستین به داخل صفاق (Khaki *et al.*, 2010) یا ۲۷۰ mg/Kg کوئرسیتن به زیر جلد (Taepongsorat *et al.*, 2008) موش صحرایی سبب بروز آثار مفید در غلظت تستوسترون پلاسما، غلظت اسپرم، زنده‌مانی و تحرک اسپرم شده است. همچنین، کوئرسیتن سبب کاهش اثر مخرب آلاینده‌های هوا بر دستگاه تولیدمثل شده است (Izawa *et al.*, 2008). مشخص شده است که کوئرسیتن با افزایش تولید انرژی و ATP در متیوکندری اسپرم و مهار گلیگولیز، مانع اسیدی شدن محیط می‌شود و در نتیجه سبب حفظ کیفیت اسپرم در روند ذخیره‌سازی خواهد شد (Nass-Arden and Breitbart, 1990). از طرفی، نتایج این تحقیق با نتایج حاصل از افزودن سایر آنتی اکسیدان‌های سنتزی و طبیعی به منی موجودات زنده همخوانی دارد. گزارش شده است که افزودن ویتامین E به عنوان آنتی‌اکسیدان به منی رقیق شده خروس (Blesbois *et al.*, 1993; Tabatabaei *et al.*, 2011)، بوقلمون (Donoghue and Donoghue, 1997) و خوک (Breininger *et al.*, 2005) سبب بهبود ماندگاری و تحرک اسپرم طی ذخیره‌سازی در °C ۴ شده است. همچنین افزودن آنتی‌اکسیدان‌های با منشا گیاهی مانند کاتچین به منی بز سبب بهبود تحرک اسپرم طی ذخیره‌سازی در °C ۵ شده است (Purdy *et al.*, 2004). مشخص شده است که بهبود فعالیت آنزیم-های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در نتیجه افزودن لیکوپن به جیره موش‌هایی که در شرایط تنش اکسیداتیو قرار داشتند، سبب افزایش تحرک اسپرم می‌شود (Turk *et al.*, 2007). افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون چربی‌ها سبب اختلال در غشای میتوکندری، کاهش میزان ATP و آسیب آکسونم اسپرم می‌شود که در نهایت باعث کاهش حرکت پیش‌رونده اسپرم خواهد شد (Long and Kramer, 2003; Sanocka and Kurpisz, 2004; Cerolini *et al.*, 2006). بنابراین، احتمالاً افزودن مقدار ۶۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه به منی خروس می‌تواند سبب بهبود ماندگاری اسپرم خروس در هنگام ذخیره‌سازی منی در دمای °C ۴ شود.

نتایج نشان داد پس از ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی در °C ۴، کمترین تحرک و سلامت غشای پلاسمایی در تیمار ۱۲۰۰ µg/mL مشاهده شد. همچنین اثر مستقل عصاره علف چشمه بر زنده‌مانی نشان داد که کمترین زنده‌مانی در سطح ۱۲۰۰ µg/mL وجود داشت. بنابراین غلظت ۱۲۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه بر اسپرم خروس اثر مخرب دارد. اگر چه مطالعه‌ای در خصوص اثر مخرب مقادیر زیاد عصاره علف چشمه بر سلول‌های پستانداران وجود ندارد ولی LD_{50} عصاره علف چشمه به صورت خوراکی در موش برابر ۵ g/Kg گزارش شده است (Sadeghi *et al.*, 2014). به نظر می‌رسد مقادیر بیشتر از ۶۰۰ µg/mL عصاره علف چشمه احتمالاً به واسطه تغییر در تونسیته محیط و یا اختلال در تعادل اکسیداسیون–احیا سبب کاهش ماندگاری اسپرم خروس می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

افزودن ۶۰۰ میکروگرم عصاره علف چشمه سبب بهبود ماندگاری اسپرم خروس طی ذخیره‌سازی در ۴ درجه سانتی‌گراد می‌شود.

فهرست منابع

آخوندزاده ش.، پسیان م.، تقی‌زاده م.، خانی م.، راشت‌نیا ب.، فلاح‌حسینی ح.، لطف‌اللهی‌شبستری ا. و مهرناز ز. ۱۳۷۹. دایره-المعارف گیاهان دارویی و معطر ایران. انتشارات ارجمند- تهران

Aldemir M., Okulu E., Kösemehmetoğlu K., Ener K., Topal F., Evirgen O., Gürleyik E. and Avcı A. 2013. Evaluation of the protective effect of quercetin against cisplatin-induced renal and testis tissue damage and sperm parameters in rats. Andrologia, doi: 10.1111/and.12197.

Ben Abdallah F., Zribi N. and Ammar-Keskes L. 2011.Antioxidative potential of Quercetin against hydrogen peroxide induced oxidative stress in spermatozoa in vitro. Andrologia, 43: 261-265.

Blesbois E., Grasseau I. and Blum. J. C. 1993. Effects of vitamin E on fowl semen storage at 4ºc. Theriogenology, 39: 771–779.

Breque, C., Surai P., and Brillard J. P. 2003. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. Molecular Reproduction and Development, 66: 314-323.

Burrows W. H. and Quinn J.P. 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry Science, 14: 251-254.

Casanova N. A. and Carballo M. A. 2011. Antigenotoxic activity of watercress extract in an in vitro mammalian system using comet assay. Phytotherapy Research, 25: 1743-1746.

Catoni C., Martin Schaefer H. and Peters A. 2008. Fruit for health: the effect of flavonoids on humoral immun response and food selection in a frugivorous bird. Functional Ecology, 22: 649-654.

Cerolini S., Zainiboni L., Maldjian A. and Gliozzi T. 2006. Effect of docosahexaenoic acid and α-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. Theriogenology, 66: 877-886.

Chung L. Y., Cheung T. C., Kong S. K., Fung K. P., Choy Y. M., Chan Z. H. and Kwok T. T. 2001. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. Life Sciences 68: 1207-1214.

Donoghue A. M. and D. J. Donoghue. 1997. Effect of water and lipid soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity and motility during liquid storage. Poultry Science, 76: 1440-1445.

Douard V., Hermier D., Magistrini M., Labbe C. and Blesbois E. 2004. Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology, 61: 1-13.

Elangovan A. V., Verma S. V. S., Sastry V. R. B. and Singh S. 2000. Effect of feeding neem (Azadirachta indica) kernel meal on growth, nutrient utilization and physiology of Japanese quails (Coturnix cotrnix japonica). Asian- Australian Journal of Animal Science, 13: 125-128.

Foote R. H., 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. . Journal of Animal Science, 80(E Suppl 2): 1-8.

Gharagozloo M. and Amirghofran Z. 2007. Effects of silymarin on the spontaneous proliferation and cell cycle of human peripheral blood leukemia T cells. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 133: 525-532.

Gibb Z., Butler T. J., Morris L. H., Maxwell W. M. and Grupen C. G. 2013. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. Theriogenology, 79: 1001-1009.

Gill C., Haldar S., Boyd L. A., Bennett R., Whiteford J., Butler M., Pearson J. R., Bradbory I. and Rowland A. 2007. Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. The American Journal of Cilinical Nutrition, 85: 504-510.

Halvorsen B. L., Holte K., Myhrstad M. C. W., Barikomo I., Hvattum E., Remberg S. F., Wold A. B., Haffner K., Baugerød H., Andersen L. F., Moskaug Ø., Jacobs D. R. Jr. and Blomhoff R. 2002. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. The Journal of Nutrition, 132: 461-471.

He X., Song W., Liu C., Chen S. and Hua J. 2014. Rapamycin inhibits acrolein-induced apoptosis by alleviating ROS-driven mitochondrial dysfunction in male germ cells. Cell Proliferation, 47: 161-171.

Izawa H., Kohara M., Aizawa K., Suganuma H., Inakuma T., Watanabe G., Taya K. and Sagai M. 2008. Alleviative effects of quercetin and onion on male reproductive toxicity induced by diesel exhaust particles. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 72:1235-1241.

Khaki A., Fathiazad F., Nouri M., Khaki A., Maleki N. A., Khamnei H. J. and Ahmadi P. 2010Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induceddiabetic male rats. Phytotherapy Research, 24: 1285-1291.

Kumaresan A., Kadirvel G., Bujarbaruah K. M., Bardoloi R. K., Das A., Kumar S. and Naskar S. 2009. Preservation of boar semen at 18 oC induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. Animal Reproduction Science, 110: 162-171.

Leeuw A. M., Daas G. H. J. and Woelders H. 1991. The fix vital stain method simultaneous determination of viability and acrosomal and status of bovine spermatozoa. Journal of Andrology, 12: 112-118.

Long J. and Kramer M. 2003. Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. Poultry Science, 82: 1802-1807.
Mi Y., Zhang C., Li C., Taneda S., Watanabe G., Suzuki A. K. and Taya K. 2010. Quercetin attenuates oxidative damage induced by treatment of embryonic chicken spermatogonial cells with 4-nitro-3-phenylphenol in diesel exhaust particles. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 74: 934-938.
Mi Y., Zhang C., Li C., Taneda S., Watanabe G., Suzuki A. K. and Taya K. 2010. Protective effect of quercetin on the reproductive toxicity of 4-nitrophenol in diesel exhaust particles on male embryonic chickens. The Journal of Reproduction and Development, 56: 195-199.
Moce E., Grasseau I. and Blesbois E. 2010. Cryoprotectant and freezing process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. Animal Reproduction Science, 122: 359-366.
Moreno J. S., Castaño C., Coloma M. A., Brunet A. G., Díaz A. T., Sebastián A. L. and Campo J. L. 2009. Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. Poultry Science, 88: 2661-2669.
Moretti E., Mazzi L., Terzuoli G., Bonechi C., Iacoponi F., Martini S. and Rossi C. 2012. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. Reproductive Toxicology 34: 651-657.
Mosha T. C., Pace R. D., Adeyeye S., Laswai H. S. and Mtebe K. 1997. Effect of traditional processing practices on the content of total carotenoid, b-carotene, a-carotene and vitamin A activity of selected Tanzanian vegetables. Plant Foods for Human Nutrition, 50: 189- 201.
Nair M., Kandaswami C., Mahjan S., Chadha K. C., Chawda R., Nair H., Kumar N., Nair R. E. and Schwartz S. A. 2002. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFNγ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. Biochimica et Biophysica Acta, 1593: 29- 36.
Nass-Arden L. and Breitbart H., 1990, Modulation of mammalian sperm motility by quercetin. Molecular Reproduction and Development, 25: 369-73.
Poli G. 1993. Liver damage due to free radicals. British Medical Bulletin, 49: 604- 620.
Purdy P. H., Ericsson S. A., Dodsona 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: 239-243.
Rice-Evans C. A., Miller N. J. and Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine, 20: 933- 956
Robaszkiewicz A., Balcerczyk A. and Bartosz G. 2007. Antioxidative and prooxidative effect of quercetin on A549 cell. Cell Biology International, 31: 1245-1250.
Sadeghi H., Mostafazadeh M., Sadeghi H., Naderian M., Barmak M. J., Talebianpoor M. S. and Mehraban F. 2014. In vivo anti-inflammatory properties of aerial parts of Nasturtium officinale. Pharmaceutical Biology, 52: 169-174
Sanocka D. and Kurpisz M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. Reproductive Biology and Endocrinology, 2: 1-7.
Seidel G. E. Jr. 2003. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. Theriogenology, 59: 585-598.
Tabatabaei S. 2012. Effect of ascorbic acid on chicken semen qualityduring liquid storage. Comparative Clinical Pathology, 21: 621-626.
Taepongsorat L., Tangpraprutgul P., Kitana N. and Malaivijitnond S. 2008. Stimulating effects of quercetin on sperm quality and reproductive organs in adult male rats. Asian Journal of Andrology, 10: 249-258.
Turk G., Atessahin A., Sonmez M., Yuce A. and Osman A. 2007. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. Theriogenology, 67: 778-785.
Yazdanparast R., Bahramikia S. and Ardestani A. 2008. Nasturtium officinale reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. Chemico-Biological Interactions, 172: 176-184.
Zribi N., Chakroun N. F., Ben Abdallah F., Elleuch H., Sellami A., Gargouri J., Rebai T., Fakhfakh F. and Keskes L. A. 2012. Effect of freezing-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. Cryobiology, 65: 326-331.

Animal Production Research
Vol. 4, No. 1, 2015 (15-24)

University of Guilan

Effect of Watercress extract on rooster semen during storage at 4°C

M. Roostaei-Ali Mehr[1*], B. Adishi[2]

1. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. MS.c student of Animal Physiology, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: 15-11-2014 – Accepted: 1-5-2015)

Abstract

An experiment was conducted to evaluate the effect of Watercress extract on rooster sperm storage at 4 °C by using 15 mature roosters. Semen collection was performed twice a week in 5 times. In each session, ejaculates were pooled and split into five parts. The amount of 0, 300, 600, 900 and 1200 µg/mL Watercress extract were added to each part. After that, samples were chilled to 4 °C and kept until 72 h. Sperm viability (by staining Hoechst 33258), motility and membrane integrity were evaluated at 0, 24, 48 and 72 h. To determine lipid peroxidation, the concentration of malondialdehid (MDA) was evaluated by using 300×10^6 spermatoza at 48 h. The results showed that the lowest of concentration of MDA (1.0 µM/mL) was in 600 µg/mL Watercress extract ($P<0.05$). The main effect of watergrass on sperm viability showed that viability of spermatozoa was lowest (73.4%) in 1200 µg/mL Watercress extract level ($P<0.05$). There was interaction between Watercress extract and storage time on sperm motility and membrane integrity ($P<0.05$). After 48 h incubation, membrane integrity was higher in 600 µg/mL (90.70%) Watercress extract than control (85.80%; $P<0.05$). At 72 h, there was no difference between 600 (51±3.36) and 300 (42.60±3.01) µg/mL Watercress extract on sperm motility ($P>0.05$) and it was higher in 600 µg/mL Grass water extract than other treatments ($P<0.05$). Therefore, the addition of 600 µg/mL Watercress extract to semen improves longevity of rooster spermatozoa at 4 °C.

Key words: Antioxidant, Flaviod, Rooster, Spermatozoa

*Corresponding author: roostaei@guilan.ac.ir