ارزیابی تأثیر مقایسه‌ای غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی بابونه بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی‌شده در قوچ

حسین دقیق‌کیا[1*]، فاطمه صادقی‌صادق‌آباد[2]، مرضیه ابراهیمی[3]، فرهاد صمدیان[4]

۱- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
٤- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: daghighkia@tabrizu.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۵/٦/۷ پذیرش نهایی: ۱۳۹٦/۲/۲۰)

چکیده

استرس اکسیداتیو به‌وجودآمده در طول فرآیند انجماد-یخ‌گشایی اسپرم باعث کاهش تحرک، زنده‌مانی، عملکردهای غشایی و در نهایت باروری سلول‌های اسپرم می‌شود. هدف این مطالعه بررسی تأثیر عصاره گیاه بابونه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی‌شده قوچ بود. در این مطالعه از ۵ رأس قوچ دو بار در هفته توسط واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شد و جهت از بین بردن اثرات فردی دام‌ها، انزال‌ها به نسبت مساوی باهم مخلوط شدند. سطوح مختلف عصاره گیاه بابونه (صفر، ۵۰، ٦٦/٦٦، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر) به رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ-تریس افزوده شد. نمونه‌ها بعد از طی مراحل سردسازی و پرشدن در پایوت‌ها، در بخار ازت منجمد شده و تا زمان ارزیابی در ازت مایع نگه‌داری شدند. نتایج ارزیابی نشان داد که افزودن ٦٦/٦٦ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره بابونه باعث بهبود معنی‌دار صفات تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، سرعت در مسیر منحنی، سرعت در مسیر مستقیم، راستی مسیر طی شده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های تیماری شد (p<۰/۰۵). همچنین افزودن ۲۰۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره به‌طور معنی‌داری اثر منفی روی صفات تحرکی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی داشت (p<۰/۰۵). استفاده از سطوح مختلف عصاره گیاه بابونه موجب کاهش معنی‌دار غلظت مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه شاهد نشد ولی کاهش تولید مالون‌دی‌آلدئید در سطح ٦٦/٦٦ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر نسبت به سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر معنی‌دار بود.

کلیدواژه‌ها: استرس اکسیداتیو، اسپرم، بابونه، آنتی‌اکسیدان طبیعی، انجماد-یخ‌گشایی.

مقدمه

ذخیره‌سازی طولانی مدت منی دام برای دست‌یابی به مزایای تلقیح مصنوعی یک امر ضروری محسوب می‌شود. این امر به‌وسیله فرآیند انجماد اسپرم محقق می‌شود که موجب توقف فعالیت‌های متابولیکی اسپرم‌ها شده و در نتیجه امکان ذخیره‌سازی نامحدود و بدون کاهش معنی‌دار باروری را در پی دارد (Bailey *et al.*, 2000). در مراحل مختلف عمل‌آوری، نگه‌داری و انجماد اسپرم، به‌دلیل تولید گونه‌های فعال اکسیژنی (Reactive oxygen species; ROS) که موجب ایجاد تنش‌های فیزیولوژیکی و شیمیایی در سطح غشای اسپرم می‌شوند، کیفیت، زنده‌مانی و قدرت باروری اسپرم منجمدشده کاهش می‌یابد (Mehdipour *et al.*, 2016).

گونه‌های فعال اکسیژنی ترکیب‌های واکنش‌پذیری هستند که به علت داشتن یک یا چند الکترون جفت نشده، می‌توانند با انواعی از ماکرومولکول‌های زیستی به‌ویژه لیپیدها، قندها و DNA واکنش داده و با اکسید نمودن آن‌ها منجر به تنش اکسیداتیو در سلول‌ها و در نهایت مرگ سلول شوند.

ایجاد تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژنی و پاک‌سازی آن‌ها توسط آنتی‌اکسیدان‌ها، یک عامل مهم در بقای سلول اسپرم و عملکرد طبیعی آن پیش و پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی می‌باشد. آسیب‌های ناشی از انجماد بر ساختار و عملکرد سلول‌های اسپرم می‌تواند به دو بخش مستقیم و غیرمستقیم تقسیم شوند. آسیب مستقیم بیشتر با شوک سرمایی مرتبط است که مدت کوتاهی پس از کاهش دما اتفاق می‌افتد ولی آسیب غیرمستقیم به‌سرعت سردسازی وابسته نبوده و تعیین مقدار آن دشوار است (Bilodeau *et al.*, 2002).

یون هیدروکسیل، سوپراکسید، هیدروژن پراکسید، رادیکال پراکسیل و یون هیپوکلریت نمونه‌هایی از گونه‌های فعال اکسیژنی می‌باشند که به‌شدت واکنش‌پذیر بوده و موجب آسیب‌دیدگی سلول‌های اسپرم می‌شوند (Najafi *et al.*, 2014). سلول اسپرم دارای غلظت‌های بالای اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد که مستعد پراکسیداسیون لیپیدی (Lipid peroxidation; LPO) و در نتیجه کاهش تحرک، یکپارچگی غشایی، باروری و تغییرات متابولیکی اسپرم است. برای مقابله با این مشکل، استفاده از آنتی-اکسیدان‌ها اهمیت زیادی پیدا می‌کند (Mehdipour *et al.*, 2016). اسپرم از مکانیسم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی برخوردار بوده اما مقدار آن کافی نبوده و برای فرآوری اسپرم نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدان‌هایی با منشأ خارجی می‌باشد (Bansal and Bilaspuri, 2010).

امروزه استفاده از گیاهانی که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند، اهمیت زیادی پیدا کرده است. در سال‌های اخیر در رابطه با خواص آنتی‌اکسیدانی برخی گیاهان پژوهش‌های بسیاری انجام‌شده است و انواع مختلفی از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان یافت شده است که می‌توانند برای کنترل رادیکال‌های آزاد و LPO مفید واقع شوند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برخی از گیاهان هم‌پایه و برخی حتی بالاتر از آنتی‌اکسیدان‌های صناعی است. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بیشتر شامل فنول‌های گیاهی هستند که چندکاره بوده و می‌توانند به عنوان عوامل احیاکننده عمل کنند. عصاره بسیاری از گیاهان دارای ترکیب‌های زیست فعال

ازجمله فنولیک‌ها و فلاونوییدها هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشته و از آسیب رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کنند (Malo *et al*., 2011).

ترکیب‌های فنولیک و فلاونوییدها به دلیل داشتن خواص اکسید و احیاءکنندگی و دهنده گروه هیدروکسیل، نقش مهمی در جذب و خنثی کردن ROS به‌ویژه رادیکال‌های آزاد و تجزیه پراکسیدها هستند (Daghigh Kia *et al*., 2016). ازجمله این گیاهان بابونه است که دارای ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. مطالعات پیشین نشان داده است که بابونه (Recutita L.) به‌عنوان یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان موجود در دنیا و با داشتن خواص گوناگون دارویی و فیزیولوژیکی ازجمله خواص ضدالتهابی و ضد نفخی، آنتی‌اکسیدانی و تحریک‌کنندگی سامانه ایمنی از موقعیت ممتازی برخوردار است (Aggag and Yousef, 1972; Sadighara *et al*., 2013; Tubaro *et al*., 1984). عصاره بابونه دارای بیش از ۱۲۰ نوع ترکیب شیمیایی است که از آن جمله می‌توان به ترپنوییدها (کامازولین‌ها)، فلاونوییدها (آپی‌ژنین و لوتیولین) و کومارین‌ها (آمبلی‌فرون، آلفا بیسابولول) اشاره کرد. از مهم‌ترین اجزای فعال موجود در این گیاه می‌توان کامازولین، آپی‌جنین و بیسابولول را نام برد. فلاونوییدهای آپی‌ژنین و لوتیولین دارای خاصیت ضدالتهابی، ضد نفخ و ضد اسپاسم می‌باشند. رنگ آبی روغن بابونه آلمانی ناشی از وجود الکل سزکویی‌ترپن آلفا بیسابولول، کامازولین و فلاونوییدها می‌باشد (Gardiner, 2007).

گیاه بابونه غنی از فلاونوییدها است که آنتی‌اکسیدان‌های مؤثری در خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد می‌باشند. فلاونوییدهای آن بیشتر از دسته فلاون‌ها و فلاونول‌ها می‌باشند که به‌صورت آزاد و یا گلیکوزیدی یافت می‌شوند. کوئرستین یکی از ترکیب‌های تشکیل‌دهنده عصاره بابونه است که با داشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پراکسیداسیون چربی‌ها را مهار کرده و می‌تواند با رادیکال‌های آزاد واکنش دهد (Masoumi Ardakani *et al*., 2010). در این مطالعه تأثیر افزودن سطوح مختلف عصاره گیاه بابونه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی بر کیفیت منی منجمدشده قوچ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در پائیز سال ۱۳۹٤ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام گرفت. بدین منظور پس از جمع‌آوری گیاه بابونه و تعیین گونه توسط همکاران گروه زراعت دانشگاه تبریز، قسمت‌های هوایی در سایه خشک و پودر شدند. ۵۰ گرم از گیاه با ۳۵۰ میلی‌لیتر الکل اتانول مطلق به مدت ٢٤ ساعت خیس‌خورده و پس از صاف کردن، به کمک دستگاه تقطیر، عصاره آن به‌دست آمد و تا زمان اجرای آزمایش در یخچال نگه‌داری شد. برای نفوذ بهتر الکل به گیاه پودری، هر نیم ساعت یک‌بار بشر هم زده شد. بعد از گذشت ٦ ساعت مخلوط گیاه و الکل توسط صافی نمره یک صاف شده و محلول صاف‌شده در یک بشر دیگر جمع شد و سپس تفاله باقی‌مانده دوباره با ۳۵۰ میلی‌لیتر الکل اتانول خیسانده و به روش قبلی عمل شد. بعد از سه مرتبه تکرار، محلولی که در بشر دیگری جمع‌آوری شده بود، به‌وسیله دستگاه تقطیر در خلأ (soxelet system) و در دمای ۷۵ درجه سلسیوس حرارت داده شد تا الکل آن به مرور تبخیر شد. بعد از جداسازی کامل الکل،

عصاره غلیظ که حالت قیری داشت در تـه بشـر بـاقی ماند. در نهایت عصاره تا زمان استفاده در دمای ٤ درجه سلسیوس نگـه‌داری شـد. در زمـان شـروع آزمـایش، از عصاره گیاه مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم به‌وسیله تـرازوی دقیـق وزن شده و در ۲۵ میلی‌لیتر آب، دوبار تقطیر حـل شـد. برای حلالیت بهتر عصـاره و امولسـیفه کـردن محلـول، مقدار ۱۵ میکرولیتر محلول توئین ۸۰ به آن افزوده شـد. سپس به کمک دستگاه اولتراسـوند و بـا کمـک نیـروی مغناطیسی بـه مـدت ۵ دقیقـه محلـول هـم زده شـد. از آنجائی که عصاره به‌دست‌آمده هنوز رقت بالایی داشت، بدین منظور عصاره بـا آب دو بـار تقطیـر و بـه نسـبت ۳۰:۷۰ رقیـق‌سـازی شـده و بـه مـدت ۱۰ دقیقـه روی دستگاه شیکر به هم زده و عصاره رقیق‌شـده در سـطوح مشـخص و در تکرارهـای آزمایشـی، در همـان روز استفاده شد.

در این تحقیق از پنج قوچ قزل ۳-۲ سـاله متعلـق بـه ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشـان دانشـگاه تبریـز جهـت استحصال منی استفاده شد. جمع‌آوری منـی هفتـه‌ای دو بار و با استفاده از واژن مصنوعی و در فصل تولیـدمثلی صورت گرفت. برای از بین بردن اثرات فـردی دام‌هـای نر مقادیر مساوی از نمونه‌های منی از هر پنج رأس قوچ در هر تکرار آزمایشی باهم مخلوط شده و سـپس مـورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های منی بـا غلظـت بـیش از $۳×۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر، جُنبایی بـیش از ۷۰ درصـد و اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی کمتـر از ۱۰ درصـد در هر انزال به‌عنوان منی طبیعی در نظر گرفته شدند.

برای ساخت رقیق‌کننده‌ها از یک محیط بر پایـه بـافر تریس استفاده شد (تریس ۲۷/۱ گرم/لیتر، اسید سیتریک ١٤ گرم/لیتر، گلوکز ۱۰ گرم/لیتـر). از گلیسـرول و زرده تخم‌مرغ به‌عنوان عوامل محافظ انجمادی استفاده گردید. اسمولاریته محیط پایه در ۳۲۵ میلـی اسـمول/کیلوگرم و اسـیدیته آن در ۷/۲ تنظـیم شـد. قبـل از شـروع کـار محیط‌های انجمادی در بـن‌مـاری ۳۷ درجـه سلسـیوس قرار داده شد. سپس زرده تخم‌مرغ به نسـبت ۲۰ درصـد و گلیسرول به نسبت هفت درصد به محیط پایـه تـریس اضافه شد. در مرحله بعد چهار سـطح مختلـف عصـاره گیـاه بابونـه (۵۰، ٦٦/٦٦، ۱۰۰، ۲۰۰ میلـی‌لیتـر در دسی‌لیتر) در محیط‌های انجمادی آماده اضافه‌شده و یک تیمار به‌عنوان شاهد (فاقد عصاره بابونه) در نظـر گرفتـه شد. رقیق‌سازی منی با محلول حـاوی سـطوح مختلـف عصاره گیاهی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجـام شـد. سـپس لولـه حـاوی منـی را در ظـرف محتـوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده و بـه مـدت ۱۲۰ دقیقه در یخچال در دمای ٤ درجه سلسیوس قـرار گرفت. بلافاصله بعد از سردسازی، نمونـه‌هـا بـه داخـل پـایوت‌هـای انجمـادی ۰/۵ میلـی‌لیتـر کشـیده و بسته‌بندی‌شده، سـپس در فاصـله ۵ سـانتی‌متـری بـالای سـطح ازت قـرار گرفتنـد. پـس از گذشـت ۱۲ دقیقـه، پایوت‌های منی با سـرعت بـه داخـل ازت مـایع (۱۹٦- درجه سلسیوس) انتقال یافتند.

ارزیابی منی: به‌منظور ارزیابی منی، پس از خارج کـردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، بـه مـدت ۳۰ ثانیـه در حمـام آبگـرم ۳۷ درجـه سلسـیوس قـرار داده شـدند. اولـین فراسنجه ارزیابی در این تحقیق، بررسی جنبـایی اسـپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی بـود. بـدین منظـور دو پایوت از هر گروه تیماری یخ‌گشایی شـده و بـه داخـل لوله‌های میکروتیوب انتقال داده شدند. سپس با برداشتن ۱۰ میکرولیتر از منی و گذاردن آن روی لام، پارامترهای

تحرک کلی، تحرک پیش‌رونده و پارامترهای جُنبایی اسپرم با استفاده از سیستم کامپیوتری ارزیابی اسپرم (CASA, Video Test Sperm 3.1 Russia) ارزیابی شدند.

برای بررسی یکپارچگی غشای اسپرم از محلول هایپواسموتیک (فروکتوز ۹ گرم/لیتر، سیترات سدیم ٤/۹ گرم/لیتر و اسمولاریته ۱۰۰ میلی‌اسمول/کیلوگرم) مطابق روش ریوال و همکاران در سال ۱۹۹٤ استفاده شد (Revell and Mrode, 1994). بعد از یخ‌گشایی، محتویات پایوت به داخل میکروتیوب دو میلی‌لیتری تخلیه‌شده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس قسمت بالای میکروتیوب که حاوی رقیق‌کننده بود، جداسازی شد. بعد از آن ۱۰ میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک اضافه شد، سپس ۳۰ دقیقه در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. در نهایت وضعیت اسپرم‌ها با تهیه حداقل سه قطره (۱۰ میکرولیتر) از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست بررسی شدند. در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش‌شده و درصد اسپرم‌ها با دم گره‌خورده (دارای غشای یکپارچه) نسبت به گره‌نخورده (دارای غشای آسیب‌دیده) و غیریکپارچه محاسبه شدند.

برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل سه قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر محلول هانکوک افزوده شد، سپس یک قطره از این محلول روی لام قرارگرفته و توسط یک لامل پوشانده شد. با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فاز کنتراست اسپرم‌های غیرطبیعی محاسبه شدند (Najafi *et al.*, 2013).

برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. با توجه به سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها، درصد سلول‌های زنده و مرده در میدان دید میکروسکوپی با بزرگنمایی ×٤۰ شمارش شدند. برای رنگ‌آمیزی، ۲۰ میکرولیتر از اسپرم رقیق‌شده با ۱۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین-نیگروزین به‌سرعت روی لام مخلوط گردید و گسترشی از آن تهیه شد. سپس در مجاورت هوا خشک شدند. در این تکنیک رنگ ائوزین در اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند، درحالی‌که اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. سلول‌هایی که رنگ بنفش گرفته‌اند به‌عنوان مرده و اسپرم‌هایی که به رنگ صورتی کم‌رنگ یا سفید دیده شدند، به‌عنوان زنده در نظر گرفته شدند.

غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید در نمونه‌های منی است که با استفاده از واکنش تیوباربیتوریک اسید (TBA) اندازه‌گیری می‌شود. یک میلی‌لیتر از هر نمونه منی با یک میلی‌لیتر اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید، یک میلی‌لیتر بوتیلید هیدروکسی تولئن و دو میلی‌لیتر تری کلرو-استیک اسید با هم مخلوط شده و به داخل لوله‌های مخروطی ریخته شدند. لوله‌های مخروطی در g ۱۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، یک میلی‌لیتر از محلول بالای لوله مخروطی با یک میلی‌لیتر TBA در میکروتیوب مخلوط گردید. لوله مخروطی به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۹۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شده، سپس جذب نوری در طول‌موج

۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. جذب نوری نمونه‌های مختلف یادداشت شده و در پایان غلظت MDA (نانومول در میلی‌لیتر منی) محاسبه شد (Mehdipour *et al*., 2016).

تحلیل آماری داده‌ها : این مطالعه در چهار تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی به کمک نرم‌افزار SAS رویه GLM از لحاظ آماری تحلیل گردید. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن انجام گرفت. سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. مدل آماری این طرح عبارت بود از:

$$Y_{ij} = \mu + Treat_i + e_{ij}$$

که در این مدل، Y_{ij} برابر است با داده مشاهده شده برای فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده، μ= میانگین جامعه، Treati=اثر تیمار i ام برابر است با اثر تیمار و e_{ij}= اثر باقیمانده یا خطا می‌باشد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها برای پارامترهای تحرک در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان داد که افزودن ٦٦/٦٦ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره بابونه باعث بهبود معنی‌دار صفات تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، سرعت در مسیر منحنی، سرعت در مسیر مستقیم و راستی مسیر طی‌شده نسبت به سایر گروه‌های تیماری و گروه شاهد شده ($p<۰/۰۵$) ولی در مورد صفات سرعت در مسیر میانگین، تحرک عرضی سر و خطی بودن تحرک تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد به همراه نداشته است. استفاده از سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره گیاه بابونه تفاوت معنی‌داری را در هیچ‌یک از صفات تحرکی نسبت به گروه شاهد موجب نشد. صفت تحرک عرضی سر اسپرم نیز تحت تأثیر هیچ‌کدام از گروه‌های تیماری قرار نگرفت. از طرف دیگر افزودن سطح ۲۰۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره گیاه بابونه باعث کاهش معنی‌دار تمامی صفات تحرکی به‌جز تحرک عرضی سر، خطی بودن تحرک و راستی مسیر طی‌شده گردید.

جدول ۱- مقایسه فراسنجه‌های تحرک اسپرم منجمد-یخ‌گشایی‌شده قوچ در بین سطوح مختلف عصاره بابونه (میلی‌لیتر در دسی‌لیتر رقیق‌کننده)

گروه / صفات	شاهد	بابونه ۵۰ (ml/dl)	بابونه ٦٦/٦٦ (ml/dl)	بابونه ۱۰۰ (ml/dl)	بابونه ۲۰۰ (ml/dl)
تحرک کل (٪)	٤٢/٢٥±١٢/٣^{c}	٣٩/٠٠±٠/٨^{bc}	٥٦/٢٥±٤/٧^{a}	٣٨/٢٥±٢/٣^{bc}	٣٤/٧٥±٥/٣^{d}
تحرک پیش‌رونده (٪)	٢٢/٠٠±٢/٥^{b}	٢٤/٢٥±٢/٨^{b}	٣٣/٢٥±١/٥^{a}	١٩/٧٥±٢/٨^{bc}	١٥/٢٥±٢/٢^{c}
سرعت در مسیر میانگین (μm/sec)	٥٣/٨٤±٥/٦^{a}	٤٤/٩١±١٢/٥^{ab}	٥٥/٦٢±٥/٥^{a}	٤٣/٦٨±٧/٤^{ab}	٣٧/٥٨±١٢/١^{b}
سرعت در مسیر منحنی (μm/sec)	٦٢/٣٩±٥/٦^{b}	٦١/٣٧±١٠/٣^{bc}	٧٣/٤٩±٦/٧^{a}	٥٦/٥٨±٤/٢^{bc}	٤٩/٣±١٢/٧^{c}
سرعت در مسیر مستقیم (μm/sec)	٣٤/٧٢±٤/٠^{b}	٢٧/٤٥±٥/٦^{c}	٤٢/٢٩±٣/٨^{a}	٢٣/١٨±٥/٢^{dc}	١٨/٩٦±٤/٥^{d}
تحرک عرضی سر (μm)	٢/٦٥±٠/٤	٢/٤٥±٠/٢	٢/٥٧±٠/٦	٢/٢٤±٠/٢	٢/١٧±٠/٢
خطی بودن تحرک (٪)	٥٣/١٠±٤/٢^{ab}	٤٥/٧٦±١١/٥^{abc}	٥٧/٥٩±٢/٣^{a}	٤١/٣٣±١١/١^{bc}	٣٣/٩١±١١/٤^{c}
راستی مسیر طی شده (٪)	٦٤/٥٩±٥/٧^{bc}	٦٣/٢٣±١١/٩^{bc}	٧٦/٠٩±١/٨^{a}	٥٣/٥٩±١٠/٧^{c}	٥٢/١٠±٨/٢^{c}

a,b,c: حروف غیرمشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح است ($p<۰/۰۵$).

نتایج حاصل از آنالیز اثرات سطوح مختلف عصاره بابونه بر صفات زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و همچنین میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید در جدول ۲ آورده شده است. داده‌های جدول نشان می‌دهند که افزودن سطح ٦٦/٦٦ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره بابونه باعث بهبود زنده‌مانی اسپرم‌ها نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های تیماری شد درحالی‌که افزودن سطح ۲۰۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها را در مقایسه با گروه شاهد و سایر گروه‌های تیماری به‌طور معنی‌داری کاهش داد (p<۰/۰۵). سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر نسبت به گروه شاهد تأثیر معنی‌داری نشان ندادند. یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم‌های منجمد یخ گشایی شده در سطح ٦٦/٦٦ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر نسبت به گروه شاهد و سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر به صورت معنی‌دار بهبود یافت (p<۰/۰۵) ولی این بهبود در مقایسه با سطح ۵۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر معنی‌دار نبود. همچنین استفاده از سطح ۲۰۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره بابونه موجب کاهش معنی‌دار یکپارچگی غشای پلاسمایی نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های تیماری شد. هیچ‌کدام از گروه‌های تیماری موجب تفاوت معنی‌دار در درصد اسپرم‌های غیرطبیعی نشدند. استفاده از سطوح مختلف عصاره گیاه بابونه موجب کاهش معنی‌دار غلظت مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه شاهد نشد ولی کاهش تولید مالون‌دی‌آلدئید در سطح ٦٦/٦٦ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر نسبت به سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر معنی‌دار بود.

جدول ۲- مقایسه صفات زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، اسپرم‌های غیرطبیعی و تولید مالون‌دی‌آلدئید اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ در بین سطوح مختلف عصاره بابونه (میلی‌لیتر در دسی‌لیتر محلول رقیق‌کننده)

صفات	گروه	شاهد	بابونه ۵۰ (ml/dl)	بابونه ٦٦/٦٦ (ml/dl)	بابونه ۱۰۰ (ml/dl)	بابونه ۲۰۰ (ml/dl)
زنده‌مانی (٪)		٤٨/٧٨±٢/٣^{b}	٤٣/٥٩±٣/٩^{b}	٥٩/٦٩±٢/٥^{a}	٤٢/٥١±٢/٧^{bc}	٣٧/١٣±٤/٦^{c}
یکپارچگی غشای پلاسمایی (٪)		٤١/١٩±٦/٢^{b}	٣٦/٩١±١/٦^{ab}	٤٩/٦٠±٢/٩^{a}	٣٦/٠٨±٣/٩^{bc}	٣١/١٦±١/٢^{d}
غیرطبیعی بودن (٪)		٢٣/٨٢±٤/٦	٢٤/٠٨±٢/٦	٢١/٣٤±٤/٤	٢٤/٧٥±٨/٧	٢٦/٢±١٠/٧
غلظت مالون‌دی‌آلدئید (nmol/ml)		٢/٣٩±٠/٣^{abc}	٢/٥٥±٠/٧^{abc}	١/٩٧±٠/٦^{bc}	٣/٠٣±٠/٦^{a}	٣/١±٠/٥^{a}

a,b,c: حروف غیرمشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح است (p<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

در شرایط فیزیولوژیک تعادلی بین تولید ROS و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی منی وجود دارد طوری‌که، تولید بیش از حد ROS موجب اختلال در عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی منی و در نهایت عملکرد اسپرم می‌شود (Baumber and Ball, 2005). مطالعات نشان داده‌اند که سیستئین و گلوتاتیون موجب بهبود معنی‌دار تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشای اسپرم گونه‌های مختلف پستانداران بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی می‌شود (Tasdemir *et al.*, 2013). عصاره گیاه بابونه با داشتن ترکیب‌های فنولیک فراوان و نام‌آشنا، در اکثر تحقیقات دارویی استفاده شده است. در این مطالعه تأثیر عصاره بابونه بر پارامترهای حرکتی و زنده‌مانی اسپرم قوچ بررسی شده است. تاکنون مطالعه‌ای برای بررسی اثر

عصاره بابونه بر فرآیند انجماد اسپرم صورت نگرفته است و این مطالعه اولین مطالعه‌ای است که اثر عصاره بابونه را روی فرآیند انجماد اسپرم مورد بررسی قرار می‌دهد. بنابراین، به علت نبود مطالعات مشابه در این زمینه، نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه با سایر عصاره‌ها مقایسه شده است.

افزودن عصاره بابونه به رقیق‌کننده منی قوچ، بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی در مقایسه با گروه شاهد، موجب بهبود پارامترهای مربوط به تحرک اسپرم شد. عصاره این گیاه با مهار تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد موجب بهبود تحرک اسپرم نسبت به گروه شاهد شد، به‌طوری‌که در تیمار ٦٦/٦٦ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره بابونه، ٥٦/٢٥ درصد تحرک کل حاصل شد.

در مطالعه‌ای تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه بابونه بر محور هورمونی هیپوفیز-گناد و بافت بیضه موش‌های صحرایی بالغ مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن نشان داد که عصاره بابونه منجر به تغییر در عملکرد و ساختار بیضه و محور هورمونی هیپوفیز-گناد در موش‌های صحرایی می‌شود (Hatami and Estakhr, 2013). گیاه بابونه غنی از فلاونوئیدها و ترکیبات فنولیک است که آنتی‌اکسیدان‌های مؤثری در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن‌دار می‌باشند. به نظر می‌رسد عصاره بابونه به دلیل کاهش رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش صدمه به اسپرم باعث بهبود پارامترهای اسپرم می‌شود.

نتایج ما با نتایج دقیق‌کیا و همکاران در سال ٢٠١٤ که نشان دادند استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی موجب بهبود ویژگی‌هایی چون تحرک کلی، سرعت حرکت اسپرم، قابلیت زیست، تست تورم-هیپواسموتیک (Hypo-Osmotic Swelling Test; HOST) پراکسیداسیون لیپید و فعالیت گلوتاتیون بلافاصله بعد از ذوب در اسپرم می‌شود، مطابقت دارد (Daghigh Kia *et al.*, 2014).

اثرات مثبت عصاره نه‌تنها در خصوصیات تحرک اسپرم بلکه در زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء نیز قابل مشاهده است که می‌توان دلیل آن را داشتن ترکیبات فنولیک متعدد در گیاه دانست، که اسپرم‌ها را از آسیب-های ناشی از تنش اکسیداتیو محفوظ می‌دارند. در این مطالعه افزودن ٦٦/٦٦ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره گیاه بابونه موجب بهبود یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم-ها شده و غشای پلاسمایی آن‌ها را از آسیب‌های ناشی از فرآیند انجماد حفظ کردند. در حضور ٦٦/٦٦ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر از عصاره بابونه ٤٩/٦٠ درصد غشای پلاسمایی سالم و یکپارچه‌ای داشتند که این در گروه شاهد که ٤١/١٩ درصد بود به‌طور معنی‌داری بهبود یافت. در گیاه بابونه غلظت ٦٦/٦٦ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر بهترین عملکرد را در بین سایر سطوح داشته و با افزایش غلظت تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده نشده و اثر منفی در پارامترهای مورد ارزیابی نیز مشاهده شد. افزودن عصاره بابونه به رقیق‌کننده، توانسته است با محافظت ساختمان غشاء اسپرم‌ها زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی آن‌ها را نسبت به گروه شاهد بهبود بخشد. مطالعات پیشین حاکی از آن است که ترکیبات فنولیک (به‌خصوص فلاونوئیدها) قادرند با پوشش دادن لیپیدها روند پراکسیداسیون لیپیدی را تغییر داده و متوقف کرده و با کاهش سیالیت غشاهای سلولی، جلوگیری از تولید بیش‌از حد گونه‌های اکسیژن فعال و محدود کردن پراکسیداسیون فسفولیپیدها و اسیدهای چرب غیراشباع، از غشاهای

سلولی محافظت کنند (Arora *et al*., 2000; Blokhina *et al*., 2003).

ساپانیدو و همکاران در سال ۲۰۱٤ نشان دادند استفاده از مواد طبیعی غنی از پلی‌فنول‌ها (دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی) مانند عصاره انگور موجب مهار پراکسیداسیون لیپیدی، حفظ درصد تحرک و یکپارچگی آکروزوم (که با باروری آزمایشگاهی همبستگی بالایی دارد) می‌شود (Sapanidou *et al*., 2014).

گیاه بابونه در سطح ٦٦/٦٦ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر بهترین عملکرد را در میانه سطوح کلی در پارامترهای مورد ارزیابی داشت. افزودن سطوح بالا، اثرات منفی روی پارامترها نسبت به گروه شاهد داشت که می‌تواند به علت تغییرات اسمزی، pH و به‌هم خوردن تعادل ترکیب‌های رقیق‌کننده باشد. افزودن سطوح بالای عصاره، با مهار بیش‌ازحد فعالیت آنزیم‌های دخیل در اکسیداسیون و احیاء و به هم زدن تعادل بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تولید رادیکال‌های آزاد در محیط اسپرم‌ها را به‌هم زده و موجب کاهش عملکردهای اسپرم می‌شوند (Roca *et al*., 2004).

مطالعات محدودی در رابطه با اثر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی روی فرآوری اسپرم انجام شده است، ولی اخیراً با شناخت ترکیب‌های مؤثر گیاهان، صرفه اقتصادی استفاده از گیاهان و نداشتن سمیت در مقابل آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، این مطالعات در حال گسترش است. افزودن عصاره آبی گیاه رزماری به رقیق‌کننده منی بز، موجب بهبود پارامترهای تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و کاهش مقدار ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم‌ها شده و می‌تواند اسپرم‌های بز را در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد حفظ کند (Zanganeh *et al*., 2013). در مطالعه دقیق‌کیا و همکاران در سال ۲۰۱٦ با افزودن عصاره اتانولی مرزنجوش و مریم‌گلی سهندی به اسپرم گاو هلشتاین، بعد از ذوب تفاوت معنی‌داری در تحرک کلی، سرعت حرکت اسپرم، قابلیت زیست، یکپارچگی غشا پلاسمایی و پراکسیداسیون لیپیدی با گروه شاهد ایجاد شده است (Daghigh Kia *et al*., 2016)، که این یافته با نتایج مطالعه حاضر در مورد پراکسیداسیون لیپیدی مطابقت ندارد.

نتایج این تحقیق نشان‌دهنده آن است که افزودن عصاره بابونه تأثیر معنی‌داری روی کاهش میزان MDA نمی‌گذارد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه افرادی که در انجام این مطالعه همکاری داشته‌اند، قدردانی می‌شود. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Aggag, M. and Yousef, R. (1972). Study of antimicrobial activity of chamomile oil. Planta Medica, 22(06): 140-144.
- Arora, A., Byrem, T.M., Nair, M.G. and Strasburg, G.M. (2000). Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. Archives of Biochemistry and Biophysics, 373(1): 102-109.
- Bailey, J.L., Bilodeau, J.F. and Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. Journal of Andrology, 21: 1-7.
- Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S. (2010). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Veterinary Medicine International, 686137: 1-7.
- Baumber, J. and Ball, B.A. (2005). Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. American Journal of Veterinary Research, 66(8): 1415-1419.
- Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Cormier, N. and Sirard, M.A. (2002). Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. Theriogenology, 57(3): 1105-1122.
- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany, 91(2): 179-194.
- Daghigh Kia, H., Olfati Karaji, R., Ashrafi, I. and Hosseinkhani, A. (2014). Effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) extracts and glutathione antioxidants on bull semen quality after cryopreservation. Spanish Journal of Agricultural Research, 12(1): 98-105.
- Daghigh Kia, H., Farhadi, R., Ashrafi, I. and Mehdipour, M. (2016). Anti-oxidative effects of ethanol extract of Origanum vulgare on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved Holstein bull spermatozoa. Iranian Journal of Applied Animal Science, 6(4): 901-907.
- Gardiner, P. (2007). Complementary, holistic, and integrative medicine: chamomile. Pediatrics in Review, 28(4): e16-18.
- Hatami, L. and Estakhr, J. (2013). The Effects of Hydroalcoholic Extract of Matricaria Recutita on the Hormonal Pituitary-Testis Axis and Testis Tissue Changes of Mature Male Rats. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 3(1): 56-62. [In Persian]
- Malo, C., Gil, L., Cano, R., Martinez, F. and Gale, I. (2011). Antioxidant effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology, 75(9): 1735-1741.
- Masoumi Ardakani, Y., Abbasnejad, M., Derakhshanfar, A., Esmaeilpour Bezenjani, Kh. and Mostafavi A. (2010). Effect of Matricaria Recutita L. aqueous extract on acetic acid-induced ulcerative colitis in adult male rats. Physiology and Pharmacology, 14(3): 269-280. [In Persian]
- Mehdipour, M., Daghigh Kia, H., Najafi, A., Dodaran, H.V. 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.
- Najafi, A., Daghigh Kia, H., Mohammadi, H., Najafi, M.H., Zanganeh, Z. and Sharafi, M., *et al.* (2014). Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic

and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. Cryobiology, 69(1): 68-73.

- Najafi, A., Zhandi, M., Towhidi, A., Sharafi, M., Akbari Sharif, A. and Khodaei Motlagh, *et al.* (2013). Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. Cryobiology, 66(3): 275-282.
- Revell, S. and Mrode, R. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science, 36(1-2): 77-86.
- Roca, J., Gil, M.A., Hernandez, M., Parrilla, I., Vazquez, J.M. and Martinez, E.A. (2004). Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. Journal of Andrology, 25(3): 397-405.
- Sadighara, P., Barin, A., Jahed, Gh. and Farjadmand, F. (2013). Assessment of Antioxidant Capacity and Anti-Inflammatory of Alcoholic Extraction of Chamomile, Morus, Marshmallow, Borage and Rosemary. Knowledge and Health, 8(1): 31-34. [In Persian]
- Sapanidou, V.G., Margaritis, I., Siahos, N., Arsenopoulos, K., Dragatidou, E. Taitzoglou, I.A., *et al*. (2014). Antioxidant effect of a polyphenol-rich grape pomace extract on motility, viability and lipid peroxidation of thawed bovine spermatozoa. Journal of Biological Research-Thessaloniki, 21:19.
- Tasdemir, U., Buyukleblebici, S., Tuncer, P.B., Coskun, E., Ozgurtas, T. Aydin, A., *et al.* (2013). Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. Cryobiology, 66(1): 38-42.
- Tubaro, A., Zilli, C., Redaelli, C. and Della Loggia, R. (1984). Evaluation of anti-inflammatory activity of a chamomile extract after topical application. Planta Medica, 50(04): 359-359.
- Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneh, A., Najafi, A., Nabi, M.M. and Mohammadi-Sangcheshmeh, A. (2013). Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Ruminant Research, 114(1): 120-125.

Comparative effect of different concentrations of hydro-ethanolic extract of chamomile on freeze-thawn semen quality of rams

Daghigh Kia, H.[1]*, Sadeghi Sadegh Abad, F.[2], Ebrahimi, M.[3], Samadian, F.[4]

1- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2- MSc Graduate, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Yasouj, Iran.
*Corresponding author's email: daghighkia@tabrizu.ac.ir
(Received: 2016/8/28 Accepted: 2017/5/10)

Abstract
Oxidative stress during freeze-thawing process causes reduction in motility, viability, membrane functions and finally sperm fertility. The aim of this study was to determine the effect of Chamomile extract as natural antioxidant on quality of cryopreserved ram sperm. In this study semen was collected from five mature rams twice a week using an artificial vagina and the ejaculates were pooled equally in order to eliminate the individual effects. Different levels of extract of Chamomile (0, 50, 66.66, 100 and 200 ml/dl of diluent solution) were added to diluent based tris-egg yolk. After cooling, filling and sealing of the samples, they were frozen with nitrogen vapor and immersed in liquid nitrogen and were stored until evaluation time. After thawing, results showed that addition of 66.66 ml/dl of extract increased total motility, progressive motility, curvilinear velocity, straight–line velocity, linearity, viability and plasma membrane integrity of sperm compared to the control and other treatment groups ($p<0.05$). Also addition of 200 ml/dl extract had significant negative effects on motility parameters, viability and plasma membrane integrity of sperm ($p<0.05$). Inclusion of different doses of Chamomile extract caused no significant reduction on malondialdehyde concentration in comparison to control but this reduction was significant at 66.66 ml/dl in comparison to 100 and 200 ml/dl of extract.
Conflict of interest: None declared.

Keywords: Oxidative stress, Sperm, Chamomile, Natural antioxidant, Freeze-thawing.