

تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی گیاه هفت بند (پلی‌گونوم‌آویکولار) بر پارامترهای بیولوژیک اسپرم در خروس

سهیل همتی^۱، مجید غلامی‌آهنگران^{۲*} و بنفشه حیدری^۳

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱

چکیده

آنتی‌اکسیدان‌ها با ایجاد اختلال در روند تولید رادیکال‌های آزاد و با خنثی‌سازی استرس اکسیداتیو می‌توانند باعث افزایش تکثیر سلول‌های زایای بیضه و بهبود کمی و کیفی شاخص‌های تخصصی باروری اسپرم در مرغ‌های مادر شوند. عصاره‌ی گیاه هفت بند (پلی‌گونوم‌آویکولار) دارای مقادیر زیادی ترکیبات فنولیک و فلاونوئید بوده و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر عصاره‌ی هفت بند بر پارامترهای بیولوژیک اسپرم در خروس می‌باشد. در این بررسی، عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه هفت بند در چهار غلظت صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه و به مدت یک هفته به آب آشامیدنی خروس‌های بالغ نژاد رسمی گلپایگان اضافه شد. پس از یک هفته تأثیر دوزهای مختلف عصاره بر پارامترهای بیولوژیک اسپرم (تعداد، تحرک، زنده مانی و مورفولوژی نرمال اسپرم) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. به منظور ارزیابی ناهنجاری‌های اسپرم از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا استفاده شد. بیش‌ترین تعداد اسپرم زنده با بالاترین تحرک و مورفولوژی نرمال در گروه دریافت‌کننده‌ی ۲۰۰۰ میلی‌گرم عصاره‌ی هفت بند مشاهده گردید. همچنین، استفاده از دوز بالای عصاره موجب کاهش معنی‌دار ناهنجاری‌های سر، قطعه‌ی میانی و دم اسپرم گردید. به طور کلی، استفاده از عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه هفت بند موجب بهبود برخی از پارامترهای بیولوژیک اسپرم شد. به نظر می‌رسد هفت بند به دلیل دارا بودن مقادیر بالای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی فنولیک و فلاونوئید موجب بهبود کیفیت اسپرم در ماکیان می‌گردد.

کلمات کلیدی: اسپرم، باروری، گیاه هفت بند، پلی‌گونوم‌آویکولار، ماکیان

مقدمه

آزاد اختلال ایجاد نموده و نتایج امیدبخشی را در درمان این بیماری‌ها داشته باشند (Hsu 2006, Rathore et al. 2015). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ترکیبات پلی‌فنلی (فلاونوئید، تانن و آنتوسیانین) هستند که در قسمت‌های مختلف نظیر برگ، ساقه، میوه، ریشه و حتی بذر گیاهان دارویی یافت می‌شوند (Ahmadvand et al. 2013). از این رو، با استخراج متابولیت‌های ثانویه گیاهی (مانند اسانس‌ها و عصاره‌ها) از قسمت‌های مختلف گیاهان دارویی می‌توان به خواص

بر اساس توصیه‌ی سازمان بهداشت جهانی و نیز عدم تمایل مصرف‌کنندگان در استفاده از داروهای شیمیایی، امروزه استفاده از گیاهان دارویی به ویژه در کشورهای در حال توسعه کاربرد فراوانی یافته است. از بین داروهای گیاهی، استفاده از گیاهانی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند در درمان بیماری‌هایی نظیر پارکینسون، آلزایمر، انواع سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی - عروقی و غیره افزایش یافته است. این گیاهان با دارا بودن مقادیر بالای آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌توانند در روند تولید و عملکرد رادیکال‌های

^۱ دانش‌آموخته دکتری عمومی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

^{۲*} دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران mgolamia1388@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

^۳ استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین جهاد دانشگاهی - ابن سینا، تهران، ایران

استفاده از این گیاه دارویی نیز اثرات مشابهی بر روند اسپرماتوزن و باروری داشته باشد.

گیاه هفت بند با نام علمی پلی‌گونوم‌آویکولار از خانواده‌ی Polygonaceae بوده که دارای ساقه‌ی ایستاده به طول ۵۰ سانتی‌متر می‌باشد. برگ‌های آن باریک، یک در میان و نوک تیز و گل‌های آن نیز منفرد، کوچک، بدون بو و صورتی مایل به سبز می‌باشد. گیاه هفت بند در مقابل عوامل خارجی (سرما، گرما و لگد شدن) بسیار مقاوم بوده و در چمنزارها، کنار جاده‌ها، اراضی متروک و بین تخته سنگ‌ها می‌روید. این گیاه یک ساله در استرالیا، اروپا، شمال و جنوب آفریقا، مدیترانه، خاورمیانه و هند گسترش یافته است (Rathore et al. 2015). در ایران نیز در نواحی جنگلی و مرطوب به ویژه در استان‌های گرگان، مازندران، گیلان، آذربایجان و چهارمحال و بختیاری می‌روید (Ansari et al. 2014).

ترکیب شیمیایی گیاه هفت بند شامل اسید پوگلیونیک، اسید اگزالیک، اسید استیک، فرمیک، تانن، نیترات، پتاسیم، گلوکز، اسانس، سیلیس، اکسی متیل آنتراکینون، مواد رزینی، مواد قندی و موسیلاژ می‌باشد (Asgari-Jahromi et al. 2013, Rathore et al., 2015). میوه‌های این گیاه حاوی ۱۸ درصد پروتئین، ۷۱/۱ درصد کربوهیدرات، ۶۴ درصد چربی، ۹/۱ درصد فیبر، ۰/۷ میلی‌گرم ویتامین B2، ۶۷۰ میلی‌گرم کلسیم، ۴۲۰ میلی‌گرم فسفر و ۱۲/۷ میلی‌گرم آهن به ازای ۱۰۰ گرم می‌باشد (Rathore et al. 2015). این گیاه دارویی قابض بوده و برای رفع اسهال به ویژه اسهال خونی و نیز قطع خون‌ریزی به کار می‌رود. همچنین برای درمان آسم، برونشیت، سل ریوی، آگزما، تورم روده، استسقاء، دردهای معده، میگرن، زخم‌های چرکی و نیز تسکین درد سیاتیک و درد کمر، دردهای نقرس، رماتیسم، تاول و سوختگی از گیاه هفت بند استفاده می‌شود. این داروی گیاهی کاهش دهنده‌ی تب، ترشحات روده‌ای، ترشحات زنانه، قند خون و نفخ بوده و به عنوان مدر و مسکن در دفع سنگ‌های صفراوی و ادراری نیز کاربرد فراوانی یافته است. شایان ذکر است مصرف زیاد این گیاه موجب بروز آگزما،

ضدباکتری، ضدقارچ، ضدانگل، ضدویروس و آنتی-اکسیدانی آن‌ها دست یافت. خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی به میزان ترکیبات پلی‌فنولی موجود در آن‌ها بستگی دارد (Asgari-Jahromi et al. 2013).

بررسی‌ها نشان داده است که گیاه پلی‌گونوم‌آویکولار (هفت بند) دارای مقادیر زیادی ترکیبات فنولیک و فلاونوئید (کاتچین، اپی‌کاتچین، ایزوپرونتین، جنیستین، کامپفرول و کوئرستین) در ساقه، بذر، جوانه و گل‌های خود می‌باشد (Hsu 2006, Rathore et al. 2015). کوئرستین از مهم‌ترین ترکیبات خانواده‌ی فلاونوئیدها بوده که دارای بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. این ترکیب، که به فراوانی در عصاره‌ی گیاه پلی‌گونوم یافت می‌شود، یک آنتی‌اکسیدان فاقد هیدرات کربن بوده و به همین دلیل اثرات قوی‌تری نسبت به انواع گلیکوزیدها دارد (Justesen and Knuthsen 2001). بررسی‌ها نشان داده است که ویژگی آنتی‌اکسیدانی کوئرستین تقریباً شش برابر قوی‌تر از ویتامین ث می‌باشد. این آنتی‌اکسیدان در خوراکی‌های طبیعی مانند پیاز، انگور قرمز، مرکبات، سیب، چای و برخی گیاهان دارویی نظیر هفت بند یافت می‌شود و اثرات ضدویروسی، ضدباکتری و ضدالتهاپی آن به اثبات رسیده است. اثرات درمانی کوئرستین در بیماری‌های قلبی - عروقی، سرطان، آسم، آگزما و ناباروری مشاهده شده است. مطالعات پراکنده‌ای نیز در خصوص تأثیر کوئرستین بر فرآیند اسپرماتوزن انجام شده و اثرات مثبت آن در سلول‌های زایای بیضه‌ی رت‌های دیابتی به اثبات رسیده است (Asgari-Jahromi et al. 2013, Khaki et al. 2010, Hafez et al. 2010). این ترکیب با افزایش ترشح تستوسترون و تأثیر بر گیرنده‌های آن موجب تکثیر بیش‌تر سلول‌های زایای بیضه و نیز بهبود کمی و کیفی عملکرد اپیدیدیم می‌گردد. از طرف دیگر، کوئرستین با خشتی‌سازی استرس اکسیداتیو و بی‌اثر نمودن رادیکال‌های آزاد نیز موجب بهبود پارامترهای بیولوژیک اسپرم و افزایش تعداد و تحرک اسپرم‌ها می‌شود (Zohreh et al. 2015). با توجه به غلظت بالای کوئرستین در گیاه هفت بند، به نظر می‌رسد

کهپر، حساسیت‌های پوستی و تشنج می‌شود (Ahmadvand et al. 2013, Hsu 2006).

تا کنون تأثیر این گیاه دارویی بر روند اسپرماتوزن، شاخص‌های بیولوژیک اسپرم و نیز پارامترهای تخصصی باروری اسپرم مورد بررسی قرار نگرفته است. ولیکن به نظر می‌رسد استفاده از این گیاه دارویی بتواند موجب بهبود روند اسپرماتوزن، افزایش کیفیت اسپرم و نطفه درآوری در ماکیان گردد که در مطالعه‌ی اخیر مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

مواد و روش کار

تعداد ۳۶ خروس بالغ نژاد بومی گلپایگانی در سن ۳۲ هفتگی وارد مطالعه شده و پس از ارزیابی اولیه و در غالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ گروه با ۳ تکرار ۳ قطعه‌ای توزیع شدند. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی و با شرایط محیطی استاندارد و یکسان نگهداری شدند. گروه اول به عنوان گروه کنترل و سه گروه دیگر به عنوان گروه‌های درمان در نظر گرفته شدند. در سه گروه درمان، عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه هفت بند به ترتیب به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر (دوز پایین)، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر (دوز متوسط) و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر (دوز بالا) به مدت یک هفته به آب آشامیدنی خروس‌ها اضافه شد. آب آشامیدنی گروه کنترل فاقد عصاره‌ی هیدروالکلی هفت بند بود.

پس از جمع‌آوری گیاه هفت بند از مراتع شهر کیان در توابع استان چهارمحال و بختیاری و تأیید توسط کارشناس، این گیاه دور از نور خورشید و در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک و سپس با آسیاب آزمایشگاهی (مدل مولینکس، ساخت کشور ایتالیا) خرد گردید. به منظور عصاره‌گیری از حلال اتانول استفاده شد (۴ لیتر اتانول برای ۵۰۰ گرم گیاه هفت بند) و نمونه به مدت ۷۲ ساعت در ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله‌ی بعد، دبریدها و اجزای حل نشده گیاه با استفاده از کاغذ صافی واتمن جدا شد و حلال نیز با استفاده از دستگاه روتاری

(استریک، ایتالیا) طی مدت ۳ ساعت از عصاره جدا گردید. عصاره‌گیری در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و تحت شرایط خلأ صورت گرفت. در نهایت، از عصاره‌ی جمع‌آوری شده در بالن اصلی رقت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شد. رقت‌های تهیه شده تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پس از کالبدگشایی تمامی خروس‌ها و باز کردن ناحیه‌ی کلوک، نمونه‌ی منی از مخازن جمع‌آوری اسپرم که در انتهای بدن و نزدیک کلوک قرار گرفته است (Dyce et al. 2010) اخذ گردید (Figure 1). نمونه‌ها از تمامی خروس‌ها گرفته شد و در میکروتیوپ‌های مجزا جمع‌آوری شد. مایع نمونه‌گیری شده ظرف مدت ۱۵ دقیقه دور از نور و در دمای ۲۴-۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به آزمایشگاه آندروالژی مرکز تشخیص ناباروری شهرکرد ارسال گردید. به منظور جلوگیری از هر گونه پیش‌داری و تبعیض بین گروه‌ها بلافاصله پس از اخذ نمونه، نام گروه تحت مطالعه از روی میکروتیوپ‌ها برداشته و یک کد اختصاصی به آنها تعلق گرفت. سپس میکروتیوپ‌ها به منظور همگن شدن به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از اتمام روند همگن شدن، تمامی نمونه‌های دریافت شده مورد ارزیابی میکروسکوپی و میکروسکوپی قرار گرفتند. در ارزیابی میکروسکوپی، ابتدا ظاهر نمونه بررسی شد سپس حجم کلی نمونه‌ی منی با استفاده از پیپت سروالژی با درجه‌بندی ۰/۱ ml و PH آن تعیین و ثبت گردید.

برای بررسی مورفولوژی اسپرم‌ها بعد از قرار دادن قطره‌ای از محیط کشت حاوی اسپرم بر روی لام، اسمیری از آن تهیه شد. سپس اسمیر در مخلوط اتر و الکل ۹۶ درصد (۱:۱) تثبیت شد. در مرحله‌ی بعد اسلایدها با رنگ‌آمیزی پاپانیکولا رنگ شدند. در این رنگ‌آمیزی هسته‌ی اسپرم به رنگ آبی، آکروزوم و دم اسپرم به رنگ صورتی و ناحیه‌ی پشتی اسپرم به رنگ آبی تیره درآمد. برای هر نمونه ۱۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

مقایسه شد. سطح اختلاف معنی‌دار کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

میانگین حجم منی جمع‌آوری شده از ۳۶ خروس تحت مطالعه 35.0 ± 0.14 میکرولیتر بود. رنگ منی در تمامی میکروتیوپ‌ها سفید شیری و PH آن‌ها 7.1 ± 0.3 مشاهده شد. نمونه‌های اسپرم در رنگ‌آمیزی پاپانیکولا و تولوئیدین به خوبی رنگ شدند (Figure 2 and 3) و تمامی نمونه‌های مورد بررسی فاقد خون، دبرید و آلاینده‌های دیگر بودند. حرکت دسته جمعی (ماکروسکوپی) اسپرم‌ها نیز بسیار خوب (+۴) مشاهده شد.

تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی گیاه هفت بند بر پارامترهای بیولوژیک اسپرم در جدول ۱ نشان داده شده است. تعداد کلی، تحرک و مورفولوژی نرمال اسپرم‌ها قبل از شروع درمان در تمامی گروه‌ها به ترتیب $37/524 \pm 3/35$ میلیون، $54/16 \pm 2/5$ درصد و $72/56 \pm 3/05$ درصد بود. به دنبال استفاده از عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه هفت بند افزایش معنی‌داری در میزان تحرک، قابلیت زنده‌مانی و نیز مورفولوژی نرمال اسپرم‌ها مشاهده شد (Table 1, $P \leq 0/05$). بیش‌ترین پتانسیل زنده‌مانی، بالاترین میزان تحرک و مورفولوژی نرمال مربوط به گروه دریافت‌کننده‌ی ۲۰۰۰ میلی‌گرم عصاره‌ی هفت بند بود (به ترتیب $95/46 \pm 3/5$ درصد، $93/3 \pm 2/4$ درصد و $90/76 \pm 4/25$ درصد). افزودن عصاره‌ی هفت بند به آب آشامیدنی خروس‌های گروه درمان موجب افزایش مختصر تعداد کلی اسپرم‌ها گردید. هر چند این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P > 0/05$). همچنین تفاوت معنی‌داری در تعداد کلی اسپرم، میزان تحرک، قابلیت زنده‌مانی و مورفولوژی نرمال بین گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده‌ی دوز پایین عصاره‌ی هفت بند (۵۰۰ میلی‌گرم) مشاهده نشد (Table 1, $P > 0/05$).

در ارزیابی میکروسکوپی، حرکت دسته جمعی (توده-ای) اسپرم‌ها با استفاده از روش قطره‌گذاری روی لام، حرکت انفرادی اسپرم‌ها با استفاده از مشاهده‌ی مستقیم اسپرم‌ها زیر میکروسکوپ فاز کنتراست، غلظت و تعداد کلی اسپرم‌ها در واحد حجم با استفاده از لام Makler و درصد اسپرم‌های زنده با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو تعیین و ثبت گردید. در نهایت، شاخص‌های بیولوژیک مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. شاخص‌های بیولوژیک اسپرم که در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفتند شامل تعداد اسپرم، تحرک کلی اسپرم، مورفولوژی نرمال اسپرم بودند. به منظور تشخیص دقیق ناهنجاری‌های سر، قطعه‌ی میانی و دم اسپرم از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا نیز استفاده شد. لازم به ذکر است در صورت آلوده بودن نمونه‌ی منی با خون و یا هرگونه مواد مداخله‌گر دیگر، نمونه ۲-۳ بار با محیط Sperm wash شستشو داده شد و با دستگاه اسپرم فیوژ سانترفیوژ گردید.



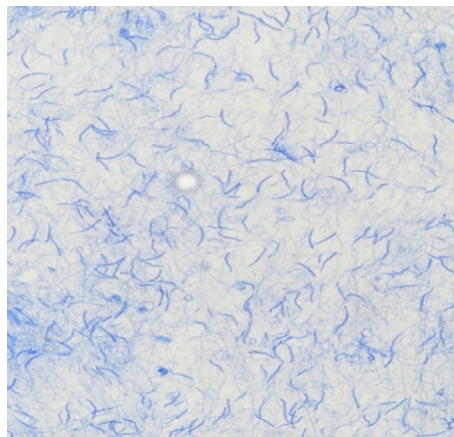
Figure 1: Sperm collection in examined poultry

داده‌ها با نرم‌افزار آماری Sigma Plote 2.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌های کمی با برنامه‌ی آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌ها (One away ANOVA) آنالیز شد و در صورت وجود اختلاف آماری بین میانگین داده‌ها در گروه‌های مختلف، میزان اختلاف با روش Tukey بیان شد. داده‌های کیفی با روش نیکویی برازش (K^2) پردازش و

Table 1: The effect of different concentrations of knotgrass extract on sperm biological parameters (Mean±SD)

Groups Receiving Knotgrass Extract (mg/lit)	Survival Rate (Percent)	Normal Sperm Morphology (Percent)	Total Sperm Motility (Percent)	Total Sperm Count
500	80.45±4.12 ^a	72.83±3.16 ^a	56.0±2.16 ^a	46.51±2.78 ^b
1000	90.72±3.33 ^b	89.73±2.32 ^b	83.1±1.28 ^b	43.6±5.19 ^{ab}
2000	95.46±3.54 ^c	90.76±4.25 ^b	93.3±2.34 ^c	46.56±7.97 ^b
Control (Zero)	72.03±3.96 ^a	72.56±3.50 ^a	54.16±2.55 ^a	37.52±3.35 ^a

Different superscripts in each column represent significant differences between groups ($P < 0.05$).

**Figure 2: Papanicolaou staining of sperms in poultry (200 X)****Figure 3: Toluidine staining of sperms in poultry (200 X)****بحث**

میکرولیتتر، PH آن را $6/95 \pm 0/32$ و حرکت ماکروسکوپی دسته جمعی اسپرم‌ها را خوب (۳+) یا بسیار خوب (۴+) گزارش نموده است (Iskandar et al. 2006). به طور کلی حجم منی در خروس، اردک و بلدرچین به ترتیب ۱۰۰۰-

در این مطالعه، میانگین حجم منی در گروه‌های مورد مطالعه $350 \pm 0/014$ میکرولیتر به رنگ سفید شیری و حرکات ماکروسکوپی بسیار خوب (۴+) بود. در تأیید نتایج حاضر، Iskandar و همکاران در سال ۲۰۰۶ حجم کلی منی را در خروس‌های نژاد عربی $300 \pm 0/072$

Edirisinghe و همکاران در سال ۱۹۹۷ میزان طبیعی وقوع ناهنجاری‌های اسپرم در هر انزال را ۳۰-۵ درصد عنوان نموده و ناهنجاری‌های اسپرم را به سه دسته ناهنجاری‌های اولیه، ثانویه و ثالثیه تقسیم کرده است (Edirisinghe et al. 1997). ناهنجاری‌های اولیه در روند اسپرماتوزن و در مجاری سمینی فروس رخ می‌دهند. در این نوع ناهنجاری، قسمت‌های اصلی اسپرم (سر، قطعه‌ی میانی و دم) تحت تأثیر قرار می‌گیرد و منجر به شکل‌گیری اسپرم‌های با سرهای کوچک، بزرگ و پهن و یا دم‌های دوتایی و غیرطبیعی می‌گردد. ناهنجاری‌های ثانویه در هنگام عبور اسپرم از اپیدیدیم و یا در زمان انزال رخ داده و منجر به شکل‌گیری اسپرم‌هایی با قطرات سیتوپلاسمی انتهایی می‌گردد. ناهنجاری‌های نوع سوم در زمان انزال و خروج منی از مجاری تناسلی رخ می‌دهند (Hafez 2010, Edirisinghe et al. 1997).

کیفیت منی و پارامترهای بیولوژیک اسپرم تحت تأثیر عوامل مداخله‌گری نظیر تولید رادیکال‌های آزاد به شدت کاهش می‌یابند. رادیکال‌های آزاد ملکول‌هایی هستند که به دلیل داشتن الکترون آزاد قابلیت واکنش‌پذیری بالایی در بدن دارند. این ملکول‌ها در حین واکنش‌های اکسیداتیو درون سلولی و به دلیل فقدان آنتی‌اکسیدان‌ها و یا رهاسازی الکترون آزاد توسط گلبول‌های سفید و یا اسپرم ایجاد می‌شوند (Zohreh et al. 2015). بررسی‌ها نشان داده است که رابطه‌ی معکوس و معنی‌داری بین مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد با کیفیت اسپرم و باروری وجود دارد. سلول اسپرم به دلیل مقادیر بالای اسید چرب غیراشباع در غشای سیتوپلاسمی و نیز غلظت کم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سیتوپلاسم خود حساسیت بسیار زیادی نسبت به رادیکال‌های آزاد دارد (Asgari-Jahromi et al. 2013, Ansari et al. 2014). به دنبال مواجه اسپرم با مقادیر بالای ملکول اکسیژن فعال، غشای پلاسمایی اسپرم آسیب دیده و تخریب شدید DNA هسته و ژنوم میتوکندری اتفاق می‌افتد (Hafez 2010). در حالت طبیعی، تولید مقادیر زیاد رادیکال‌های آزاد توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن

۳۰۰ میکرولیتر، ۱-۰/۱ میلی‌لیتر و ۱۵۰-۵۰ میکرولیتر می‌باشد. این میزان به عواملی نظیر سن، نژاد، اندازه‌ی بدن، تغذیه، درجه‌ی حرارت محیط نگهداری و غلظت ویتامین‌های A و E موجود در جیره بستگی دارد (Almahdi et al. 2014). یکی از علل پایین بودن حجم منی در ماکیان نسبت به پستانداران، عدم وجود غدد ضمیمه‌ی جنسی در آن‌ها می‌باشد. عدم وجود ترشحات غدد ضمیمه‌ی جنسی موجب کاهش حجم کلی پلاسمای منی و افزایش قابل توجه غلظت اسپرم در ماکیان گردیده است.

در پژوهش انجام شده PH منی 7.1 ± 0.3 ، تعداد اولیه‌ی اسپرم $37/52 \pm 3/35$ میلیون در هر میلی‌لیتر، تحرک کلی اسپرم‌ها $54/16 \pm 2/5$ درصد و مورفولوژی غیرطبیعی آن‌ها $27/44 \pm 1/15$ درصد مشاهده شد. در تأیید نتایج حاضر، PH منی در خروس‌های نژادهای Kedu و لینگن $6/92 \pm 0/21$ ، بانگوک $6/98 \pm 0/17$ و نژاد عربی $7/04 \pm 0/09$ نشان داده شده است. رنگ منی در تمامی نژادهای مذکور سفید شیری و حرکت دسته جمعی اسپرم‌ها +۴ گزارش شده است (Almahdi et al. 2014). بررسی‌ها نشان داده است که میزان تحرک کلی اسپرم در مایع منی خروس‌های نژاد عربی $80 \pm 7/07$ درصد و در نژادهای بانگوک، Kedu و لینگن $84 \pm 2/23$ می‌باشد. از طرف دیگر، میزان وقوع ناهنجاری‌های اسپرم در خروس‌های نژاد لینگن، بانگوک، Kedu و عربی نیز به ترتیب $10/40$ درصد، $13/78$ درصد، $17/03$ درصد و $9/07$ درصد گزارش شده است (Almahdi et al. 2014). همان‌طور که در مطالعه‌ی حاضر مشاهده می‌شود میزان تحرک کلی اسپرم در خروس‌های نژاد بومی گلپایگانی کم‌تر از نژادهای فوق بوده و میزان ناهنجاری‌های مورفولوژی نیز در آن‌ها بیش‌تر می‌باشد. علل این تفاوت در میزان تحرک اولیه و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم‌ها را می‌توان تفاوت‌های نژادی، تأثیر سن، عوامل محیطی (به ویژه درجه‌ی حرارت محیط)، فاکتورهای تغذیه‌ای (به ویژه میزان پروتئین جیره، ویتامین E و کلسیم)، وجود بیماری‌ها و یا سایر تفاوت‌های ساختاری در نژادهای مختلف دانست (Hafez 2010).

آنتی‌اکسیدان‌ها نظیر ویتامین C، ویتامین E، ویتامین A، سولفات روی و سلنیوم در درمان ناباروری با علل مردانه کاربرد فراوانی یافته است (Agarwal et al. 2006). به نظر می‌رسد که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها با منشاء گیاهی نیز موجب افزایش کیفیت اسپرم و بهبود پارامترهای تخصصی باروری اسپرم شوند. یکی از این گیاهان دارویی علف هفت بند بوده که با نام علمی پلی‌گونوم‌آویکولار شناخته می‌شود. در تحقیق حاضر، این گیاه دارویی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی و با هدف بهبود پارامترهای بیولوژیک اسپرم ماکیان مورد استفاده قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که عصاره‌ی هیدروالکلی این گیاه منجر به افزایش معنی‌دار میزان زنده‌مانی سلول‌ها، تحرک کلی اسپرم، حرکات پیش‌رونده‌ی سریع و مورفولوژی نرمال آن‌ها می‌گردد. بیش‌ترین میزان اسپرم زنده و نرمال در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی دوز بالای عصاره‌ی هفت بند مشاهده شد. در تأیید مطالعه‌ی حاضر، Asgari-Jahromi و همکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی تأثیر عصاره‌ی گیاه هفت بند بر پارامترهای اسپرم و میزان آپتوز سلولی در موش‌های مسن پرداخته و نشان دادند که استفاده از این عصاره موجب بهبود معنی‌دار تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم گردیده و میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها را افزایش می‌دهد. این محققین با مقایسه‌ی سه دوز مختلف (۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، حداقل میزان آپتوز سلولی و بالاترین شاخص‌های باروری اسپرم را در غلظت ۳۰ میلی‌گرم معرفی نمودند (Asgari-Jahromi et al. 2013). در همین راستا، Ekrami و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ به مطالعه تأثیر عصاره‌ی گیاه هفت بند بر پارامترهای بیولوژیک اسپرم منجمد شده انسان پرداختند. این محققین نمونه‌ی اسپرم را پس از ذوب به مدت ۱ ساعت در مجاورت با ۱۰ میکرومول عصاره‌ی گیاه هفت بند قرار داده و افزایش معنی‌دار تحرک کلی و حرکت رو به جلو را در اسپرم مشاهده نمودند. در این بررسی تفاوت معنی‌داری در تعداد و مورفولوژی نرمال اسپرم‌ها مشاهده نشده است (Ekrami et al. 2014). در مطالعه‌ی دیگر، Milan و همکاران در سال ۲۰۱۱ از عصاره‌ی گیاه

تعدیل می‌شود. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی با جلوگیری از تشکیل رادیکال آزاد موجب ترمیم بافت‌ها و سلول‌های آسیب دیده، افزایش دفاع مولکول‌های صدمه دیده و به حداقل رسانیدن جهش سلولی می‌گردد (Ansari et al. 2014). با این حال، در برخی مواقع مواجهه بدن با برخی عوامل نظیر داروها، سموم، آلاینده‌های محیطی، اختلالات تغذیه‌ای و غیره سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و عدم تعادل بین تولید رادیکال‌ها و دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن شده و در نهایت منجر به شکل‌گیری استرس اکسیداتیو و آسیب‌های بافتی می‌شود. استرس اکسیداتیو منجر به پروکسیداسیون لیپیدی در غشای اسپرم، غیرفعال‌سازی آنزیم‌های گلیکولیز، آسیب به غشای آکروزوم، اکسیداسیون DNA و در نهایت کاهش تمامی پارامترهای بیولوژیک اسپرم (تعداد، تحرک و مورفولوژی نرمال) می‌گردد (Sikka 1996). از طرف دیگر، بررسی‌ها نشان داده است که با افزایش میزان استرس اکسیداتیو در بدن میزان تولید آزادسازی تستوسترون توسط سلول‌های لیدیگ کاهش یافته و به دنبال آن اختلال در روند اسپرمیوزن و کاهش تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی رخ می‌دهد (Cao et al. 2004). در سلول‌های سرتولی بیضه نیز افزایش سطح رادیکال‌های آزاد موجب دژنره شدن سلول‌ها، متلاشی شدن پل‌های سیتوپلاسمی موجود بین سلول‌ها و در نتیجه کاهش تعداد اسپرم و افزایش وقوع ناهنجاری در آن‌ها می‌شود (Aziz et al. 2004). یکی از راه‌های دفاعی بدن در مقابل شکل‌گیری واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون و استرس اکسیداتیو استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده است که درمان با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی یا مصنوعی نه تنها باعث تثبیت سد خونی - بیضه‌ای می‌شود، بلکه موجب حفاظت DNA اسپرم و افزایش میزان باروری می‌گردد. این ترکیبات با برداشتن رادیکال‌های آزاد واسطه‌ای باعث پایان دادن به واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون شده و از سوی دیگر با اکسید کردن خودشان نیز سایر واکنش‌های اکسیداتیو را مهار می‌کنند (Lombardo et al. 2011). امروزه استفاده از

برای درمان ناتوانی‌های جنسی موجب شده که تلاش‌های زیادی در جهت استفاده از سایر گیاهان دارویی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی صورت بگیرد. با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر و نیز تحقیقات مشابه صورت گرفته در سایر گونه‌ها، به نظر می‌رسد که گیاه دارویی هفت بند به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی (به دلیل وجود ترکیبات فنولی فعال در ساختار شیمیایی خود) می‌تواند جایگزین مناسبی برای داروهای کمک باروری سنتتیک باشد. این داروی گیاهی با ایجاد اختلال در روند تولید رادیکال‌های آزاد، منحل نمودن واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون، کاهش استرس اکسیداتیو موجب بهبود کیفیت منی و افزایش پتانسیل باروری اسپرم می‌گردد. ویژگی آنتی‌اکسیدانی گیاه هفت بند موجب شکل‌گیری اسپرم‌هایی با ساختار مورفولوژی (سر، قطعه‌ی میانی و دم) سالم‌تر و کروماتین یکپارچه و منسجم‌تر می‌گردد. میزان شکست DNA و آسیب ژنوم میتوکندریایی در این سلول‌ها در حداقل میزان خود بوده و دارای بالاترین قابلیت زنده‌مانی و بهترین پتانسیل بارورسازی می‌باشند. بنابراین، استفاده از گونوم آویکولار در رژیم غذایی یا آب آشامیدنی افراد با قدرت باروری پایین توصیه می‌گردد.

به طور کلی، گیاه هفت بند به دلیل دارا بودن غلظت بالای کاتچین، اپی کاتچین، ایزوپرونتین، جنیستین، کامپفرول و کوئرستین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد. استفاده از عصاره‌ی این گیاه موجب افزایش معنی‌دار میزان تحرک، زنده‌مانی و مورفولوژی نرمال اسپرم ماکیان می‌گردد.

پلی‌گونوم با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در موش‌هایی که قبلاً تحت تأثیر میدان الکترومغناطیسی قرار داشتند استفاده نموده و تأثیر این گیاه دارویی را بر پارامترهای کیفی اسپرم-های جمع‌آوری شده از دم اپیدیدیم مورد بررسی قرار دادند. این محققین اثرات تخریبی میدان‌های الکترومغناطیسی بر پارامترهای بیولوژیک اسپرم (تحرک و مورفولوژی نرمال) را تأیید نموده و نشان دادند که درمان با استفاده از گیاه دارویی پلی‌گونوم می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار میزان تحرک و مورفولوژی نرمال اسپرم‌ها گردد (Milan et al. 2011). Ansari و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ یکی از روش‌های درمانی مؤثر برای مقابله با اثرات مضر میدان‌های الکترومغناطیسی بر بافت بیضه‌ی موش را استفاده از گیاهان دارویی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی معرفی نمودند. در این بررسی، موش‌های نژاد Balb/c به مدت ۸ هفته در معرض میدان الکترومغناطیسی با قدرت ۳mT قرار گرفتند و از غلظت ۵۰ میلی‌گرم عصاره‌ی گیاه پلی‌گونوم نیز به عنوان روش درمانی استفاده شد. نتایج آزمایشات بافت‌شناسی نشان داد که میدان‌های الکترومغناطیسی از طریق تولید رادیکال‌های آزاد موجب تخریب شدید اپی-تلیوم زایا در بافت بیضه و ناباروری گردیده و استفاده از عصاره‌ی گیاه پلی‌گونوم می‌تواند اثرات تخریبی آن‌ها را به طور معنی‌دار کاهش دهد (Ansari et al. 2014).

در دهه‌های اخیر، افزایش روزافزون ناباروری در تمامی موجودات (اعم از انسان، پستانداران و پرندگان)، عدم تمایل برای استفاده از داروهای سنتتیک و آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی و نیز تأکید طب سنتی بر استفاده از گیاهان دارویی

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آزمایشگاه آندروولوژی مرکز درمان ناباروری شهرکرد و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد قدردانی می‌گردد. این پروژه تحقیقاتی در قالب پایان‌نامه‌ی دکترای حرفه‌ای دامپزشکی به انجام رسیده است.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

منابع مالی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه‌ی دکترای حرفه‌ای دامپزشکی و با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به انجام رسیده است.

منابع

- Agarwal, A.; Gupta, S. and Sikka, S. (2006). The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion Obstetrics and Gynecology*, 18(3): 325-32.
- Ahmadvand, H.; Amiri, H.; Dalvand, H. and Bagheri, S.H. (2013). Various antioxidant properties of essential oil and hydroalcoholic extract of *Artemisa persica*. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 20(2): 68-78.
- Almahdi, A.B.; Ondho, Y.S. and Sutopo, A. (2014). Comparative studies of semen quality on different breed of chicken in poultry breeding center temanggung-central java. *International Refereed Journal of Engineering and Science*, 3(2): 94-103.
- Ansari, S.; Brouki Milan, P.; Mohammadnejad, D.; Delazar, A.; Mortazavi, M. and Mohammadi Roushandeh, A. (2014). Effects of *Polygonum avicular* extract on histological changes of mouse seminiferous tubules after electromagnetic field exposure. *Pharmaceutical Sciences*, 19(4), 139-144.
- Asgari Jahromi, M.; Movahedin, M.; Amanloo, M.; Mowla, G.; Mazaheri, Z. and Batouli, H. (2013). The effects of calligonum extract on sperm parameters and the rate of apoptosis in aged male mice testis tissue. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology*, 16(1): 25-38.
- Aziz, N.; Saleh, R.A.; Sharma, R.K.; Lewis-Jones, I.; Esfandiari, N.; Thomas, A.J. and Agarwal, A. (2004). Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertility and Sterility*, 81(2): 349-54.
- Cao, L.; Leers-Sucheta, S. and Azhar, S. (2004). Aging alters the functional expression of enzymatic and nonenzymatic anti-oxidant defense systems in testicular rat in Leydig cells. *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology*, 88(1): 61-7.
- Dyce, K.M.; Sack, W.O. and Wensing, C.J.G. (2010). *Textbook of Veterinary Anatomy*. St. Louis, Mo, Saunders/Elsevier. 4th ed., 705-709.
- Edirisinghe, W.R.; Murch, A.; Junk, S. and Yovich, J.L. (1997). Cytogenetic abnormalities of unfertilized oocytes generated from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a double-blind study. *Human Reproductive*, 12(12): 2784-91.
- Ekrami, H.; Movahedin, M.; Mazaheri, Z. and Mokhtari Dizaji, M. (2014). Evaluation of cryopreserved human spermatozoa parameters after incubating with Iranian traditional herb (*Calligonum*) extract. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 12(6): 89-91.
- Hafez, D.A. (2010). Effect of extracts of ginger goots and cinnamon bark on fertility of male diabetic rats. *Journal of American Sciences*, 6(10): 940-7.
- Hsu, C.Y. (2006). Antioxidant activity of extract from *Polygonum aviculare* L. *Biological Research*, 39: 281-288.
- Iskandar, S.; Mardalestari, R.; Hernawati, R.; Mardiah E. and Wahyu, E. (2006). *Pengaruh jenis konsentrasi krioprotektan dan metode thawing terhadap kualitas semen beku ayam Arab*. *Indonesian Journal of Animal and Veterinary Science*, 11(1): 34-38.
- Justesen, U. and Knuthsen, P. (2001). Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, 73(2): 245-50.
- Khaki, A.; Fathiazad, F.; Nour, i M.; Khaki, A.A.; Maleki, N. and Jabbari Khamnei, H. (2010). Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Phytotherapy Research*, 24(9): 1285-91.
- Lombardo, F.; Sansone, A.; Romanelli, F.; Paoli, D.; Gandini, L. and Lenzi, A. (2011). The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: An overview. *Asian Journal of Andrology*, 13 (5): 690-7.
- Milan, P.B.; Nejad, D.M.; Ghanbari, A.A.; Rad, J.S.; Nasrabadi, H.T.; Roudkenar, M.H. et al. (2011). Effects of *Polygonum aviculare* herbal extract on sperm parameters after EMF exposure in mouse. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14(13): 720-4.
- Rathore, V.S.; Singh, J.P.; Bhardwaj, S.; Nathawat, N.S.; Kumar, M. and Roy, M.M. (2015). Potential of native shrubs *Haloxylon salicornicum* and *Calligonum Polygonoides* for restoration of degraded lands in Arid Western Rajasthan, India. *Environmental Management*, 55(1): 205-16.

Sikka, S.C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, 1: 78-86.

Zohreh, F.; Nasri, S. and Kerishchi, P. (2015). The effect of quercetin on pituitary-gonadal axis, sperm parameters and testis tissue in male rats.

Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 22(3): 18-25.

Received: 22.10.2018

Accepted: 22.06.2019



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

The Effect of different concentrations of knotgrass (*Polygonum avicular*) extract on biological parameters of sperm fertility in rooster

Hemmati, S.¹; Gholami-Ahangaran, M.² and Heidari, B.³

Received: 22.10.2018

Accepted: 22.06.2019

Abstract

Antioxidants can disrupt the production of free radicals by neutralizing oxidative stress and increase the proliferation of testicular germ cells and then improve the quality and quantity of sperm fertility indices in breeder chickens. The knotgrass extract (*Polygonum avicular*) has high levels of phenolic and flavonoid compounds and has high antioxidant properties. This study aimed to investigate the effect of knotgrass extract on the biological parameters of sperm in rooster. In this study, hydroalcoholic extracts of knotgrass was prepared in four concentrations of zero, 500, 1000 and 2000 mg/L and added to drinking water for adult Golpayegan official breeders for one week. After one week, the effect of different doses of the extract on the biological parameters of sperm (number, mobility, survival and normal sperm morphology) was evaluated and compared. The Papanicolaou staining was also used to evaluate the sperm abnormalities. The most number of live sperm with the highest motility and normal morphology was observed in group receiving 2000 mg/L of knotgrass extract. Also, application of high dosage of extract significantly reduced the head, middle piece and tail abnormalities of sperm ($P \leq 0.05$). The highest number of live sperm with the highest motility and normal morphology was observed in the group receiving 2000 mg/L of knotgrass extract. Also, using high dose of extract significantly reduced head, medulla, and sperm motility abnormalities ($P \leq 0.05$). In overall, the use of hydroalcoholic extracts of knotgrass improved some of the biological parameters of sperm. It can be concluded that knotgrass (*Polygonum avicular*), due to high amount of phenolic and flavonoid antioxidant compounds, improves the sperm quality in fowls.

Key words: Sperm, Fertility, Fowl, Knotgrass, *Polygonum avicular*, Rooster

1- DVM Graduated Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

3- Assistance Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran and Reproductive Biotechnology Research Center, ACECR, Tehran, Iran

Corresponding Author: Gholami-Ahangaran, M., E-mail: mgholamia1388@yahoo.com