**اثر افزودن عصاره­ی هیدروالکلی کبابه چینی در غلظت­های مختلف بر زنده­مانی اسپرم تازه گوسفند تحت شرایط نرمال و تنش اکسیداتیو**

**لیلا سلطانی1، طیبه محمدی 2**

1. استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
2. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

نویسنده مسئول: Leilasoltani7@yahoo.com

**چکیده**

اثرات تنش اکسیداتیو بر جنبایی و زنده­مانی منجر به کاهش کیفیت اسپرم و باروری آن می­شود. هدف از این مطالعه بررسی افزودن کبابه چینی به رقیق­کننده­ی اسپرم گوسفند به منظور کاهش تنش اکسیداتیو القایی توسط پرکسیدهیدروژن H2O2 بود. نمونه­های اسپرم از سه گوسفند بالغ و بارور نژاد سنجابی با سن 3-4 سال تهیه شده و با هم مخلوط شدند. بعد از رقیق­سازی اسپرم با اکستندر تریس-بازی، غلظت­های متفاوت کبابه چینی (30، 300 و 3000 میکروگرم در میلی­لیتر) به آن اضافه شد. جهت القای استرس اکسیداتیو پراکسیدهیدروژن (50 میکرومولار) به نمونه منی اضافه شد. گروهی که هیچ گونه مکملی دریافت نکرده بود بعنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. محلول MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) به هر گروه اضافه شد و در انکوباتور برای مدت 2 ساعت در 37 سانتی­گراد انکوبه شد. بعد از طی زمان انکوباسیون، خوانش با دستگاه الایزا انجام گرفت. درصد آپاپتوز با استفاده از رنگ­آمیزی آکریدین نارنجی بررسی شد. افزودن کبابه چینی در غلظت 300 و 3000 میکروگرم سبب بهبود زنده­مانی و کاهش مالون دی­آلدهید اسپرم­های گوسفند در شرایط طبیعی در مقایسه با سایر گروههای تیماری و گروه شاهد شده بود (P<0.05). علاوه­براین، افزودن آن در شرایط استرس اکسیداتیو سبب کاهش نرخ مرگ و میر و مالون دی­آلدهید سلولهای تیمار شده در مقایسه با گروه استرس اکسیداتیو، شده بود. به نظر می­رسد کبابه چینی در شرایط نرمال سبب کاهش میزان آپاپتوز شد (p<0.05). عصاره کبابه چینی سبب کاهش میزان مالون دی­آلدهید، آپاپتوز و افزایش زنده مانی در هر دو شرایط شد.

**کلمات کلیدی:** کبابه چینی، استرس اکسیداتیو، گوسفند، اسپرم.

**مقدمه**

تحت شرایط فیزیولوژیک، اسپرم در بدن موجود زنده، مقدار کمی گونه­های فعال اکسیژن Reactive Oxygen Spices (ROS) را تولید می­کند [1]. گونه­های فعال اکسیژن در مقدار کم، برای تنظیم عملکرد اسپرم ضروری هستند. با این­حال، آنها در غلظت­های بالا در سلولهای سالم، سمی هستند [2]. استرس اکسیداتیو حالتی است که سلول تعادل نامساوی تولید گونه­های فعال اکسیژن و ظرفیت آنتی­اکسیدانتی مواجه است [3]. زمانیکه تولید گونه­های فعال اکسیژن افزایش پیدا می­کند، منجر به آسیب اکسیداتیو پروتئین­ها، لیپیدها، و DNA در سلول اسپرم می­شود که در ادامه آسیب یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول، کاهش زنده­مانی و تحرک را به همراه دارد [4]. ظرفیت آنتی اکسیدانتی اسپرم بخاطر حجم کم سیتوپلاسم اندک است با این حال سیستم آنتی­اکسیدانتی داخل سلول شامل مجموعه آنتی­اکسیدانت­های آنزیمی (سوپراکسیدازدیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز) و غیرآنزیمی (آلفا-توکوفرول، بتا-کاروتن، آسکوربات، و گلوتاتیون) هستند [5]. ترکیبات فنلی گیاهی از جمله آنتی­اکسیدان­های طبیعی اولیه موجود در تمام قسمت­های گیاه از جمله سبزیجات، مغزها، برگ­ها، دانه­ها، ریشه­ها، میوه­ها و پوست هستند [6]. Piper cubeba (PC) یا کبابه چینی گیاهی از خانواده Piperaceae، تیره Piper است. از میوه آن برای درمان بیماری­های مختلف از جمله سیفلیس، اسهال، انتریت، سوزاک، اسهال خونی و آسم استفاده می­شود. علاوه­بر­این، برای محافظت از کلیه­ها در برابر اختلالات کلیوی مختلف استفاده شده است [7]. سیزده لیگنین در میوه­های خشک شناسایی شده است که برخی از آنها کوببین، یاتئین، ایزواتئین و هینوکینین هستند. بر اساس یک مطالعه، عصاره خام PC دارای فعالیت آنتی­اکسیدانی برای تسکین التهاب پوست ناشی از رادیکال­های آزاد مانند ROS و پراکسید هیدروژن است [8]. مطالعات اخیر خواص آنتی­اکسیدانی عصاره­های گیاهی را برای بهبود کیفیت منی منجمد شده مورد بررسی قرار داده است. تعدادی از فیتوکمیکال­های آنتی اکسیدانی در این عصاره ها، از جمله کاروتنوئیدها، پلی فنول ها و فلاونوئیدها وجود دارد [9].

در ارتباط با عصاره­ی کبابه چینی اضافه شده به رقیق­کننده­ی اسپرم گوسفند تحت شرایط طبیعی و استرس اکسیداتیو مطالعه ایی وجود ندارد. برای این منظور در این مطالعه به بررسی افزودن کبابه چینی در غلظت­های مختلف در شرایط طبیعی و استرس اکسیداتیو بر زنده­مانی اسپرم تازه رقیق­شده گوسفند پرداخته می­شود.

**مواد و روشها**

**مواد**

تمامی مواد مورد استفاده در این مطالعه از جمله بافرتریس، سیتریک اسید، فروکتوز، گلیسرول، بافر Phospate Buffer Saline (PBS) و محلول Dimethyl Sulfoxide (DMSO) از شرکت سیگما خریداری شده بود.

**حیوانات**

گوسفندان در فارم دانشگاه رازی تحت شرایط تغذیه­ایی یکسان نگهداری می­شدند. نمونه­های اسپرم از قوچ های نژاد سنجابی با سن 3-4 سال با کمک واژن مصنوعی در فصل تولیدمثلی جمع­آوری شد. بعد از جمع­آوری، نمونه­ها در فلاسک آب 37 درجه­ی سانتی گراد 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 مورد بررسی قرار گرفت. نمونه­های اسپرم به منظور حذف اثرات فردی با همدیگر مخلوط شدند.

**فرآوری اسپرم**

در این مطالعه، از رقیق­کننده­ی تریس استفاده شد [10]. نمونه اسپرم به 8 بخش تقسیم و با رقیق­کننده­ی تریس بازی با نسبت 9:1 رقیق شد. گروههای آزمایشی عبارت بودند از: 1- گروه شاهد (هیچ گونه مکملی را دریافت نکرده بود)؛ 2- گروه شاهد + غلظت 30 میکروگرم در میلی­لیتر عصاره کبابه؛ 3- گروه شاهد + غلظت 300 میکروگرم در میلی­لیتر عصاره کبابه؛ 4- گروه شاهد + غلظت 3000 میکروگرم در میلی­لیتر عصاره کبابه؛ 5- گروه استرس اکسیداتیو (50 میکرو­مولار پراکسیدهیدروژن را دریافت کرده بود)؛ 6- گروه استرس اکسیداتیو+ غلظت 30 میکروگرم در میلی­لیتر عصاره کبابه؛ 7- گروه استرس اکسیداتیو+ غلظت 300 میکروگرم در میلی­لیتر عصاره کبابه؛ 8- گروه استرس اکسیداتیو + غلظت 30 میکروگرم در میلی­لیتر عصاره کبابه.

برای این منظور، محلول 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) در بافر (DPBS) Dulbecco's phosphate-buffered saline آماده شد. برای بررسی سمیت 50 میکرولیتر از استوک محلول به 500 میکرولیتر اسپرم رقیق شده اضافه شد و در شرایط 5 درصد دی­اکسیدکربن و هوای اتمسفری مرطوب برای مدت زمان 2 ساعت و درجه حرارت 37 درجه­ی سانتی­گراد نگهداری شد. بعد از طی مدت زمان انکوباسیون، 200 میکرولیتر محلول DMSO به هر تیوپ 2 میلی­لیتری اضافه شد و کاملاً مخلوط شد تا کریستالهای بنفش رنگ حل شوند. جذب مایع رویی در پلیت 96 خانه ایی در طول موج 570 نانومتر با کمک دستگاه الایزا ریدر بررسی شد.

برای بررسی میزان مالون دی­آلدهید از کیت شرکت پژوهان طب رازی استفاده شد. طبق دستورالعمل کیت، نمونه­ی آماده شده در دستگاه الایزا ریدر با طول موج 450 نانومتر مورد خوانش قرار گرفتند. نتایج بر اساس میکرومول در میلی­لیتر گزارش شدند.

برای بررسی میزان آپایتوز از رنگ آمیزی آکریدین نارنجی طبق مطالعه­ی سلطانی و همکاران [11] استفاده شد. لام­های رنگ آمیزی شده با کمک میکروسکوپ فلوروسنت، بررسی و تعداد سلولهای با رنگ سبز، زرد، نارنجی و قرمز مورد شمارش قرار گرفتند و درصد سلولهای غیر آپاپتوزی (سبز رنگ) گزار شد.

**آنالیز آماری**

آنالیز آماری در این مطالعه براساس طرح فاکتوریل کاملا تصادفی و بوسیله ی نرم افزار SPSS انجام گرفت، تعداد تکرارهای مورد بررسی 3 تکرار بود. نتایج بصورت میانگین SE$\pm $ (اشتباه استاندارد) بیان شده مقایسه میانگین با کمک آزمون دانکن انجام گرفت. سطح معنی داری 5 درصد بیان شد.

**نتایج**

در این مطالعه به بررسی اثر افزودن غلظت­های مختلف عصاره­ی کبابه­ی چینی در دو حالت نرمال و استرس اکسیداتیو القایی با کمک H2O2 بر زنده­ مانی و مالون دی­آلدهید اسپرم تازه قوچ نژاد سنجابی پرداخته شد. افزودن غلظت­های مختلف عصاره­ی کبابه­ی در شرایط طبیعی نشان داد که غلظت 300 و 3000 میکروگرم در میلی­لیتر سبب حفظ زنده مانی و کاهش مالون دی آلدهید اسپرم در مقایسه با گروه شاهد و سایر گروههای تیماری در دو حالت طبیعی و استرس اکسیداتیو شد که این اختلاف معنی­دار بود (p<0.05) (شکل 1، الف و ب). افزودن غلظت غلظت 3000 میکروگرم در میلی­لیتر عصاره­ی هیدروالکلی کبابه به­طور معنی­داری نسبت به گروههای مختلف استرس اکسیداتیو درصد آپاپتوز را کاهش داده بوده بود اما اختلاف معنی­داری با سایر گروهها در شرایط نرمال مشاهده نشد (p<0.05؛ شکل 1 ج).



**شکل 1: بررسی میزان تولید مالون دی­آلدهید (الف)، زنده­مانی (ب) و آپاپتوز (ج) منی تازه رقیق­شده گوسفند نژاد سنجابی در شرایط طبیعی و استرس اکسیداتیو پس از افزودن غلظت­های مختلف کبابه چینی. حروف متفاوت نشاندهنده­ی اختلاف معنی­دار بین گروههای تیماری است. داده­ها با سطح معنی­داری 5 درصد نشان داده شده­اند.**

**بحث**

در این مطالعه کبابه چینی در غلظت 300 و 3000 میکروگرم در میلی­لیتر در مقایسه با سایر غلظت­ها سبب حفظ زنده­مانی و کاهش میزان تولید مالون دی­آلدهید اسپرم تازه شده است. بهترین اثر در میزان کاهش آپاپتوز توسط غلظت 3000 میکروگرم بر جای ماند هرچند که با سایر غلظت­ها در شرایط نرمال اختلاف معنی­داری نشان نداد. در شرایط استرس اکسیداتیو غلظت 300 بر زنده­مانی، غلظت 30 و 300 بر تولید مالون دی­آلدهید و غلظت 3000 بر میزان آپاپتوز بهترین اثر را داشتند.

در پایان به نظر می­رسد که عصاره­ی کبابه­ی چینی سبب کاهش اثرات مضر استرس اکسیداتیو می­گردد و زنده­مانی اسپرماتوزوآهای گوسفندی را حفظ می­کند همچنین میزان تولید مالون دی­آلدهید و سلولهای آپاپتوزی را کاهش داد. مطالعات بیشتری لازم است که به بررسی­های دقیق­تر و مکانیسم­های مولکولی دخیل در حفظ بقای سلول بپردازد.

**منابع**

1. Gomes, E., Irvine, D., and Aitken, R., 1998. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relashionships with semen quality and sperm function. *International Journal of Andrology*, 21, 81-94.‏
2. Moein, M. R., Dehghani, V. O., Tabibnejad, N., and Vahidi, S., 2007. Reactive Oxygen Species (ROS) level in seminal plasma of infertile men and healthy donors. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 5(3), 51-0.‏
3. Bucak, M. N., Başpınar, N., Tuncer, P. B., Coyan, K., Sarıözkan, S., Akalın, P. P., ... and Küçükgünay, S. 2012. Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen‐thawed bovine semen. *Andrologia*, 44, 102-109.‏
4. Jang, H. Y., Kim, Y. H., Cheong, H. T., Kim, J. T., Park, I. C., Park, C. K., and 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.‏
5. Wai-Sum, O., Chen, H., and 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.‏
6. Pratt, D.E., and Hudson, B.J.F., 1990. Natural antioxidants not exploited commercially. In B. J. F. Hudson (Ed.). Food antioxidants, (171–192). Amsterdam: Elsevier.
7. Ahmad, Q.Z., Jahan, N., and Ahmad, G., 2012. Nephroprotective effect of Kabab chini (Piper cubeba) in gentamycin-induced nephrotoxicity. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*. 23, 773– 781.
8. Pathak, N., and Khandelwal, S., 2007. Cytoprotective and immunomodulating properties of piperine on murine splenocytes: an in vitro study. *European Journal of Pharmacology*. , 576,160-70.
9. Allai, L., Benmoula, A., da Silva, M., Nasser, B., and El Amiri, B., 2018. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. Animal Reproduction Science, 192, 6-17.
10. Salamon, S., and Maxwell, W. M. C., 2000. Storage of ram semen. Animal reproduction science, 62(1-3), 77-111.‏
11. Soltani, L., Samereh, S., and Mohammadi, T., 2022. Effects of different concentrations of zinc oxide nanoparticles on the quality of ram cauda epididymal spermatozoa during storage at 4°C. *Reproduction in Domestic Animals*. 57, 864-875.

**The effects of different concentrations of Piper cubeba (PC) on viability of ovine fresh sperm under normal and oxidative stress conditions**

Leila Soltani1\*, Tayebe Mohammadi2

1 Assistant Prof., Department of Animal Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran

2 Assistant Prof., Department of Basic and Pathobiological Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

\*Corresponding author E-mail: Leilasoltani7@yahoo.com

**Abstract**

The effects of oxidative stress on motility and viability lead to reduced sperm quality and fertility. The objective of this study was to evaluate the addition of Piper cubeba (PC) to diluent of ram fresh sperm to reduce oxidative stress induced by hydrogen peroxide. Three mature and fertile sanjabi ram (3 and 4 years old) were used to collect sperm samples. Three different concentrations of Piper cubeba (30, 300, and 3000 g) were added to the semen after it had been diluted with Tris-base extender. To cause oxidative stress, hydrogen peroxide (50 M) was introduced to the semen sample. The control group was the one that did not get any supplements. Each group received an addition of MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution, which was then incubated in the incubator for 2 hours at 37° C. The reading was carried out using an ELISA reader following the incubation time. Acridine orange staining was used to measure the rate of apoptosis. In comparison to other treatment groups and the control group, the addition of Piper cubeba at doses of 300 and 3000g increased the viability and reduced malondialdehyde level of ram sperm under normal conditions (P<0.05). In contrast to the oxidative stress group, Piper cubeba in oxidative stress condition also reduced the apoptotic rate and malondialdehyde level of the treated cells. In normal condition, Piper cubeba appears to have reduced the rate of apoptosis (p<0.05). Malondialdehyde levels, apoptosis, and viability were all reduced by piper cubeba extract in both conditions.

**Keywords:** Piper cubeba, Oxidative stress, ovine, sperm.