مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و ششم، شماره دهم، دی ۱۳۹۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۲۱

بررسی تاثیر غلظت های مختلف عصاره هیدروالکلی کلم بروکلی بر پارامترهای اسپرم و فاکتورهای استرس اکسیداتیو قبل و بعد از فریز شدن در موش سوری

نادیا خادمی[۱]، مهدیه رئیس زاده*[۲]، عذرا الله ویسی[۳]

مقاله پژوهشی

مقدمه: با توجه به اهمیت پارامترهای مربوط به اسپرم در میزان باروری، هدف از این مطالعه بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی کلم بروکلی بر پارامترهای اسپرم قبل و بعد از فریز در موش سوری نر بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی مداخله‌ای ۲۸ سر موش سوری نر نژاد NMRI به چهار گروه هفت تایی تقسیم شد. گروه کنترل بدون هیچ گونه تیمار، آزمایش اول، دوم و سوم به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی بروکلی (تهیه شده با روش ماسراسیون) داخل صفاقی به مدت ۴۲ روز دریافت کردند. در پایان آزمایش، اندازه‌گیری آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسیدیسموتاز و مالون‌دی‌آلدئید در سرم اندازه گیری شد. غلظت اسپرم، تعداد، درصد زنده‌مانی، تحرک و درصد شکنندگی DNA قبل و بعد از فریز شدن مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: کمترین غلظت اسپرم در گروه کنترل ۱۰^{۶}× ۲۴۹ و بیشترین در آزمایش سوم ۱۰^{۶}×۷۱۴ میلیون بر میلی‌متر مکعب دیده شد. بیشترین درصد زنده‌مانی اسپرم و درصد تحرک در آزمایش سوم به ترتیب حدود ۹۶ و ۹۸ درصد شد. کاهش درصد زنده‌مانی اسپرم بعد از فریز نمودن در گروه کنترل نسبت به گروه‌های آزمایش حدود سه تا چهار برابر بوده و این اختلافات معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۵). غلظت آنزیم کاتالاز و سوپراکسیدیسموتاز در آزمایش سوم به ترتیب ۲/۲۷۶±۱۸/۲۸و ۲/۴۲۵±۵۶/۳۶ واحد بر میلی‌لیتر بوده و اختلاف در مورد آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با سایر گروه‌ها معنی‌دار بود. کمترین غلظت مالون‌دی‌آلدئید آزمایش سوم ۰/۱۴۰±۱/۹۶ نانومول بر میکرومول و با گروه کنترل معنی‌دار شد.

نتیجه‌گیری: دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره بروکلی بهترین تاثیر را بر روی پارامترهای اسپرم تازه و فریز شده داشته که می‌تواند به اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره مرتبط باشد.

واژه‌های کلیدی: عصاره کلم بروکلی، پارامترهای اسپرم، استرس اکسیداتیو

ارجاع: خادمی نادیا، رئیس زاده مهدیه، ویسی عذرا الله. **بررسی تاثیر غلظت های مختلف عصاره هیدروالکلی کلم بروکلی بر پارامترهای اسپرم و فاکتورهای استرس اکسیداتیو قبل و بعد از فریز شدن در موش سوری.** مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۹): ۳۳-۹۲۱

۱- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
۲- استادیار فارماکولوژی، گروه علوم پایه، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
۳- استادیار گروه علوم پایه، مرکز ناباروری بیمارستان بعثت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۳۴۷۴۴۵۷، پست الکترونیکی: vet_mr@yahoo.com، کد پستی: ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱

مقدمه

حدود 50-۳۰ درصد علل ناباروری مربوط به ناباروری مردانه است و هم چنین ۴۰-۳۰ درصد از علل ناباروری مردانه به اختلالات اسپرم مربوط می‌شود (۱). شایع ترین علت ناباروری در مردان، عدم توانایی آنان در تولید تعداد کافی اسپرمهای سالم، فعال و با قدرت تحرک کافی است .توانایی بارورسازی در مردان تا حدود زیادی به تعداد، کیفیت، تحرک و شکل اسپرم بستگی دارد و اختلال در هر کدام از این فاکتورها می تواند باعث ناباروری مردان شود (۱).

.عدم تکامل و رشد بیضه، بیماری های دستگاه تناسلی، افزایش دمای اسکروتوم، مشکلات ایمنی، اختلالات غدد درون ریز، شیوه زندگی، عوامل محیطی و تغذیه ای به عنوان عوامل اصلی ناباروری مردان در نظر گرفته شده است که بر روی پارامترهای اسپرم تأثیر منفی می گذارد (۴- ۲).

به‌طور کلی سه عامل عمده در ناباروری مردان مطرح می‌باشد: کاهش تعداد اسپرم، کاهش قدرت تحرک و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم‌ها. انتخاب اسپرم‌های طبیعی و بالغ در میزان موفقیت تکنیک‌های کمک باروری Assisted Reproductive Technology ضروری است (۷- ۵). بدیهی است که هر چه کیفیت حرکتی اسپرم‌ها بهبود یابد، نتیجه موفقیت یک سیکل درمانی افزایش خواهد یافت (۸،۹).یکی از مشکلات اساسی در بارورشدن تخمک، عدم تحرک و یا تحرک پیشرونده ضعیف اسپرم می‌باشد (۹). Palermo و همکاران گزارش نمودند که هیچ‌یک از پارامترهای اسپرمی تعداد، تحرک و مورفولوژی به تنهایی به عنوان عامل مخدوش‌کننده محسوب نمی‌شوند، بلکه هر سه فاکتور فوق با هم در نتایج باروری دخیل هستند (۱۰).

سالها انسان در فکر حفظ سلول‌های زنده به طریق انجماد بود تا این که Polge و همکارانش در سال ۱۹۴۹ برای اولین بار موفق به انجماد اسپرم با استفاده از ضدیخ گلیسرول شدند (۱۱). با انجماد اسپرم و ایجاد بانک آن، نگهداری انواع ژنوم در وضعیت هاپلوئید و اطلاعات ژنتیکی حیوانات در حال انقراض امکان‌پذیر است (۱۲). موش بهترین مدل حیوان آزمایشگاهی جهت مطالعه عملکرد ژن پستانداران است (۱۳). بنابراین انجماد جنین و اسپرم موش ضروری به نظر می رسد (۱۴). آسیب های ناشی از استرس سرمایی و فریز کردن اسپرم، با تولید بیش از حد رادیکال های آزاد بویژه گونه های واکنش پذیر اکسیژن فعال (ROS) و پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشاء سلول اسپرم، همراه است (۱۵). استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین تولید ROS و سیستم بیولوژیکی کنترل کننده رادیکال های آزاد است که در طی فرایند انجماد، موجب تخریب غشا و کل ترکیبات ساختمانی اسپرم می شود (۱۷، ۱۶). از طرف دیگر اسپرم پستانداران سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع، فسفولیپیدها و استرول هاست که بسیار مستعد اثر انواع اکسیژن های فعال بوده و این امر سبب کاهش تحرک اسپرم، کاهش سطح ATP داخل سلولی و به وجود آمدن آسیب‌های ساختمانی می‌باشد.

گیاهان دارویی متعددی برای کاهش و افزایش قدرت باروری در مردان مورد استفاده قرار گرفته است؛ به طوری که تحقیقات علمی مدرن در تأیید اثرات ضد باروری و تقویت باروری با توجه به خواص آنتی اکسیدانی برخی از این گیاهان مورد آزمایش قرار گرفته است (۱۸). در حال حاضر بسیاری از مردم از گیاهان دارویی یا مشتقات آن ها جهت افزایش یا کاهش باروری و هم چنین میل جنسی استفاده می کنند (۱۹). عصاره های گیاهی مختلف دارویی با فعالیت ضد باروری و تقویت باروری در هر دو جنس نر و ماده بررسی شده اند .برخی از این گیاهان دارای خاصیت اسپرم کش هستند، برخی دیگر باعث افزایش تعداد اسپرم شده و تحرک اسپرم را تغییر می دهند .همچنین برخی از گیاهان باعث تغییر هورمون‌های بیضه می شوند (۲۰).کلم بروکلی *(Brassica oleracea L. cv Italica)* از سبزی های مهم و با ارزش غذایی بسیار بالاست که سرشار از ویتامین ها، آنتی اکسیدان ها و ترکیبات ضد سرطانی دیگر می باشد (۲۱). خاصیت ضد سرطانی کلم بروکلی به علت وجود ویتامین C (اسید آسکوربیک)، ویتامین E (آلفا توکوفرول)، فلاونوئید ها (کوئرستین و کامپفرول)، کاروتنوئید ها (کاروتن و

لوتئین) و گلوکوسینات ها است. پلی فنل های موجود در کلم بروکلی با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا می توانند به عنوان خنثی کننده های بسیار قوی رادیکال آزاد اکسیژن باشند (۲۲). قادری فروغ و همکاران عصاره هیدروالکلی بروکلی را دارای پتانسیل بالا در کنترل آسیب اکسیداتیو دیازینون به بافت بیضه و روند اسپرماتوژنز موش صحرایی اعلام نمودند (۲۳).

هم چنین بروکلی اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظتی خود را در درمان بیماری پارکینسون، سرطان پستان، سرطان مثانه، پروستات، سرطان کلیه، کبد و پوست، آسیب مغز و فزونی کلسترول از خود نشان داده است (۲۲، ۲۱). با توجه به اهمیت تغییرات پارامترهای اسپرم در باروری و توجه خاص به استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدان گیاهی در کنترل آسیب‌های اکسیداتیو وارده به اسپرم در زمان انجماد، چنین خواص آنتی‌اکسیدانی منحصر به فرد کلم بروکلی و کمبود اطلاعات اثربخشی عصاره در افزایش فعالیت جنسی، هدف از این مطالعه بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی کلم بروکلی بر روی پارامترهای اسپرم قبل و بعد از فریز در موش سوری نر و میزان اثربخشی آنتی‌اکسیدانی ان در زمان القای استرس اکسیداتیو فرایند انجماد اسپرم بود.

روش بررسی

این مطالعه تجربی مداخله‌ای بر روی ۲۸ سر موش سوری سوری نر نژاد NMRI تقسیم شده به چهار گروه هفت‌تایی انجام شد. حیوانات در شرایط استاندارد درجه حرارت ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد، رطوبت حدود ۵۵ تا ۶۰ درصد با دوره نوری۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آسان به آب و غذای کامل طبق ضوابط قانون نگه داری از حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شد. موش های گروه مطالعه به مدت ۴۲ روز بیش از یک دوره اسپرماتوژنز روزانه مورد تزریق داخل صفاقی قرار گرفتند. گروه ها به شرح زیر بود :

گروه کنترل بدون هیچ گونه تیماری دریافت آب و غذای استاندارد

گروه T1 دریافت عصاره هیدروالکلی بروکلی ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل صفاقی به مدت ۴۲ روز

گروه T2 دریافت عصاره هیدروالکلی بروکلی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل صفاقی به مدت ۴۲روز

گروه T3 دریافت عصاره هیدروالکلی بروکلی ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل صفاقی به مدت ۴۲ روز

در روز ۴۳، موش‌ها اندازه گیری وزنی شدند و سپس توسط اتر بیهوش شدند. جهت بررسی پارامترهای اسپرمی، ناحیه شکم موش‌ها برش داده شد و دم اپیدیدیم که در قطب تحتانی هر بیضه قابل مشاهده می باشد، توسط قیچی استریل بریده شده و در دیش کالچر سه سانت در محیط کشت HamsF10 با افزودن ۵٪ آلبومین گاوی به صورت جداگانه قرار دادیم، محیط همزفتن از قبل به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور به دمای ۳۷ درجه رسیده، سپس با فشردن و تکان دادن آرام، سلول های اسپرم به صورت شناور وارد محیط کشت شدند . قطعات اضافی اپیدیدیم از داخل ظرف برداشته شده و این محیط کشت حاوی سوسپانسیون اسپرم سپس به منظور ایجاد ظرفیت یابی لازم در اسپرم به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. بعد از انکوباسیون، مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی اسپرم توسط سمپلر برداشته شده و مورد آنالیز قرار گرفتند (۲۴). محیط کشت همزفتی که خریداری کرده بودیم، حاوی 4-20hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid HEPES بوده، به همین خاطر این محیط کشت همزفتن را در انکوباتور Co_2 نباید قرار داد چون Co_2 باعث ایجاد سمیت و مرگ اسپرم‌ها می‌گردد.

آنالیز اسپرم بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی و به صورت زیر انجام گرفت. برای بررسی تعداد اسپرم از لام هموسیتومتر استفاده شد. فقط اسپرم هایی که دارای سر، ناحیه میانی و دم بودند با استفاده از بزرگ نمایی ۴۰× میکروسکوپ نوری شمارش شدند. شمارش برای هر نمونه دو بار انجام گرفت و میانگین آن اعلام شد. نتایج به صورت تعداد اسپرم در یک میلی لیتر مایع منی بیان شد (۲۵). مطالعه حرکت (motility)

اسپرم‌ها بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی انجام گردید. برای بررسی تحرک اسپرم‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه را در مرکز چاهک‌ها قرار داده و پس از گذاشتن درپوش توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ×۴۰ مشاهده و شمارش گردید. در این بررسی، تعداد ۲۰۰ سلول مورد شمارش قرار گرفته و از این تعداد درصد تحرک اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی مشخص شد (۲۶).

مطالعه قابلیت حیات (Viability) اسپرم به روش سیتوپلاسمی و با استفاده از رنگ آمیزی ائوزین و توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ×۴۰ انجام گردید (۲۷). اسپرم های زنده به دلیل سالم بودن غشا سیتوپلاسمی رنگ ائوزین وارد شده به داخل سلول را مجدداً خارج می کنند و بنابراین در زیر میکروسکوپ بدون رنگ قابل مشاهده هستند. در حالی که اسپرم‌های مرده به دلیل غشا آسیب دیده رنگ وارد شده به داخل سلول را حفظ نموده لذا بعد از شست وشو هم چنان به صورت رنگی مشاهده می شوند (۲۸).

در ارتباط با شکنندگی DNA از کیت شرکت پارسی ژن به نام Iranian DNA Fragmentation Index iDFI استفاده شد. اساس این آزمایش جداسازی DNA اسپرم نرمال از غیرنرمال است به نحوی که DNA اسپرم نرمال در مجاورت محلول‌های احیا کننده راحت باز شده و به صورت هاله‌ای اطراف سر اسپرم قرار گیرد و بالعکس DNA اسپرم غیرنرمال در مجاورت مواد احیا کننده بازنشده، و حالت فشرده خود را از دست نداده و اطراف سر اسپرم ایجاد هاله نمی‌کند (۲۹).

برای فریز اسپرم دم اپیدیدیم را جدا نموده و و در ظروف کشت سه‌سانت در محیط کشت همزفتنHamsF10 که از قبل در ۳۷ درجه انکوبه شده بود جداسازی شد. برای کمک به خروج اسپرم‌ها، سپس از حاشیه قطره اسپرم‌ها را با سمپلر برداشته و در داخل لوله فالکون ریخته و به مدت یک ساعت در زاویه ۴۵ درجه اجازه داده شد تا اسپرم‌ها شنا کنند و از اسپرم هایی که به سطح لوله فالکون حرکت کرده‌اند ۱ میلی لیتر برداشته داخل کرایو ویال ریخته شد. سپس ۰/۷ میلی لیتر از محلول فریز را به آرامی روی آن ریخته و مدت ۷ دقیقه اجازه داده شد تا در دمای محیط بماند. سپس ویال‌های مخزن انجماد را به مدت ۱۵ دقیقه روی بخار ازت (۱۲۰- درجه سانتی گراد) قرار داده و پس از آن در داخل تانک ازت مایع (دمای ۱۹۶- درجه سانتی گراد) گذاشته می‌شود (۳۰).

برای دفریز کردن اسپرم ها ویال های مخزن را در بن‌ماری ۳۷ درجه قرار داده می شود تا زمانی که مایع شود. سپس محتویات داخل کرایوویال را با سمپلر به میکروتیوب منتقل نموده و سانتریفیوژ می‌شود . پس از سانتریفیوژ مایع رویی را دور می‌ریزیم، اسپرم‌ها ته‌نشین شده‌اند به صورت رسوب سفید رنگ در انتهای میکروتیوب تجمع یافته ، روی این رسوب محلول همزفتن ریخته شد. سپس آن را داخل یک دیش کالچر ریخته و پس از ۱۰ دقیقه انکوبارتور گذاری اسپرم‌ها را زیر میکروسکوپ مشاهده و پارامترهای ان بررسی شد (۳۱). با استفاده از روش‌های استاندارد و کیت‌های (ZellBio، آلمان) طبق دستورالعمل ذکر شده آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و مالون‌دی‌آلدئید در خون موش‌های تیمارشده در گروه های مختلف اندازه‌گیری شد.

روش تهیه عصاره هیدروالکلی بروکلی

عصاره کلم بروکلی به روش ماسیراسیون تهیه شد. به این صورت که بعد از تهیه گیاه مورد نظر و تایید مرکز هرباریوم دانشگاه کردستان، کلم ها شستشو داده شد. سپس خشک و به صورت پودر شده با آسیاب در آمد. مقدار ۳۰۰ گرم/ یک‌لیتر اتانول ۸۰درصد به مدت ۴۸ساعت نگه‌داری شد. پس از صاف کردن عصاره با کاغذ صافی(Germany-whatman) اتانول از محلول به وسیله دستگاه روتاری تحت خلا (IKA-R V 8) برداشته شد. عصاره به دست آمده در نرمال‌سالین کاملاً حل نموده و تا زمان استفاده در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (۳۲). ارزیابی‌های مورفولوژیکی، میکروسکوپی، اندازه‌گیری مواد موثره آنتی‌اکسیدانی با روش اسپکتروفتومتری، اندازه‌گیری سولفورفان با روش کروماتوگرافی مایع فاز معکوس

Reverse-phase high performance liquid hromatography(RP-HPLC) برای انجام استانداردسازی

عصاره مورد نظر می‌باشد (۳۴،۳۳). برای تعیین میزان تجویز عصاره به هر موش، از عصاره تغلیظ شده در آب مقطر استریل غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد تهیه شد. سپس به ازای هر گرم وزن موش ۰/۰۱ میلی لیتر داخل صفاقی تزریق شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزارSPSS V 16 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. بعد از تایید نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف، از آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

اصول اخلاقی پژوه مربوطه مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کردستان قرار گرفت (کد اخلاق IR.MUK.REC.1397/5001).

نتایج

وزن موش‌ها در گروه های مختلف در روز اول اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد (P=۰/۱۲۴). در روز آخر مطالعه کمترین وزن در گروه کنترل ۳۸/۹۵±۰/۵۲۵ گرم دیده شد که اختلاف آماری معنی‌داری را با سایر گروه‌ها نشان داد (P<۰/۰۵) (جدول ۱)

جدول ۱: بررسی وزن اولیه و نهایی حیوانات در گروه‌های مختلف مورد آزمایش

گروه هاپارامترها	گروه کنترل	گروه آزمایش اول	گروه آزمایش دوم	گروه آزمایش سوم
وزن روز اول(گرم)	^{a}۴۲/۸۰±۰/۷۲۰	^{a}۴۳/۹۶±۰/۹۰۴	^{a}۴۱/۶۶±۲/۰۳۶	^{a}۴۱/۶۷±۲/۰۳۵
وزن روز آخر(گرم)	^{a}۳۸/۹۵±۰/۵۲۵	^{b}۴۳/۴۱±۱/۵۶۰	^{b}۴۳/۴۲±۱/۴۵۹	^{b}۴۳/۱۸±۱/۸۳۹

حروف نامتشابه لاتین به صورت سطری نشان بر اختلاف معنی دار $P<0.05$ پارامترها بین گروههای مختلف آزمایش است.

در ارتباط با وزن بیضه راست بیشترین میزان در گروه آزمایش دوم و سوم بود که اختلاف آماری معنی‌داری را با گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۵). در ارتباط با وزن بیضه چپ در گروه آزمایش سوم ۰/۱۳±۰/۰۰۴ بیشترین میزان و با گروه کنترل معنی دار شد (P<۰/۰۵). در ارتباط با طول بیضه راست و چپ بیشترین میزان در گروه آزمایش سوم بوده که با گروه کنترل معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). اما در ارتباط با قطر بیضه‌های راست و چپ در گروه آزماش دوم بیشترین میزان دیده شد و این اختلاف با گروه کنترل معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) (جدول ۲).کمترین غلظت اسپرم در گروه کنترل ۱۰^{۶}× ۲۴۹ و بیشترین در گروه آزمایش سوم ۷۱۴×۱۰^{۶} دیده شد. اختلاف غلظت اسپرم در گروه آزمایش سوم با گروه کنترل و سایر گروه های آزمایش معنی‌دار شد (P<۰/۰۵)).

جدول ۲: بررسی خصوصیات هیستومورفومتریک بیضه راست و چپ حیوانات در گروه‌های مختلف مورد آزمایش

گروهها / پارامترها	کنترل	گروه آزمایش اول	گروه آزمایش دوم	گروه آزمایش سوم
وزن بیضه راست (گرم)	^{a}۰/۱۱±۰/۰۰۷	^{a}۰/۱۲±۰/۰۰۶	^{a}۰/۱۳±۰/۰۰۲	^{a}۰/۱۳±۰/۰۰۶
وزن بیضه چپ (گرم)	^{a}۰/۱۱±۰/۰۰۶	^{b}۰/۰۹±۰/۰۰۶	^{a}۰/۱۱±۰/۰۰۴	^{c}۰/۱۳±۰/۰۰۴
طول بیضه راست (سانتی‌متر)	^{a}۰/۸۵±۰/۰۱۸	^{b}۰/۷۴±۰/۰۱۷	^{a}۰/۸۴±۰/۰۲۰	^{c}۰/۹۲±۰/۰۱۶
طول بیضه چپ (سانتی متر)	^{a}۰/۷۹±۰/۰۱۹	^{b}۰/۷۱±۰/۰۱۸	^{b}۰/۷۴±۰/۰۳۰	^{d}۰/۹۵±۰/۰۱۳
قطر بیضه راست (سانتی‌متر)	^{a}۰/۵۱±۰/۰۱۶	^{b}۰/۶۱±۰/۰۱۲	^{b}۰/۶۴±۰/۰۲۳	^{a}۰/۵۶±۰/۰۲۰

قطر بیضه چپ (سانتی‌متر)	^{a}۰/۵۵±۰/۱۱	^{b}۰/۶۷±۰/۰۱۴	^{b}۰/۶۹±۰/۰۰۴	^{c}۰/۵۱±۰/۰۰۸

حروف نامتشابه لاتین به صورت سطری نشان بر اختلاف معنی دار$P< ۰/۰۵$ پارامترها بین گروه‌های مختلف آزمایش است.

جدول ۳: بررسی غلظت اسپرم در گروه‌های مختلف مورد آزمایش

گروه‌ها	گروه کنترل	گروه آزمایش اول	گروه آزمایش دوم	گروه آزمایش سوم
تعداد کل اسپرم (میلیون بر میلی متر مکعب)	^{a}۲۴۹/۱۶±۴/۸۶۰	^{a}۲۵۹/۶۶±۱۶/۹۳۶	^{b}۳۵۳/۱۶۶±۷/۷۷	^{c}۷۱۴/۰۰±۱۰/۲۶۹

حروف نامتشابه لاتین نشان بر اختلاف اماری معنی دار بین گرووهای مختلف است (P<0.05)

در خصوص پارامترهای اسپرم قبل از انجماد، گروه آزمایش سوم بیشترین درصد زنده مانی اسپرم را با حدود ۹۶ درصد داشته که دارای اختلاف آماری معنی‌داری با سایر گروه‌های آزمایش شد (P<۰/۰۵) (جدول ۳) درصد تحرک حدود ۹۸ درصد اسپرم‌ها در گروه آزمایش سوم متحرک و فعال بودند. این میزان در ارتباط با گروه کنترل و آزمایش اول قابل ملاحظه و اختلاف آماری معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). درصد DNA Fragmentation در گروه آزمایش کنترل حدود ۶۴ درصد بیشترین و در گروه آزمایش سوم حدود۶۰ درصد کمترین را نشان داد که اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). پارامترهای اسپرم بعد از انجماد، درصد زنده مانی در همه گروه ها کاهش یافت. این کاهش در گروه کنترل نسبت به گروه های آزمایش حدود سه و چهار برابر بوده و این اختلافات در سطح (P<۰/۰۵) معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۵). به نحوی که تیمار با عصاره در گروه آزمایش سوم درصد زنده‌مانی را به بیشترین میزان خود حدود ۲۲ درصد رسانید. درصد تحرک اسپرم‌ها بعد از دفریز در گروه کنترل حدود ۵ و در گروه آزمایش سوم به حدود ۲۱ درصد رسید. این کاهش درصد تحرک در گروه کنترل به حدود ۴ برابر نسبت به گروه آزمایش سوم را نشان داد. DNA Fragmentation در گروه آزمایش سوم کمترین میزان حدود ۶۳ درصد و گروه کنترل به بیشترین میزان ۶۷ درصد رسید (جدول ۴).

اختلاف بارزتر در درصدهای زنده‌مانی و تحرک نسبت به DNA Fragmentation نشان بر اهمیت کنترل استرس اکسیداتیو و تقویت غشا اسپرم و سلامت اسپرم نسبت به ماده ژنتیکی آن در زمان تیمار با عصاره است.

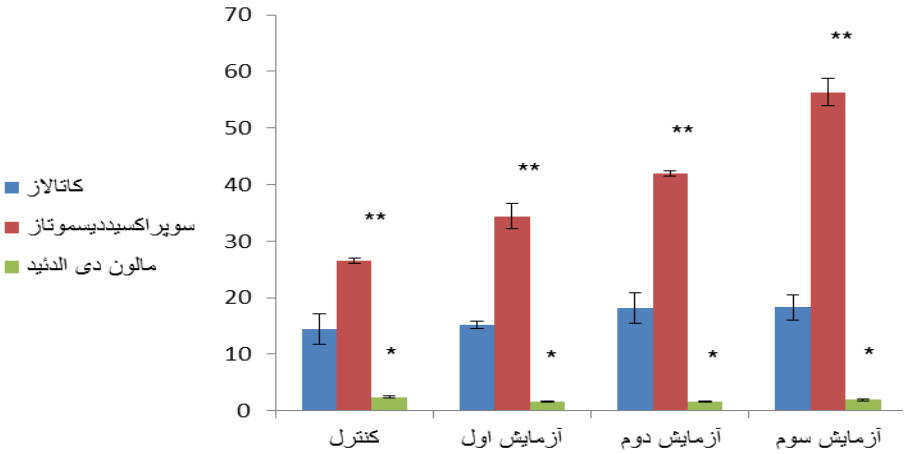
جدول ۴: بررسی پارامترهای اسپرم قبل و بعد از انجماد در گروه های مختلف مورد آزمایش

پارامترها / گروه‌ها	گروه کنترل	گروه آزمایش اول	گروه آزمایش دوم	گروه آزمایش سوم
درصد زنده مانی قبل از انجماد	^{a}۸۱/۴۱±۰/۹۱۶	^{a}۸۰/۸۳±۱/۴۹۲	۸۵/۰۰±۱/۴۵۱^{a}	^{b}۹۶/۰۶±۱/۲۳۸
درصد متحرک قبل از انجماد	^{a}۶۹/۶۶±۱/۵۴	^{a}۷۴/۸۳±۲/۲۴۲	۹۱/۸۳±۰/۹۴۵^{b}	^{b}۹۸/۵۸±۰/۴۱۶
درصد DNAFragmentation قبل از انجماد	^{a}۶۴/۰۰±۳/۸۷۹	^{a}۶۳/۵۰±۲/۹۹۱	^{a}۶۴/۲۵±۲/۱۲۳	^{a}۶۰/۳۳±۲/۲۸۲
درصد زنده مانی بعد از انجماد	^{a}۴/۶۶±۰/۴۲۱	^{b}۱۳/۶۵±۱/۴۵۷	^{b}۱۳/۲۶±۲/۹۲۵	^{c}۲۲/۱۶±۱/۵۵۸
درصد متحرک بعد از انجماد	۵/۳۳±۰/۴۲۱^{a}	۱۱/۱۶±۰/۹۸۰^{b}	^{b}۱۲/۶۶±۱/۶۰۵	^{c}۲۱/۸۳±۳/۰۲۶
درصد DNAFragmentation بعد از انجماد	۶۷/۲۴±۳/۰۶۴^{a}	^{b}۶۴/۲۵±۰/۹۶۲	^{b}۶۴/۱۹±۴/۰۰۰	^{b}۶۳/۳۷±۰/۵۴۶

حروف نامتشابه لاتین به صورت سطری نشان بر اختلاف معنی دار P<0.05 پارامترها در گروه های مختلف است.

در خصوص پارامترهای استرس اکسیداتیو آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و مالون‌دی‌الدئید در سرم خون موش‌های گروه های مختلف مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. آنزیم کاتالاز بیشترین میزان را در گروه آزمایش سوم (U/mL) ۱۸/۲۸±۲/۲۷۶ و دوم (U/mL) ۱۸/۱۹±۲/۶۴۰ نشان داد. این اختلاف با گروه کنترل و آزمایش اول معنی‌دار نشد (P=۰/۷۲۴). در ارتباط با غلظت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بیشترین میزان در گروه آزمایش سوم (U/mL) ۵۶/۳۶±۲/۴۲۵

و کمترین در گروه کنترل (U/mL) ۴۲۶ /۰±۲۶/۵۴ شد. این اختلاف معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۲). در ارتباط با غلظت مالون‌دی‌آلدئید بیشترین میزان در گروه کنترل (nm/µM) ۲/۴۷±۰/۱۱۷ و با سایر گروه های آزمایش اختلاف آماری معنی‌داری را نشان داد (P=۰/۰۰۳) نمودار ۱)



نمودار ۱: بررسی تغییرات پارامترهای استرس اکسیداتیو در سرم حیوانات گروه های مختلف آزمایش

** نشان بر اختلاف آماری معنی دار گروه کنترل با سایر گروه های آزمایش در آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (U/ml)،

* نشان بر اختلاف آماری معنی دار مالون دی آلدئید (nm/µM) در گروه کنترل با سایر گروه های آزمایش

بحث

مباحث مربوط به پارامترهای اسپرم می‌تواند در مباحث ناباروری موثر باشد، آسیب های ناشی از فریز اسپرم و استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث تغییر در شرایط اسپرم و پارامترهای مربوط به آن باشد. استفاده از عصاره‌های گیاهی با اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در کنترل این آسیب‌ها موثر باشد، بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی کلم بروکلی بر فریز اسپرم می‌باشد.

در مورد وزن موش‌ها در روز آخر مطالعه کمترین وزن در گروه کنترل دیده شد که اختلاف آماری معنی‌داری را با سایر گروه‌ها نشان داد. این مسئله نشان دهنده بهبود وزن حیوانات در زمان تجویز دوزهای مختلف بروکلی نسبت به گروه کنترل می‌باشد. در مطالعه مهاجری و همکاران با عنوان بررسی تاثیر مهاری عصاره اتانولی کلم بروکلی (*Brassica oleracea L. var. italic*) بر سرطان القایی توسط -۴ نیتروکینولون -۱- اکسید در دهان موش سوری، اعلام شد که کاهش معنی‌دار وزن بدن در موش‌های گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد و عدم وجود اختلاف معنی‌دار در وزن بین گروه‌های تیمار با یکدیگر در پایان دوره آزمایش، نشان دهنده عدم اثرات سوء عصاره الکلی کلم بروکلی در مقادیر مختلف بر موش ها بوده و اختلاف ایجاد شده با گروه شاهد به دلیل تغییرات پیش‌سرطانی القا شده توسط ۴- نیتروکینولون ۱- اکسید می‌باشد (۳۵). در این راستا می توان افزایش وزن موش ها در گروه تیمار با عصاره نسبت به گروه شاهد را با توجه به عدم وجود عامل مداخله‌گر توجیه نمود. در ارتباط با وزن بیضه راست و چپ و طول آن بیشترین میزان در گروه دریافت عصاره با دوز حداکثری بود. قادری فروغ و همکاران در مطالعه تغییرات وابسته به دوز عصاره هیدروالکلی کلم بروکلی در کنترل استرس اکسیداتیو القایی دیازینون بر سلول‌های بافت بیضه موش صحرایی نر بالغ، نتایج به دست آمده از این مطالعه اهمیت عصاره هیدروالکلی بروکلی در کنترل استرس اکسیداتیو دیازینون در بافت بیضه و بهبود وضعیت سلول های آن را تأیید می کند؛ به نحوی که در دوز ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن سبب افزایش معنی‌دار میانگین سلول های بافت بیضه، افزایش وزن و طول نسبت به گروه کنترل نیز گردیده است. بنابراین افزایش وزن و طول بیضه راست و چپ در مطالعه حاضر می‌تواند حاکی از عملکرد مثبت عصاره در تغییرات هیستومورفومتریک بیضه باشد. این مسئله در مطالعه قادری فروغ و همکاران ۱۳۹۶ با توجه به آسیب دیازینون اعلام شد که عصاره بروکلی می‌تواند این آسیب را کنترل و از نظر تغییرات هیستومورفومتریکی اثرات مثبتی را بر بافت بیضه و وضعیت سلول های رده اسپرماتوژنز گذارد (۲۳).در مورد غلظت اسپرم، درصد تحرک و زنده‌مانی قبل و بعد از فریز اسپرم بیشترین درصد در گروه تیمار با عصاره بروکلی در دوز ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بود..Panahi Z و همکاران ۲۰۰۵ اعلام کردند که فلاونوئیدها جزء دست های از ترکیبات به نام فیتواستروژن‌ها هستند و برخی از تحقیقات حاکی از آن است که اثر رژیم فیتواستروژنی می تواند به طور مستقیم بر سطح گنادها تأثیر بگذارد و باعث افزایش در سطح هورمون‌ها شود و هم چنین این رژیم میتواند وابسته به دوز عمل کند (۳۶) .

در مطالعه رنجبر و همکاران با عنوان درسال ۲۰۰۷ گفته شده، انتظار می‌رود با افزایش تستوسترون، سطح LH کاهش یابد (۳۷). نتایج به دست آمده در مطالعه مربوطه مشخص شد که غلظت سرمی هورمون تستوسترون در دریافت عصاره نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داد این افزایش ممکن است به دلیل وجود ترکیبات فلاونوئیدی موجود در کلم بروکلی باشد؛ چرا که فلاونوئیدها با ممانعت از فعالیت آنزیم های مداخله‌گر در متابولیسم تستوسترون مانند آروماتاز باعث افزایش سطح سرمی هورمون تستوسترون می شود .تحقیقات نشان داده که فلاونوئیدها مانع از عملکرد ۵ -آلفاردوکتاز می گردند. پس بدین ترتیب از تبدیل تستوسترون به دی-هیدروتستوسترون ممانعت به عمل می آورند و در نتیجه میزان هورمون تستوسترون افزایش می‌یابد (۳۸). که نتایج مطالعه اخیر همسو با نتایج مطالعه قبلی بوده است به نحوی که به نظر می رسد عصاره بروکلی عاملی برای افزایش تستوسترون و در نتیجه بهبود تعداد و تحرک اسپرم خواهد بود.

افزایش معنی‌دار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاهش مالون‌دی‌آلدئید در سرم موش‌های تحت درمان با عصاره بروکلی

نشان دهنده تاثیر عصاره بروکلی با اثرات آنتی‌اکسیدانی بر پارامترهای اسپرم است. گزارش شده است خاصیت آنتی‌اکسیدانی کلم بروکلی به علت وجود ویتامین C (اسید آسکوربیک)، ویتامین E (آلفا توکوفرول)، فلاونوئید ها (کوئرستین و کامپفرول) ، کاروتنوئید ها (کاروتن و لوتئین) و گلوکوسینات ها است (۲۲). پلی فنل های موجود در کلم بروکلی با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا می توانند به عنوان خنثی کننده های بسیار قوی رادیکال آزاد اکسیژن باشند (۲۱).

فصیح و همکاران ۱۳۹۵، در مطالعه اثر اسانس بروکلی بر فعالیت آنزیم های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در کلم بروکلی، اعلام داشتند که کلم بروکلی فعالیت آنزیم پراکسیداز بیشتری نسبت به آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نشان داد. و فعالیت هردوی این آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز کاهش یافته، که کاهش فعالیت این آنزیم‌ها را به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه دانستند، با توجه به نتایج این مطالعه، اختلاف معنی‌داری که در ارتباط با غلظت آنزیم سوپراکسیددسموتاز نسبت به گروه کنترل به دست آوردیم، توجیه می‌شود و البته لازم به ذکر است در مطالعه حاضر ما با استفاده دوزهای مختلف کلم بروکلی گروه‌ها را تیمار کردیم و اختلاف در گروهها وابسته دوز را نیز می‌توان توجیه کرد که در مطالعه فصیحی و همکاران از اسانس کلم بروکلی در یک دوز استفاده کردند (۳۹). در مطالعه Deng Z و همکاران ۲۰۱۷ و Koh و همکاران ویتامین E باعث کاهش استرس اکسیداتیو در بافت بیضه و کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید می‌باشد (۴۰،۲۲). در مطالعه Sarwat Jahan و همکاران ۲۰۱۴ در ارتباط اثرات مقایسه‌ای عصاره گیاه Ficus religiosa، ویتامین E و سولفورافان بر روی آسیب بافتی کادمیوم و تغییرات هورمونی اعلام نمودند که تجویز کادمیوم در دوز دو میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش وزن بدن، کاهش معنی‌دار میزان روی و کاهش سطح هورمون تستوسترون می‌شود. این مسائل در گروه دریافت عصاره گیاهی و دریافت سولفورفان با اثرات قوی آنتی‌اکسیدانی و تغییرات معنی‌دار آماری سبب افزایش هورمون تستوسترون و افزایش سطح روی نسبت به گروه دریافت ویتامین E شد (۴۱). در این راستا، عصاره بروکلی با توجه به پتانسیل‌های سولفورفان نیز به عنوان آنتی‌اکسیدان قوی در این مطالعه نیز توانست سبب بهبود وضعیت هورمون تستوسترون و میزان روی در بافت بیضه و تقویت وضعیت بدنی حیوان از نظر افزایش وزن شود. در راستای تکمیل نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، می توان با کمک روش‌های اختصاصی رنگ آمیزی DNA، اندازه گیری آنزیم‌های استرس اکسیداتیو در بافت و مطالعات هیستوپاتولوژیک بافت بیضه، به بررسی دقیق‌تر و نتایج کامل‌تری دست یافت.

نتیجه‌گیری

با توجه به پتانسیل های آنتی‌اکسیدانی قوی بروکلی و ایمنی بالای این عصاره، در این مطالعه عصاره ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره توانست بهترین اثر را بر روی پارامترهای اسپرم در شرایط تازه و فریز با کنترل عوامل استرس اکسیداتیو در موش سوری داشته باشد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه دکتری عمومی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج است. از معاونت محترم پژوهشی جهت تایید و همکاری و حمایت مالی کمال سپاسگزاری را دارد. هم چنین از جناب اقای مهندس سامان جاوید مسئول آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی به جهت همکاری و مساعدت شایسته در انجام مطالعه کمال تشکر را داریم.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

References:

1-Ashok Agarwal, Aditi Mulgund, Alaa Hamada Michelle Renee Chyatte. ***A unique view on male infertility around the globe.*** Reprod Biol Endocrinol 2015; 13: 37.

2-Marah I, Marbeen A, Mossa M, Marbut I, Allahwerdy Y. ***The probable therapeutic effects of date palm pollen in the treatment of male infertility.*** Tikrit J Pharmaceutical Sci 2005; 5(1): 30-5.

3-Low BS, Das PK, Chan KL. ***Standardized quassinoid-rich Eurycoma longifolia extract improved spermatogenesis and fertility in male rats via the hypothalamic–pituitary–gonadal axis***. J Ethnopharmacol 2013; 145(3): 706-14.

4-Sharpe RM, Franks S. ***Environment, lifestyle and infertility--an inter-generational issue***. Nat Cell Biol 2002; 4(Suppl): S33-40.

5-Brugh VM, Lipshultz LI. ***Male factor infertility: evaluation and management***. Med Clin North Am 2004; 88(2): 367-85.

6-Brugh VM, Matschke HM, Lipshultz LI. ***Male factor infertility***. Endocrinol Metab Clin North Am 2003; 32(3): 689-707.

7-Hirsh A. ***Male subfertility***. BMJ 2003; 327(7416): 669-72.

8-Kaneko S, Oshio S, Kobanawa K, Kobayashi T, Mohri H, IIzuka R. ***Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an innercolumn***. Biol Reprod 1986; 35(4): 1059-63.

9-Tournaye H. ***Male factor infertility and ART***. Asian J Androl 2012; 14(1): 103-8.

10- Palermo G, Joris H, Derde MP, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A, et al. ***Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection***. Fertil Steril 1993; 59(4): 826-35.

11- Polge C, Smith AU, Parkes As. ***Revival of spermatozoo after vitrification and dehybration at low temperatures.*** Nature 1949; 164: 666

12- Devireddy RV, Swanlund DJ, Bischorf JC. ***Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice cryoprotective agents***. Biol Reprod 1999; 61: 764-75.

13- An TZ, Lwakiri M, Edashige K, Kasai M. ***Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa***. Cryobiology 2000; 40(3): 237-49.

14- Du J, Tao J, Mazur P, Crister JK. ***Water volume and osmotic behavior of mouse spermatozoa determind by electron paramagnetic resonance***. J Reprod Fertil 1994; 101: 37-42.

15- Chatterjee S, de Lamirande E, and Gagnon C. ***Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione***. Mol Reprod Dev 2001; 60(4): 498-506.

16- Farber JL. ***Mechanisms of cell injury by activated oxygen species***. Environ Health Perspect 1994; 102 (Suppl10): 17-24.

17- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA and Gagnon C. ***Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing***. Mol Reprod Dev 2000; 55(3): 282-88.

18- Jain S. ***Medicinal plants with potential anti-fertility activity: a review***. Int J Green Pharmacy 2015; 9(4): 223-8.

19- Kachroo M, Agrawal SS. ***Anti-implantation activity of different extract of the peels of citrus medica, Linn***. Int J Pharm Tech Res 2011; 3(1): 535-9.

20- Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Afshin Khaki A, Ozanci CC, Ghafari-Novin M, et al. ***The effects of Ginger on spermatogenesis and sperm parameters of rat***. Iran J Reprod Med 2009; 7(1): 7-12. [Persian]

21- Lemoine l, Civello P, Chaves A, Martinez G. ***Hot air treatment delays senescence and maintains quality of fresh-cut broccoli florets during refrigerated storage***. LWT-Food. Sci. Technol 2009; 42(6): 1076-81.

22- Koh E, Wimalasiri KM, Chassy AW, Mitchell AE. ***Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli***. J Food Composition Analysis 2009; 22(7-8): 637-43.

23- Qaderi Forough M, Raeeszadeh M, Amiri A**.** ***Dose-Response Changes of Brassica Oleracea Var. Italica Hydroalcholic Extract in the Control of Oxidative Stress by Induction of Diazinon on the Cells of Testicular Tissue in Male Adult Rat***. JRUMS 2017; 16(7): 593-604. [Persian]

24- Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, Tabibnejad N**.** ***Effects of ethanol consumption on chromatin consendation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat***. Alcohol 2011; 45(4): 403-9.

25- Rezazadeh Valojerdi M. ***Injection of intracytoplasmic sperm***.Tehran: Boshra Ltd 2002; 27-34.

26- ***World Health Organization (WHO) Laboratory manual for the examination of human and spermcervical mucus interaction***. 4th Ed Cambridge university press; 1999.

27- Cao XW, Lin K, Li CY, Yuan CW. ***A Review of WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen.*** Zhonghua Nan Ke Xue 2011; 17(12): 1059-63.

28- Yavari M, Talebi AR, Rezaie Zarchi S, Razavi Sheshdeh SAR. ***Effects of Different Doses of Silver Nanoparticles on Sperm Parameters,Chromatin Structure and DNA Integrity in Mice***. Cell & Tissue J 2015; 6(2):187-94 [Persian]

29- Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. ***Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test,*** Fertil Steril 2005; 84(4): 833-42.

30- Soleimanzadeh A, Saberivand A, Ahmadi A. ***effect of α-tocopherol on spermatozoa of rat***

semen after the freeze-thawing process. Urmia Medical Journal 2014; 25 (9): 826-834. [Persian]

31- Daghigh Kia H, Zare Ghaleh Jigh F, Najafi A; Vaseghi Dodran H. ***Effect of Bilberry extract in semen extender on ram semen quality after freeze-thawing process.*** J **A**nimal Production 2016; 18(4), 831-840. [Persian]

32- Koh E, Wimalasiri KM, Chassy AW, Mitchell AE. ***Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli.*** J Food Composition Analysis 2009; 22(7-8):637-43.

33- Vadivel S, Gowry S. ***Antitumor Activity and Antioxidant Role of Brassica oleracea Italica against Ehrlich ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice***. Res J Pharmaceutical, Biological Chem Sci 2011; 2(3): 275-85.

34- Suresh S, Waly MI, Rahman MS, Guizani N, Al-Kindi MA, Al-Issaei HK, Al-Maskari SN, Al-Ruqaishi BR, Al-Salami A. ***Broccoli (Brassica oleracea) reduces oxidative damage to pancreatic tissue and combats hyperglycaemia in diabetic rats***. Prev Nutr Food Sci 2017; 22(4): 277-84.

35- Mohajeri D, Agha Mohammadi J. ***The experimental study of inhibitory effect of hydroalcoholic extract of broccoli (Brassica oleracea L. var. italic) on induced cancer by -4 Nitroquinolone-1-Oxide in mice mouth*** J Comparative Pathobiology 2014; 11(2): 1311-20. [Persian]

36- Panahi Z. ***The effects of hydroalcoholic extract of Actinidia chinensis on sperm count and motility, and on the blood levels of estradiol and testosterone in male rats***. Arch Iran Med 2005; 8(3): 211-16.

37- Ranjbar A, Zareian P. ***Human physiology: endocrinology & reproduction.*** Tehran: Iliya; 2007. [Persian]

38- Sadr MS, Najafian M, Zareian M, Kargar H. ***Brassica Oleracea (Broccoli) hydro-alcoholic extract effect on concentration of LH, FSH and Testosterone hormones in male adult rats.*** Jondishapir J Health Res 2013; 4(2): 101-10 [Persian]

39- Fasih M, Ghorbani Nohooji M, Rahimi AR. ***The Effect of Three Medicinal Plants Essential Oils on the Activity of Peroxidise and Polyphenoloxidase Enzymes in Broccoli (Brassica oleracea L.var. Italica).*** JMP 2017; 61(1): 60-76. [Persian]

40- Deng Z, Rong Y, Teng Y, Mu J, Zhuang X, Tseng M, et al. ***Broccoli-Derived nanoparticle inhibits mouse colitis by activating dendritic cell AMPActivated protein kinase***. Mol Ther 2017; 25(7): 1641-54.

41- Jahan S, Khan M, Ahmed S, Ullah H. ***Comparative analysis of antioxidants against cadmium induced reproductive toxicity in adult male rats***. Syst Biol Reprod Med 2014; 60(1): 28-34.

.

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 26| NO 9 | Jan 2019
Received: 14 May 2018
Accepted: 13 Oct 2018

Effect of different concentrations of hydroalcoholic extract of broccoli on sperm parameters and oxidative stress factors before and after thawing in NMRI mice

Nadia Khademi[1], Mahdieh Raeeszadeh*[2], Azra Allah veisi[3]

Original Article

Introdution: Considering the importance of sperm parameters in fertility rate, the objective of this study was to evaluate the effect of hydro-alcoholic broccoli extract on sperm parameters before and after freezing in male mice.

Methods: In this experimental study, 28 male NMRI mice were divided into four groups of seven. Control group have not received any treatment, while the first, second, and third experimental groups received, 100, 200 and 300 mg / kg of hydro-alcoholic broccoli extract (prepared by Maceration method) using intra-peritoneal injection for 42 days, respectively. At the end of the period, blood serum was taken from mice to measure the catalase, superoxide dismutase and malondialdehyde enzymes. Sperm concentration, the number of sperm, sperm viability percentage, motility, and sperm DNA fragmentation percentage were measured before and after the freezing.

Results: The lowest sperm concentration in the control group was 249 × 10^6 and the highest in the third experiment was 714 × 10^6 mio cubic meters. The highest sperm viability percentage and sperm motility in the third experiment was 96% and 98%, respectively. The reduction in the viability rate of sperm after treatment in the control group was about three to four times more than the experimental groups and these differences were significant (P = 0.005). The concentration of catalase and superoxide dismutase enzyme in the third experiment was 18.28 ± 2.66 and 56.36 ± 2.425, respectively. The difference was significant in the superoxide dismutase enzyme in other groups. The lowest concentration of malondialdehyde was found to be 96.9 ± 1.40 nonomole/ micromole and significant with the control group.

Conclusion: The 300 mg / kg dose of broccoli extract have the best effect on fresh and freezed sperm parameters, which could be related to the antioxidant effects of the extract.

Keywords: Broccoli Extract, Sperm Parameters, Oxidative Stress.

Citation: Khademi N, Raeeszadeh M, Allah veisi AA. **Effect of different concentrations of hydroalcoholic extract of broccoli on sperm parameters and oxidative stress factors before and after thawing in NMRI mice.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 26(9): 921-33.

[1]Faculty of Veterinary Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

[2]Department. of Basic Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

[3]Department. of Basic Sciences, Infertility Treatment Center of Besat Hospital, Faculty Medicine, Kurdistan University of Medical Science, Sanandaj, Iran

***Corresponding author: Tel:** 09123474457, **email:** vet_mr@yahoo.com