DOI: 10.22092/VJ.2022.358751.1976
شماره ۱۳۸ بهار ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تاثیر افزودن ویتامین E به محیط انجماد بر کیفیت اسپرم یخگشایی شده در بز

• سعید اسماعیل‌خانیان(نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• رضا مسعودی
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی،کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۰۲-۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱-۰۳-۲۸
Email: esmaeilkhanian@yahoo.com

چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر آنتی‌اکسیدان ویتامین E به همراه گلیسرول به عنوان محافظ سرما بر بهبود انجماد پذیری اسپرم بزهای آلپاین می‌باشد. از چهار راس بز نر نژاد آلپاین (۳-۴ سال) واقع در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور به مدت پنج هفته و هر هفته دو نوبت اسپرم‌گیری شد. غلظت‌های مختلف ویتامین E (صفر، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار) در ۵ درصد گلیسرول به عنوان محافظ سرما جهت بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از اسپرم‌گیری، منی جمع‌آوری شده برای دو ساعت در دمای پنج درجه سلسیوس به تعادل دمایی رسید و به پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شد. پس از تعادل دمایی، پایوت‌ها در بخار ازت مایع منجمد شدند و جهت ذخیره‌سازی در داخل ازت مایع غوطه‌ور گردیدند. فراسنجه‌های اسپرم، از جمله جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده توسط نرم‌افزار کاسا، زنده‌مانی، یکپارچگی غشا و ناهنجاری کل ارزیابی شد. نتایج آزمایش نشان می‌دهد که افزودن سطوح مختلف ویتامین E به رقیق‌کننده اسپرم بز سبب بهبود معنی‌دار جنبایی کل شده است (P<۰/۰۵). همچنین یک میلی‌مولار ویتامین E بیشترین جنبایی پیش‌رونده، VSL، VCL و ALH را نسبت به سایر گروه‌های تیماری نشان داد (P<۰/۰۵). افزودن یک میلی‌مولار آنتی‌اکسیدان سبب بهبود معنی‌دار زنده‌مانی و یکپارچگی غشا اسپرم نسبت به گروه شاهد شده است (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد که افزودن سطوح مختلف ویتامین E در محافظ سرما گلیسرول به رقیق‌کننده، تفاوت آماری معنی‌داری را در اسپرم‌های نابهنجار و پراکسیداسیون لیپیدی نسبت به گروه شاهد ایجاد نکرد (P>۰/۰۵). بنابراین افزودن یک میلی‌مولار از آنتی‌اکسیدان مورد نظر به رقیق‌کننده، سبب بهبود انجمادپذیری اسپرم بز می‌شود.

کلمات کلیدی: اسپرم بز، انجماد پذیری، ویتامین E، سرما محافظ، گلیسرول

● Veterinary Researches & Biological Products No 138 pp: 41-48

Effect of freezing extender supplementation with vitamin E on post-thawed semen quality in buck

By: Esmaeilkhanian, S., (Corresponding Author) Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO),Karaj,Iran. and Masoudi, R., Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO),Karaj,Iran.

Received:2022-05-20 **Accepted: 2022-06-18**

Email: esmaeilkhanian@yahoo.com

The aim of this study was to evaluate the effects of vitamin E with glycerol as cryoprotectant on freezability of Alpine goat semen. Semen was collected from Alpine male Goat (3-4 years), twice a week for five weeks at the Animal Science Research Institute of IRAN (ASRI). Different concentrations of vitamin E (0, 0.5, 0.75 and 1 mM) in 5% glycerol as a cryoprotectant were evaluated to improve the quality parameters of goat semen. After ejaculation, semen equilibrated at 5 ºC for 2 h, and aspirated into 0.25 mL straws. After equilibration, straws were frozen in liquid nitrogen vapor and plunged into liquid nitrogen for storage. Sperm parameters, including motility and progressive motility by CASA, viability, membrane integrity and total abnormality sperm, were assessed. The results show that addition, different levels of vitamin E to the extender for freezing of goat semen can improve motility (P>0.05). Also, 1 mM vitamin E showed higher progressive motility, VSL, VCL and ALH than the other treatment groups (P>0.05). Addition 1 mM antioxidant significantly improved the viability and membrane integrity of sperm than the control group (P>0.05). Addition different levels of vitamin E to goat semen extender showed no significant difference in abnormal sperm and lipid peroxidation than the control group (P>0.05). Therefore, addition of 1 mM of vitamin E to extender improves the freezability of goat semen.

Keyword: Cryoprotectant, Freezability, Glycerol, Goat semen, Vitamin E.

مقدمه

تنش سرمایی و فرایند انجماد و ایجاد کریستال‌های یخ می‌تواند برای اسپرم زیان‌بار باشد (۸). غشای اسپرم نقش مهمی در مقاومت به سرما وزنده‌مانی اسپرم پس از ذوب و نیز فرآیند لقاح و بارورسازی ایفا می‌نماید. فرایند انجماد باعث آسیب‌های شیمیایی و فیزیکی زیادی به غشای اسپرم می‌شود که به تغییرات در انتقال از فاز لیپیدی، افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا توسط گونه‌های اکسیژنی فعال (ROS)، تنش‌های مکانیکی به غشا در اثر تنش اسمزی و تغییرات دمایی نسبت داده می‌شود. گونه‌های اکسیژنی فعال با احیای تک‌ظرفیتی اکسیژن تولید می‌شوند (۱۳) و مسئول حفظ فرایندهای فیزیولوژیکی در اسپرم مانند ظرفیت‌دار شدن و واکنش آکروزومی هستند (۱۷)، بااین‌حال مقادیر بالای گونه‌های اکسیژنی فعال زنده‌مانی اسپرم منجمد شده را کاهش می‌دهد و به دلیل وجود اسیدهای چرب غیراشباع در غشای پلاسمایی اسپرم سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شوند (۳). پراکسیداسیون لیپیدها و پس از آن تخریب فسفولیپیدهای غشا در طول یخ‌گشایی به حداکثر می‌رسد. تخمین زده می‌شود که افزایش ناگهانی در مصرف اکسیژن به‌وسیله اسپرماتوزوآ در طول فرآیند یخ‌گشایی ممکن است مسئول افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب غشای اسپرم شود، شرط موردنیاز برای بهینه بودن انجماد و کاهش آسیب‌های انجمادی استفاده از رقیق‌کننده‌ای است که بتواند از آسیب‌های گفته‌شده جلوگیری کرده و نیز مواد غذایی موردنیاز اسپرم برای فراهمی انرژی را در دسترس آن قرار دهد (۱۱).

سازوکارهاي متفاوتي براي مهار تنش اکسیداتیو و کاهش آسیب‌هاي ناشي از ROS وجود دارد که یکي از آن‌ها استفاده از آنتي‌اکسیدان در محیط است. وجود آنتي‌اکسیدان‌ها وضعیت ثابتي از سطح ROS را در پلاسماي منی ایجاد مي‌کند. آن‌ها به عنوان پاکسازي‌کننده رادیکال‌هاي آزاد، اسپرم را در برابر ROS حفاظت مي‌کنند. به همین دلیل به رقیق‌کننده باید آنتي‌اکسیدان اضافه شود. آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان یک محافظ برای غشای سلول‌های اسپرم عمل می‌نمایند. سیستم آنتی‌اکسیدانی متشکل از گلوتاتیون احیاشده، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و ویتامین E به‌عنوان سازوکارهای دفاعی علیه پراکسیداسیون لیپیدی در منی و حافظ تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها توصیف شده‌اند (۴).

ویتامین E یک ممانعت کننده شناخته‌شده پراکسیداسیون لیپید و یک آنتی‌اکسیدان عمده در غشاهای زیستی است و به‌عنوان پاک‌کننده رادیکال‌های لیپید پراکسیل و آلکوکسیل عمل کرده و از آسیب اکسیداتیو در منی جلوگیری می‌کند و همچنین به غشاهای سلولی یک پایداری کلی می‌بخشد که می‌تواند از خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آن مستقل باشد (۲). بنابراین با توجه به وجود تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها (ویتامین E) بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم هدف از پژوهش پیش رو، ارایه راهکاری نوین برای انجماد و بهبود فراسنج‌های کیفی اسپرم بز پس از یخ‌زدن با

افزودن غلظت‌های مختلف، ویتامین E به رقیق‌کننده و ارزیابی اثر آن بر خصوصیات جنبایی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشا و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم بز در طی مراحل انجماد- ذوب بود.

مواد و روش‌ها

محل اجرا و حیوان مورد استفاده در طرح

در این تحقیق از منی چهار راس بز نر نژاد آلپاین طرح سنتز بز شیری موسسه تحقیقات علوم دامی کشور و شرکت حامی سرمایه اقتصاد استفاده شد. بزها مربوطه در یک جایگاه نیمه مسقف تحت نور طبیعي قرار گرفته و با جیره در حد نگهداری بر اساس توصیه جداول استاندارد (AFRC ،۱۹۹۵) تغذیه شدند.

جمع‌آوری منی و ارزیابی پیش از انجماد

نمونه‌هاي مني به صورت هفته‌ای دو بار به وسیله مهبل مصنوعی از بزهاي مورد نظر جمع‌آوري شدند و براي جلوگيري از ايجاد شوک سرمايي به اسپرم‌ها، نمونه‌هاي مني تا زمان انتقال به آزمايشگاه، درون فلاسک عايق داراي آب ۳۵- ۳۴ درجه سانتی‌گراد نگهداري و پس از اتمام نمونه‌گيري به سرعت، به آزمايشگاه فيزيولوژی و توليدمثل منتقل و در حمام آب گرم قرار داده شدند.

غلظت بیشتر از $۲/۵ \times ۱۰^{۹}$ اسپرم درمیلي‌ليتر، حجم بین ۲- ۰/۷۵ میلي‌ليتر، جنبندگی بیشتر از ۷۰ درصد و ریخت‌شناسی کمتر از ۱۰ درصد اسپرم غیرطبیعی در هر انزال به عنوان نمونه طبیعی درنظر گرفته شدند. در غیر این صورت منی جمع‌آوری شده از بز مورد نظر حذف می‌شدند.

تیمارهای آزمایش، پردازش و انجماد منی

این آزمایش در قالب طرح آماری کاملا تصادفی با شش تکرار انجام شد. تعداد پنج تیمار آزمایشی شامل سه سطح آنتی‌اکسیدانی ویتامین E (۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار)، شاهد منفی (بدون ویتامین E) و شاهد مثبت (دارای دی‌متیل سولفوکساید) به عنوان تیمارهای آزمایشی به منظور انجماد اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند. سطح معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد. بی‌درنگ پس از جمع‌آوری منی و بررسی‌های اولیه و اطمینان حاصل نمودن از سالم بودن نمونه، منی جمع‌آوری شده از بزهای مربوطه، به منظور از میان برداشتن اثرات فردی با یکدیگر آمیخته شدند و به بخش‌های مساوی جهت رقیق‌سازی در محیط انجماد مربوطه تقسیم شدند. رقیق‌سازي به نسبت ۱ حجم منی و ۲۳ حجم محیط‌هاي انجماد فوق‌الذکر در دماي اتاق انجام شد. سپس لوله‌های فالکون حاوی گروه‌های تیماری منی در ظرف محتوي ۱۰۰ سی‌سي آب هم دما با محیط قرار داده شد و نمونه‌ها در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲/۵ ساعت گذاشته شدند. سپس بلافاصله بعد از سردسازی، نمونه‌ها در پایوت‌هاي انجماد ۰/۲۵ ميلي‌ليتر کشیده شد. در این مطالعه طرف دیگر پایوت‌هاي انجماد نیز با استفاده از پودر پلی ونیلیل الکل بسته شد. در مرحله بعد، پایوت‌هاي بسته شده حاوي منی به فاصله ۴ سانتي‌متري بالاي سطح ازت قرار گرفت. پس از گذشت ۱۰ دقیقه با سرعت منی در داخل ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) غوطه‌ور شده و در پایوت‌هاي مربوط به هر گروه تيماري در گابلت‌هاي مخصوص قرار داده شدند. نمونه‌ها سپس به تانک مخصوص ازت انتقال داده شد. برای یخ‌گشایی منی، پس از خارج کردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، به مدت ۱۰ ثانیه در دمای اتاق و مدت ۳۰ ثانیه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

ارزیابی اسپرم بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی

جنبایی

نخستین فراسنجه ارزیابی شده در این پژوهش بررسی جنبایی اسپرم پس از انجماد- یخ‌گشایی بود. بدین منظور سه پایوت از هر گروه تیماری با روشی که در بخش یخ‌گشایی منی توضیح داده شد، یخ‌گشایی گردید و نمونه‌ها درون میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شدند و با چرخش ملایم نمونه‌ها به‌هم زده شدند. سپس با استفاده از سمپلر متغیر، ۵ تا ۷ میکرولیتر از نمونه بر روی لام گذاشته شده و با گذاشتن یک لامل بر روی آن، جنبایی اسپرم با استفاده از سامانه کامپیوتری ارزیابی اسپرم ارزیابی شد.

فعالیت غشای اسپرم

در این مطالعه برای بررسی فعالیت غشای اسپرم از آزمون هاس استفاده شد. ۳۰ میکرولیتر از منی به ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاس که دارای فروکتوز و سیترات سدیم بود افزوده شد. سپس ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از گذشت این زمان ۱۰ میکرولیتر از نمونه انکوبه شده بر روی لام قرار داده شد و با استفاده از لامل بر روی لام گسترده شد و با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست و بزرگنمایی ۴۰۰ بررسی شدند. در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های با دم گره‌خورده دارای غشاء یکپارچه نسبت به گره نخورده دارای غشاء غیریکپارچه محاسبه شد.

زنده‌مانی

برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. برای این رنگ‌آمیزی ۵ میکرولیتر از نمونه‌ی اسپرم را برداشته و بر روی لام قرار دادیم. ۵ میکرولیتر از رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین برداشته و روی نمونه ریخته و با سر سمپلر به آرامی نمونه را هم‌زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ۳۰ ثانیه ۵ میکرولیتر از نمونه را برداشته و بر گوشه‌ی لام دیگری گذاشته و با یک لام دیگر بر روی لام به آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک‌شدن لام را زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ قرار داده و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد.

ریخت‌شناسی و اسپرم‌های غیرطبیعی

برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱ سی‌سی محلول هانکوک افزوده شده و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شده و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوا زیرمیکروسکوپ فازکنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی (سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) محاسبه شده است. میانگین سه

مشاهده به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شده است.

اندازه‌گیری سطح مالون‌دی‌آلدهاید

برای اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهاید که نشان‌دهنده لیپیدپراکسیداسیون در نمونه‌های اسپرم است از تست تیوباربوتیریک اسید استفاده شد. اندازه‌گیری غلظت MDA با تیوباربیوتریک اسید (TBA) یکی از رایج‌ترین بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها است. یک مولکول MDA با دو مولکول TBA واکنش می‌دهد و فرآورده این واکنش، مولکول صورتی‌رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد. یک میلی‌لیتر از هر نمونه منی با یک میلی‌لیتر EDTA، یک میلی‌لیتر BHT و دو میلی‌لیتر TCA با هم مخلوط شده و به داخل لوله‌های مخروطی ریخته شدند. لوله مخروطی در ۱۲۰۰ g برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند، یک میلی‌لیتر از محلول بالای لوله مخروطی با یک میلی‌لیتر TBA در میکروتیوب آمیخته شدند. لوله مخروطی برای مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند و سپس جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر (با اسپکتروفتومتر) اندازه‌گیری شد. جذب نور نمونه‌های مختلف یادداشت شدند و در پایان، غلظت MDA (نانو مول در میلی‌لیتر منی) محاسبه شد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل تیمارهای مورد نظر شامل سطوح مختلف ویتامین E (۱- ۰/۷۵ -۰/۵ میلی‌مول)، شاهد منفی (بدون ویتامین E) و شاهد مثبت (DMSO بدون ویتامین E) با استفاده از با نرم‌افزار آماری SAS ۹,۱ و رویه GLM انجام گرفت. هر تیمار شش تکرار داشت. برای هر تکرار پنج پایوت یخ‌گشایی شد و برای ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم، استفاده شد. ابتدا ارزیابی نرمال بودن خطاهای آزمایشی به روش آزمون Shapiro-Wilk و Kolmogorov- Smirinov انجام گرفت و در صورت نرمال نبودن با روش حذف داده‌های پرت کار نرمال‌سازی آن‌ها انجام می‌گرفت.

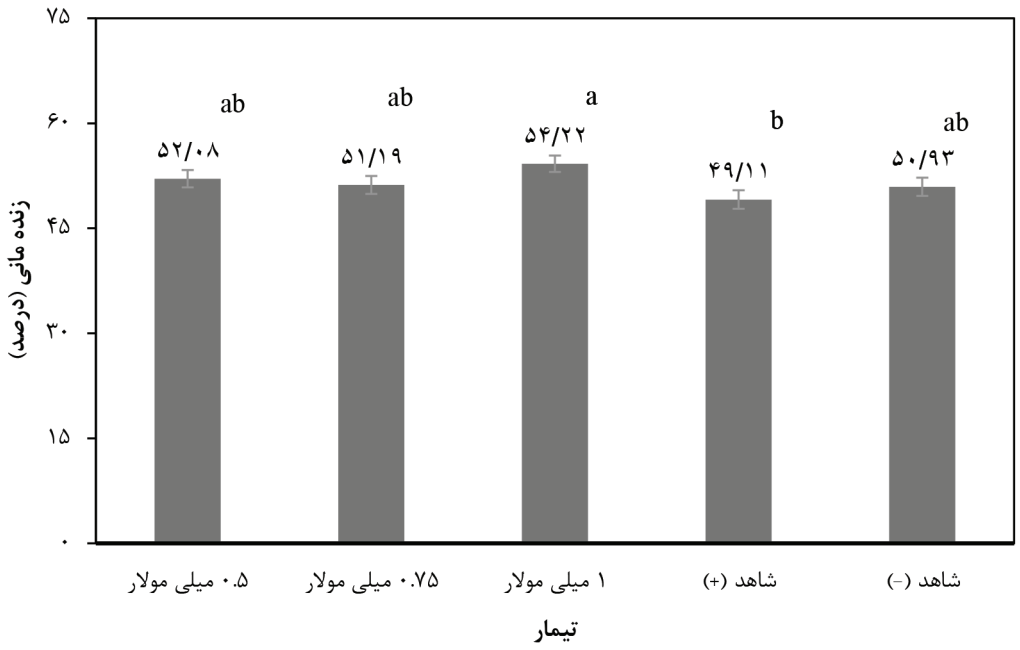
نتایج

جنبایی اسپرم تیمارهای مختلف پس از فرایند یخزدن در این پژوهش در جدول ۱ گزارش شده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که افزودن سطوح مختلف از ویتامین E به رقیق‌کننده اسپرم بز آلپاین سبب بهبود معنی-دار جنبایی کل نسبت به گروه شاهد مثبت و منفی شده است (P<۰/۰۵). افزودن یک میلی‌مولار ویتامین E، سبب بهبود معنی‌داری در جنبایی پیش‌رونده نسبت به سایر گروه‌های تیماری شده است (P<۰/۰۵). همچنین افزودن یک میلی‌مولار ویتامین E سبب بهبود شتاب اسپرم در خط مستقیم (VSL)، شتاب واقعی اسپرم در مسیر طی شده (VCL) و بیشینه‌ی دامنه حرکت‌های جانبی اسپرم (ALH) نسبت به سایر گروه‌های تیماری شده است (P<۰/۰۵). اما افزودن یک میلی‌مولار ویتامین E سبب بهبود میانگین شتاب در مسیر مستقیم (VAP)، فراسنجه خطی بودن حرکت اسپرم (LIN) و فراسنجه معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم (STR) نسبت به گروه‌های شاهد مثبت یا منفی نشده است (P>۰/۰۵). با این وجود، افزودن ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار ویتامین E سبب کاهش VAP و STR نسبت به گروه یک میلی‌مولار و گروه‌های شاهد مثبت و منفی شده است (P<۰/۰۵). بین افزودن ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار

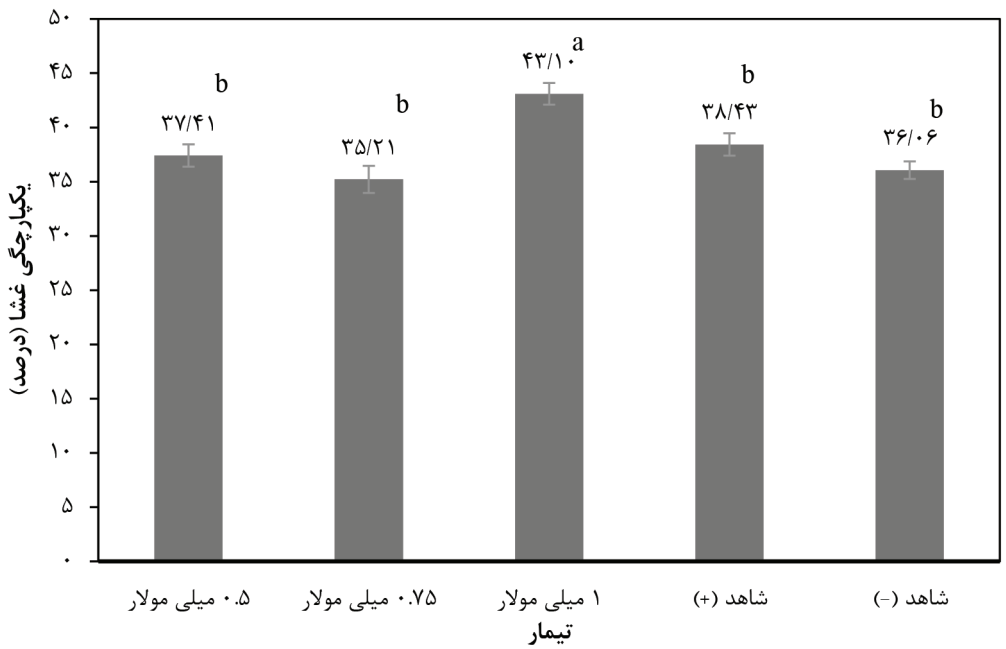
جدول ۱- تاثیر سطوح مختلف آنتی‌اکسیدانی ویتامین E بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم منجمد یخ‌گشایی شده و غلظت MDA.

تیمار/فراسنجه	۰/۵ میلی‌مولار	۰/۷۵ میلی‌مولار	۱ میلی‌مولار	شاهد (+)	شاهد (-)
جنبایی کل (٪)	۴۶/۹۲ ± ۱/۴۱^{b}	۴۷/۶۰ ± ۰/۴۸b	۵۱/۴۱ ± ۰/۸۳a	۴۰/۶۸ ± ۰/۸۳d	۴۳/۶۸ ± ۰/۳۵c
جنبایی پیش‌رونده (٪)	۳۲/۸۷ ± ۰/۶۸^{bc}	۳۴/۴۱ ± ۰/۸۸b	۳۹/۷۹ ± ۰/۶۰a	۳۲/۶۷ ± ۰/۷۲bc	۳۱/۳۲ ± ۰/۳۴c
VSL (µm/s)	۳۸/۱۰ ± ۱/۱۶^{d}	۴۱/۳۶ ± ۰/۴۹^{c}	۵۱/۸۸ ± ۰/۷۲^{a}	۴۳/۲۹ ± ۰/۵۸^{c}	۴۷/۷۱ ± ۱/۰۸^{b}
VCL (µm/s)	۱۰۹/۴۱ ± ۱/۳۴^{c}	۱۰۶/۹۴ ± ۱/۲۲^{c}	۱۲۳/۳۱ ± ۱/۲۷^{a}	۱۰۱/۵۷ ± ۱/۳۱^{d}	۱۱۴/۸۳ ± ۱/۸۲^{b}
VAP (µm/s)	۵۰ ± ۰/۸۹^{d}	۴۷/۸۰ ± ۰/۸۰^{d}	۶۸/۱۴ ± ۰/۶۳^{a}	۵۸/۲۶ ± ۱/۰۷^{c}	۶۳/۷۸ ± ۱/۲۸^{b}
LIN (٪)	۳۵/۵۰ ± ۰/۸۸^{d}	۳۷/۸۳± ۰/۸۳^{c}	۴۲/۵ ± ۰/۶۳^{a}	۴۳/۱۶ ± ۰/۷۹^{a}	۴۰/۱۶ ± ۰/۵۴^{b}
ALH (µm)	۵/۴۰± ۰/۲۰^{b}	۵/۸۵ ± ۰/۱۹^{b}	۶/۶۱ ± ۰/۱۴^{a}	۵/۵۱ ± ۰/۲۹^{b}	۵/۷۰ ± ۰/۳۰^{b}
STR (٪)	۵۳/۱۶ ± ۰/۹۷^{b}	۵۰/۶۶ ± ۱/۲۰^{c}	۶۰/۱۶ ± ۲/۱۳^{a}	۶۱/۳۳ ± ۰/۹۷^{a}	۵۹/۶۶ ± ۲/۱۳^{a}
BCF (Hz)	۱۷/۸۸ ± ۰/۰۸^{c}	۱۸/۹۰ ± ۰/۱۸^{b}	۲۱/۵۲ ± ۰/۱۸^{a}	۱۶/۹۴ ± ۰/۵۳^{d}	۱۷/۴۷ ± ۰/۲۲^{cd}
غلظت MDA (nmol/ml)	۱/۳۶ ± ۰/۰۵	۱/۳۵ ± ۰/۰۳	۱/۴۱ ± ۰/۰۳	۱/۴۲ ± ۰/۰۲	۱/۳۴ ± ۰/۰۱

حروف غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی‌دار میان تیمارها است (P<۰/۰۵).



شکل ۱- تاثیر سطوح مختلف ویتامین E بر زنده‌مانی اسپرم منجمد- یخ‌گشایی شده (میانگین± خطای استاندارد).



شکل ۲ - تاثیر سطوح مختلف ویتامین E بر فعالیت غشاء اسپرم پس از فرایند انجماد- یخ‌گشایی (میانگین± خطای استاندارد).

ویتامین E و گروه‌های شاهد مثبت و منفی تفاوت آماری معنی‌داری از لحاظ بیشینه‌ی دامنه حرکت‌های جانبی اسپرم (ALH) مشاهده نشد (P>۰/۰۵). با این وجود افزودن ۰/۷۵ و یک میلی‌مولار ویتامین E تفاوت آماری معنی‌داری را از لحاظ فراسنجه حرکت‌های جانبی اسپرم (BCF) با گروه‌های ۰/۵ میلی‌مولار ویتامین E، شاهد مثبت و منفی نشان داد (P<۰/۰۵). اما بین گروه‌های تیماری ۰/۵ میلی‌مولار و شاهد منفی تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). از نظر غلظت MDA، بین گروه‌های تیماری ذکر شده تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

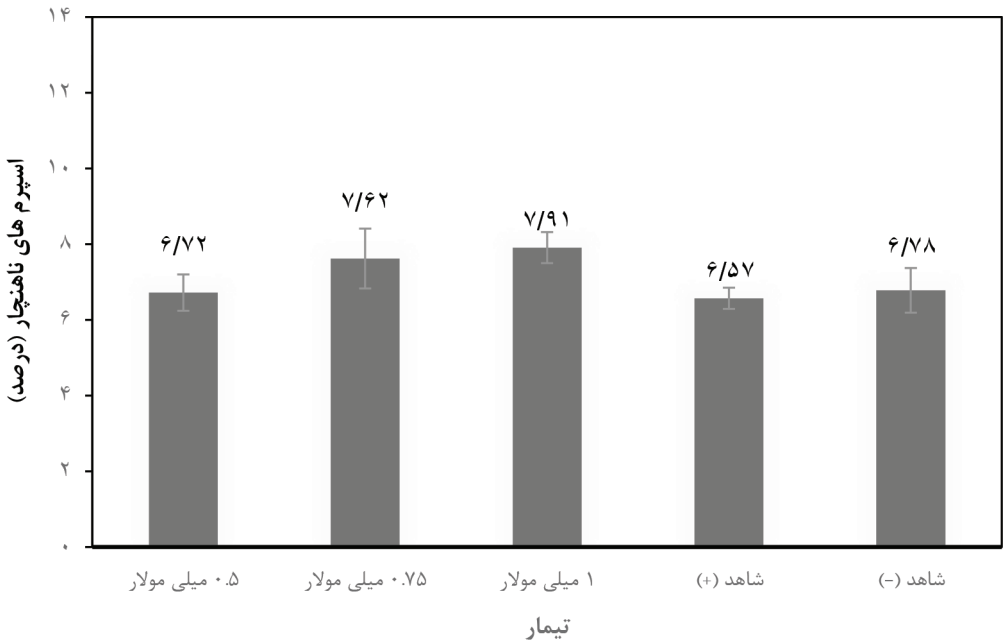
نتایج مربوط به زنده‌مانی اسپرم‌های تیمار شده با ویتامین E نشان می‌دهند که افزودن یک میلی‌مولار ویتامین E به رقیق‌کننده سبب بهبود معنی‌دار زنده‌مانی اسپرم بزهای آلپاین نسبت به گروه شاهد مثبت شده است (P<۰/۰۵). اما گروه‌های تیماری ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار ویتامین E، تفاوت آماری معنی‌داری را با گروه شاهد مثبت و منفی نشان ندادند (P>۰/۰۵). همچنین یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که افزودن یک میلی‌مولار ویتامین E به رقیق‌کننده اسپرم سبب بهبود فعالیت غشا نسبت به سایر گروه‌های تیماری شده است (P<۰/۰۵)، در حالی‌که گروه‌های تیماری ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار ویتامین E تفاوت معنی‌داری را با گروه‌های شاهد ایجاد نکرد (P>۰/۰۵). افزودن سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان ویتامین E به رقیق‌کننده اسپرم بزهای آلپاین تفاوت آماری معنی‌داری را در ریخت‌شناسی و کاهش میزان اسپرم‌های ناهنجار نسبت به گروه‌های شاهد نشان نداد (P>۰/۰۵).

بحث

نتایج مطالعه ما نشان داد که افزودن یک میلی‌مولار از آنتی‌اکسیدان ویتامین E سبب بهبود فراسنجه‌های جنبایی و زنده‌مانی گردیده است. تنش اکسیداتیو مهم‌ترین آسیب وارده به اسپرم در طی فرایند انجماد-یخ‌گشایی می‌باشد. آسیب‌های وارد شده به اسپرم طی فرایند یخزدن و یخ‌گشایی اصلی‌ترین دلیل کاهش باروری ناشی از تلقیح اسپرم یخزده نسبت به اسپرم تازه می‌باشد.

در اسپرم، با توجه به اینکه غشای داخلی میتوکندری حاوی سیتوکروم C است، در صورت تخریب غشای میتوکندری توسط ROS، این سیتوکروم از میتوکندری رهاشده و باعث فعال‌سازی کاسپازها و القای مرگ برنامه‌ریزی سلول (آپوپتوز) می‌شود، همچنین آپوپتوز می‌تواند آسیب‌های DNA ایجادشده توسط ROS را تشدید کند (۱۴). تنش‌های حرارتی و اکسیداتیو ناشی از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی در اسپرم، حالت‌های مختلفی از آپوپتوز را در میتوکندری ایجاد می‌کند و این حالت‌های مختلف آپوپتوز منجر به تولید پروتئین‌ها (سیتوکروم C، وفاکتور القاکننده آپوپتوز) و آنزیم‌های آپوپتوتیک (کاسپازهای آپوپتوژنیک مثل پروتئازهای خاص سیستئیل آسپارتات) می‌شود که منجر به کاهش تولید ATP می‌شود (۷).

اولین و شناخته شده‌ترین راهکار برای مقابله با اثرات منفی رادیکال‌های آزاد، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در رقیق‌کننده‌هاست. در شرایط



شکل ۳- تاثیر سطوح مختلف ویتامین E بر ناهنجاری اسپرم پس از فرایند انجمد- یخ‌گشایی (میانگین± خطای استاندارد).

فیزیولوژیکی سیستم‌های درونی و بیرونی (آنزیمی و غیرآنزیمی) مسئول مقابله با اثرات منفی رادیکال‌های آزاد هستند. حفظ و نگهداری از فسفولیپیدهای غشای اسپرم و حساسیت آن‌ها به پراکسیداسیون بستگی زیادی به میزان آنتی‌اکسیدان موجود در محیط دارد، که خطر آسیب به اسپرم‌ها را کاهش می‌دهد و شانس زنده‌مانی را در طول ذخیره‌سازی افزایش می‌دهد (۱۸).

غشای پلاسمایی اسپرم نشخوارکنندگان حاوی مقادیر زیاد اسیدهای چرب غیراشباع است که این اسیدهای چرب سبب حساسیت اسپرم به پراکسیداسیون لیپیدها شده و پراکسیداسیون لیپیدها منجر به اختلال عملکرد اسپرم از طریق تنش اکسیداتیو و تولید مواردی مثل MDA می‌شود (۱). در همین راستا افزایش تولید رادیکال‌های آزاد سبب اکسیدشدن اسیدهای چرب غیراشباع شده و جنبایی و زنده‌مانی اسپرم را کاهش می‌دهد. فرایند انجماد و یخ‌گشایی سبب القای تولید رادیکال‌های آزاد شده و از طرف دیگر برخی از آنزیم‌های از بین برنده رادیکال‌های آزاد را غیرفعال می‌کند (۱۵). در این بین افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها سبب کاهش اثرات اکسیدانی شده و در پایان تنش اکسیداتیو را تا اندازه‌ای مهار می‌کند. اما موضوع مهمی که اینجا مطرح می‌شود این است که هدف از افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها حذف کامل رادیکال‌های آزاد نیست، بلکه هدف اصلی نگه‌داشتن غلظت‌های رادیکال آزاد در یک حد فیزیولوژیکی ثابت است (۱۰). در مطالعه حاضر تیمارهای آنتی‌اکسیدانی نتوانستند سبب کاهش غلظت MDA شوند، که هماهنگ با یافته‌های بوکاک و همکاران ۲۰۰۸ است که تیول‌ها نتوانستند تاثیر سودمندی بر غلظت MDA داشته باشند (۶). اما سلمانی همکاران (۲۰۱۳)، آلوارز و استوری (۱۹۸۳) و مایکل و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند سبب کاهش غلظت MDA شود که این تضاد می‌تواند ناشی از غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدانی یا رقیق‌کننده و گونه‌های متفاوت حیوانی باشد (۱، ۱۰ و ۱۶).

در پژوهش حاضر، مقادیر مختلف ویتامین E تأثیر سودمندی بر فراسنجه‌های حرکتی و زنده‌مانی اسپرم بز آلپاین داشته که این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق توحیدی و پارکس (۲۰۱۲)، نصیری و همکاران(۲۰۱۲) و بهشتی و همکاران (۲۰۱۱) که نشان داده‌اند مکمل کردن رقیق‌کننده منی با آلفا توکوفرول طی انجماد اسپرم، منجر به بهبود قابلیت انجمادپذیری آن شده است، مطابقت دارد (۱۲،۵ و ۱۹). در تحقیقی آنجل و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی تاثیر آنتی اکسیدان‌های مختلف با سطوح متفاوت برای انجماد اسپرم بز الپاین پرداختند و ویتامین E در سطح ۱ میلی‌مول نسبت به شاهد باعث افزایش تحرک و زنده مانی اسپرم‌ها شد در حالی که سطح ۱ میلی‌مول ویتامین E باعث افزایش غیر معنی‌دار درصد اسپرم‌های غیرمعمولی می‌شود که با پژوهش حاضر که ۱ میلی‌مول ویتامین E سبب بهبود فراسنجه‌های جنبایی اسپرم می‌شود مطابقت دارد (۲).

آلفا توکوفرول، به‌عنوان یک عامل محافظ پراکسیداسیون اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه، عمل می‌کند. اساس سازوکار عمل ویتامین E روی پاک‌سازی رادیکال‌های پروکسیل است که منجر به ایجاد یک ترکیب غیررادیکالی و رادیکال توکوفروکسیل پایدار می‌شود (۹).

نتیجه‌گیری

افزودن ۱ میلی‌مولار ویتامین E همراه با ۵ درصد گلیسرول در رقیق‌کننده بر پایه تریس، سبب بهبود معنی‌دار کیفیت اسپرم بز آلپاین پس از انجماد-یخ‌گشایی گردید. در نتیجه می‌توان از ویتامین E به‌عنوان راهکاری برای حفظ قابلیت باروری اسپرم بز برای اهداف مدیریت تولیدمثلی استفاده نمود.

منابع مورد استفاده

1. Alvarez, J.G. and Storey, B.T., 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete research*, 23:77-90.

2. Anghel, A., Zamfirescu, S., Dragomir, C., Nadolu, D., Elena, S. and Florica, B., 2010. The effects of antioxidants on the cytological parameters of cryopreserved buck semen. *Romanian biotechnological letters*, 15:26-32.

3. Armstrong, J.S., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W.J. and Sikka, S.C., 1999. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 26:869-880.

4. Backman, T., Bruemmer, J.E., Graham, J.K. and Squires, E.L., 2004. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *Journal of animal science*, 82:690-694.

5. Beheshti, R., Asadi, A. and Maheri-Sis, N., 2011. The effect of vitamin E on post-thawed buffalo bull sperm parameters. *J American Sci*, 7:227-31.

6. Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sarıözkan, S., Ulutaş, P.A., Çoyan, K., Başpınar, N. and Özkalp, B., 2009. Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Research in veterinary science*, 87:468-472.

7. Del Valle, I., Gómez-Durán, A., Holt, W.V., Muiño-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J.A., 2012. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of andrology*, 33:717-725.

8. Dominguez, M.P., Falcinelli, A., Hozbor, F., Sánchez, E., Cesari, A. and Alberio, R.H., 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, 69:564-573.

9. Liebler, D.C., 1993. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Critical reviews in toxicology*, 23:147-169.

10. Michael, A., Alexopoulos, C., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Saratsis, P. and Boscos, C., 2007. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-

thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 68:204-212.
11. Munsi, M.N., Bhuiyan, M.M.U., Majumder, S. and Alam, M.G.S., 2007. Effects of exogenous glutathione on the quality of chilled bull semen. *Reproduction in domestic animals*, 42:358-362.
12. Nasiri, A.H., Towhidi, A. and Zeinoaldini, S., 2012. Combined effect of DHA and α-tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. *Andrologia*, 44:550-555.
13. Parks, J.E. and Graham, J.K., 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38:209-222.
14. Pena, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M. and Martinez, H.R., 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal reproduction science*, 78:85-98.
15. Rossi, T., Mazzilli, F., Delfino, M. and Dondero, F., 2001. Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. *Cell and tissue banking*, 2:9-13.
16. Salmani, H., Nabi, M.M., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, M.B., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Towhidi, A., Shahneh, A.Z. and Zhandi, M., 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small ruminant research*, 112:123-127.
17. Sharma, R.K. and Agarwal, A., 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48:835-850.
18. Strzezek, J., 2002. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reproductive biology*, 2:243-266.
19. Towhidi, A. and Parks, J.E., 2012. Effect of n-3 fatty acids and α-tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(10), pp.1051-1056.