دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

تاثیر تغذیه ویتامین‌های C و E بر برخی ویژگی‌های اسپرم خروس ورامینی در شرایط سرد

امیرعباس دارستانی[۱]، کاظم کریمی[۲]، کامران زندی[۳] و مهدی خدایی مطلق[۴]

۱ و ۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی علوم دامی و عضو هیات علمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین
۲- عضو هئیت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا (نویسنده مسوول: karimikazem@gmail.com)
۴- دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اراک
تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۱۱
صفحه: ۶۶ تا ۷۵

چکیده

سی و شش قطعه خروس به ۱۲ گروه ۳ تایی شامل ٤ تیمار، هر تیمار ۳ تکرار و در هر تکرار ۳ خروس تقسیم شدند. تیمارها شامل: ۱) جیره شاهد بدون افزودن مکمل ویتامین C و E ۲) جیره C دارای ۱۰۰۰ mg/kg ویتامین C، ۳) جیره E دارای ۱۰۰۰ mg/kg ویتامین E، ٤) جیره C+E دارای ویتامین C و ویتامین E. خروس‌ها به‌مدت ۲۸ روز با جیره تغذیه شدند. اسپرم‌گیری، با روش مالش -شکمی انجام شد و منی با استفاده از محلول بافرتریس رقیق شد و در دمای 5^0C نگه‌داری شدند. و ویژگی‌های غلظت، جنبایی کل، جنبایی پیشرونده و زنده‌مانی، در صفر، ٦، ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از اسپرم‌گیری اندازه‌گیری شدند. تجزیه و تحلیل داده‌های این پژوهش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که ویتامین E باعث افزایش تحرک، افزایش اسپرم زنده، افزایش اسپرم پیش‌رونده، در تمام زمان‌ها همچنین افزایش حجم و غلظت شد. نتایج تاثیر ویتامین C+E کاملاً مشابهٔ نتایج ویتامین E بود. به‌نظر می‌رسد، در این پژوهش، ویتامین E در جیره غذایی در بهبود وضعیت فراسنجه‌های اسپرم خروس بومی ورامین، در شرایط سرد، مؤثرتر از دیگر گروه‌های آزمایشی بود. بنابراین احتمالاً تجویز آن می‌تواند در جیره، برای بهبود وضعیت اسپرم در طیور، مناسب باشد.

واژه‌های کلیدی: ویتامین C، ویتامین E، اسپرم، منی، خروس بومی ورامین

مقدمه

یکی از چالش‌های اصلی در صنعت پرورش طیور، افزایش تعداد تولید تخم‌های نطفه‌دار و قابل تبدیل به جوجه‌های گوشتی می‌باشد. هرچند مرغ و خروس در دست‌یابی به نرخ باروری مناسب در گله نقش مهمی دارند، اما اثر خروس بیشتر از مرغ است، چرا که تعداد خروس‌ها نسبت به مرغ‌ها کمتر می‌باشد (۳۰). اسپرم خروس از تنش اکسیداتیو تاثیرپذیر بوده و موجب ناباروری در آن می‌شود (۲۴). پراکسیداسیون لیپید در غشا اسپرم، سبب افت تحرک و آسیب به DNA و باروری غیرقابل برگشت می‌شود (۳۱). معمولاً آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های متعدد موجود در پلاسمای منی، اسپرم خروس را از اکسیداسیون حفظ می‌کنند (۲۳). نگهداری اسپرم‌های انزالی از خروس در شرایط دمای یخچال دارای اهمیت بالایی است. اثر محافظتی آنتی‌اکسیدان‌ها، عامل اصلی نگهداری تحرک، یکپارچگی غشا، زنده‌مانی و قدرت انجمادپذیری اسپرم می‌باشد. نگهداری اسپرم رقیق‌شده خروس، بیش از ۶ ساعت، موجب کاهش نرخ باروری می‌شود. این کاهش باروری پس از ۲۴ ساعت به حداکثر میزان خود می‌رسد (۱۲). افزودن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی (۱۶ و ۳۴) در این فرایند بسیار مورد توجه می‌باشد، ویتامین E و C در شرایط مختلف در این مبحث بسیار پرکاربرد می‌باشد.

عملکرد و فعالیت اصلی ویتامین E محافظت از زنجیره اسیدهای چرب غیراشباع در غشاء سلول است. پراکسیداسیون لیپیدهای این لایه سبب اختلال در عملکرد و قابلیت نفوذپذیری غشاء گردیده، در نتیجه سلول تخریب‌شده و می‌میرد. سلول‌هایی که تنفس هوازی دارند مواد و آنزیم‌های لازم جهت واکنش‌های اکسیداتیو را دارا هستند، ولی با این وجود درصد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در اسپرم نسبتاً کم است و در نتیجه این سلول‌ها مستعد واکنش‌های اکسیداتیو می‌باشند استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در خروس‌ها در فاز پس از پیک تولید می‌تواند به‌عنوان ابزار تغذیه‌ای در بهتر شدن باروری پرنده موثر باشند (۴۲). مقبلی و همکاران (۲۵) نشان دادند که ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین E سبب اثرات مثبت در طی انجمادپذیری اسپرم براساس میزان غلظت می‌شود (۲۵). افزودن ویتامین E به همراه سلنیوم سبب بهبود کیفیت اسپرم در شرایط نگهداری مایع شد (۲۷).

همچنین ویتامین C مادامی که در محیط رادیکال‌های پراکسید قرار می‌گیرد، یک آنتی‌اکسیدان قوی است، اما برای انواع رادیکال‌های اکسیژن در غشاء لیپیدی ضعیف عمل می‌کند (۸). از طرف دیگر زیاد بودن اسید اسکوربیک مایع منی تا ده برابر سرم و توانائی آنتی‌اکسیدانی این ویتامین تأکیدی بر نقش آن در تولیدمثل به‌ویژه در جنس نر می‌باشد (۲۲).

مطالعات نشان داده‌اند که ویتامین C مایع منی، رابطه مثبت با مورفولوژی نرمال اسپرم داشته و مؤید نقش حفاظتی این ویتامین در اپیدیدیم است (۳۹). مصرف روزانه ویتامین C به مقدار ۲۰۰mg و ۱۰۰۰mg سبب افزایش مقدار ویتامین C در مایع اسپرم از ۵/۶ mg/dl به ۱۳/۱ mg/dl و ۱۶/۱ گردیده است. جالب است که ویتامین C به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند اما در غلظت زیاد فعال‌کننده سلول

www.SID.ir

Archive of SID

است (۶). از طرفی سایر مطالعات نشان داده‌اند که مصرف همزمان ویتامین‌های C (۳۵۰mg/d) و E (۲۵۰mg/d) در حیوان زنده از آسیب وارده به DNA اسپرم جلوگیری نمی‌کند (۹).

مطالعاتی برای ذخیره منی به‌مدت ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است. گزارش‌ها نشان می‌دهند که نگهداری اسپرم طیور در محیط یخچال (۵°C) برای مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت سبب کاهش باروری شده است (۴۰). آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی مانند ویتامین E و آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب مانند ویتامین C در کاهش رادیکال‌های آزاد نقش موثری دارند (۷).

با توجه به ضعف مایع منی در خصوص دفاع آنتی‌اکسیدانی این مطالعه با هدف بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی ویتامین‌های C و E در جیره غذایی بر ویژگی‌های اسپرم خروس‌های بومی ورامین صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

خروس و جایگاه نگهداری

سی و شش قطعه خروس بالغ بومی ورامین با سن ۳۴ هفته، در ۱۲ پن (۳ قطعه در هر پن) در یک سالن نگهداری شدند. برای هر تیمار ۳ پن در نظر گرفته شد. طی دوره نگهداری شرایط دمایی (۲±۲۳ درجهٔ سانتی‌گراد)، رطوبت (۵±۵۵ درصد)، و نور (هشت ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی)، برای تمام تیمارها به‌طور یکسان حفظ گردید. دو قطعه مرغ نیز به‌طور جدا و صرفاً برای تحریک جنسی خروس‌ها در سالن نگهداری شدند.

از ویتامین C، ساخت شرکت رازک و با نام آسکورویت[1] ® ۱۵٪ و ویتامین E ساخت شرکت به‌رشد با نام پرمیکس غنی‌شده ویتامین E استفاده شد. جهت ارزیابی منی از میکروسکوپ فاز کنتراست (NIKON–YS100)، ساخت کشور ژاپن استفاده شد. ائوزینB، نگروزین، نمک‌های مورد استفاده و دیگر مواد از شرکت مرک تهیه شدند.

جیره‌ها و تیمارها

جیره مورد استفاده در این پژوهش جیره متداول در مرغداری مرغ مادر بومی ورامین (براساس احتیاجات غذایی طیور) بود. آزمایشات مربوطه، بعد از چهار هفته تغذیه با جیره مخصوص خودشان، آغاز شد. با توجه به اینکه طول دوره اسپرماتوژنز در خروس حدود ۱۸ تا ۲۰ روز می‌باشد، برای اطمینان بیشتر، به‌مدت ۲۸ روز با جیره مخصوص خودشان تغذیه شدند؛ اما جیره مخصوص هر تیمار تا انتهای مدت پژوهش نیز ادامه داشت. در طول دوره پژوهش، خروس‌ها و مرغ‌ها، دسترسی آزاد به آب داشتند و تغذیهٔ هر یک از خروس‌ها و مرغ‌ها به مقدار ۵±۱۱۵ گرم از جیره، به‌صورت روزانه انجام پذیرفت. شرایط پرورش برای تمام خروس‌ها یکسان بود. گروه‌های آزمایشی شامل: ۱) گروه شاهد؛ بدون افزودن مکمل ویتامینی در جیره، ۲) گروه ویتامین C؛ با افزودن mg/kg ۱۰۰۰ مکمل ویتامین C در جیره، ۳) گروه ویتامین E؛ با افزودن mg/kg ۱۰۰۰ مکمل ویتامین E در جیره و ۴) گروه ترکیب ویتامین‌های C و E؛ با افزودن mg/kg ۱۰۰۰ از هر یک از مکمل‌های حاوی ویتامین‌های C و E در جیره بودند.

جدول ۱- اجزای خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره پایه مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Ingredients and composition of basal diets

اجزای جیره پایه	مقدار (درصد)
سبوس	۹/۲۳۹
سویا	۱۴/۹۷
ذرت	۶۷/۱۱
چیپس(سیب‌زمینی)	۷/۲۴
مکمل معدنی	۰/۲۵
مکمل ویتامینه*	۰/۰۷
نمک	۰/۴۳۷
ترکیبات شیمیایی	
انرژی متابولیسمی (Kcal/kg)	۲۷۰۰
پروتئین (٪)	۱۵
متیونین+ سیستئین (٪)	۰/۶۵
لیزین (٪)	۰/۷۰
کلسیم (٪)	۱/۱
فسفر قابل دسترس (٪)	۰/۴۵

*: مکمل ویتامینه به گونه‌ای تهیه شد که برای هر تیمار به مقدار لازم (۱۰۰۰ mg/kg) دارای ویتامین‌های C، E و یا هر دو باشد و برای جیره شاهد مکمل ویتامینه بدون دو ویتامین فوق افزوده شد.

1- Ascorvit ® %۱۵

www.SID.ir

Archive of SID

اسپرم‌گیری، فراسنجه‌ها و زمان‌های ارزیابی منی

طی یک دوره‌ی سه هفته‌ای، خروس‌ها به اسپرم‌گیری، عادت داده شدند، اسپرم‌گیری اصلی از خروس‌ها به‌مدت دو هفته و هر هفته دو بار با روش مالشی باروس و کوئین (۱۹۳۷) انجام گرفت. اسپرم‌گیری و جمع‌آوری منی هر یک از خروس‌ها، در یک لولهٔ شیشه‌ای کوچک که کاملاً با فویل آلومینیوم پوشیده شده بود، انجام پذیرفت. اسپرم اخذ شده از ۳ قطعه خروس هر تکرار با هم مخلوط شد و فراسنجه‌های منی: حجم، غلظت، درصد تحرک، درصد پیش‌روندگی، درصد اسپرم‌های زنده، در زمان‌های (ساعت‌های) صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، در آزمایشگاه گروه علوم دامی مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین حجم انزال و رقیق‌سازی منی

حجم و غلظت منی در هر نوبت بلافاصله پس از جمع‌آوری اندازه‌گیری شد. به‌دلیل مدرج بودن لوله‌های جمع‌آوری‌کنندهٔ، حجم مایع منی به‌راحتی قابل اندازه‌گیری بود. ولی برای دقت بیشتر، حجم آن با سرنگ توبرکولین اندازه‌گیری شد. سپس نمونه منی با رقیق‌کننده بافر تریس رقیق گردید. مواد تشکیل‌دهنده: بافر تریس (سیترات سدیم)، فسفات (هیدرکسی‌متیل‌آمینومتان) (۲۶/۶ گرم)، اسید سیتریک (۱۴/۷ گرم)، فروکتوز (۶/۳ گرم)، آب دو بار تقطیر (۹۵۲/۴ میلی‌لیتر)، مقدار کلی محلول (۱۰۰۰ میلی‌لیتر)- (pH = ۷/۴)؛ و در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد (دمای یخچال) نگه‌داری شدند تا در پنج فاصله زمانی فوق‌الذکر ارزیابی شوند.

تعیین غلظت

غلظت اسپرم در نمونه‌ی منی به نسبت ۱ به ۲۰۰ رقیق گردید و سپس با روش هیموسیتومتری اندازه‌گیری شد. سپس یک قطره از مایع منی رقیق‌شده در حدفاصل لام و لامل قرار داده شد. بعد از گذشت چند دقیقه شمارش اسپرماتوزوئیدها انجام گرفت. برای شمارش ابتدا اسپرم‌ها را با بزرگنمایی کم (× ۱۰۰) مشاهده، سپس با بزرگنمایی زیاد (× ۴۰۰) شمارش شدند. اسپرماتوزوئیدها در ۵ مربع (۴ مربع در گوشه‌ها و یک مربع در وسط) از ۲۵ مربع لام هماسیتومتر شمارش شدند. سپس برای به‌دست آوردن تعداد اسپرم در ۰/۱ میلی‌متر مکعب، تعداد اسپرم شمارش‌شده، در ۵ مربع ضرب شد. تعداد کل اسپرم در هر میلی‌لیتر طبق فرمول زیر محاسبه شد.

تعداد کل اسپرم‌ها در هر میلی‌لیتر = تعداد اسپرم در ۰/۱ میلی‌متر مکعب × ۱۰ × میزان رقیق کردن × ۱۰۰۰

تعیین تحرک اسپرم

در این پژوهش به منظور بررسی و تعیین درصد تحرک و حرکت پیش‌رونده اسپرم‌ها، مقدار کمی از نمونه رقیق‌شده به درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری (تیوپ اپندروف) ریخته شد. سپس با استفاده از سمپلر ۷ تا ۱۰ میکرولیتر یک قطره از نمونه منی روی یک لام تمیز و از قبل گرم شده (توسط انکوباتور) قرار داده و بر روی آن یک لامل تمیز گرم گذاشته شد (دمای لام، لامل و اسپرم برابر۳۵ درجه سانتی‌گراد بود). با استفاده از بزرگ‌نمایی[1] (× ۴۰) و (× ۱۰۰) حرکت پیش‌رونده در مقیاس صفر تا ۱۰۰ درصد با استفاده از میکروسکوپ نوری-فازکنتراست[2] در چند ناحیه به‌طور تصادفی از لام گزینش و بررسی شد، درصد اسپرم‌هایی که حرکت پیش‌رونده داشتند، به‌صورت چشمی ارزیابی و اندازه‌گیری شدند. همچنین با استفاده از بزرگ نمایی (× ۱۰) و (× ۴۰)، جنبایی اسپرم در مقیاس صفر تا ۱۰۰ درصد ارزیابی شدند. (۳۸)

تعیین زنده‌مانی اسپرم

برای تعیین و بررسی درصد قابلیت حیات[3] اسپرم (اسپرم‌های زنده و مرده) از محلول ائوزینB (۱ گرم)، نگروزین (۵ گرم)، محلول ۳٪ تری سدیم سیترات (۹۴ سی‌سی)، استفاده شد. ابتدا یک قطره از منی رقیق‌شده در یکی از دو انتهای گرم شده لام قرار داده، یک قطره از رنگ بر روی منی رقیق‌شده ریخته شد و با سرسمپلر به آرامی مخلوط گردید. بعد از مدت یک دقیقه با کشیدن لبه لام دیگری در دو جهت مخالف گسترش نازکی از آن تهیه و به‌مدت ۵ دقیقه لام در مجاورت با یک هیتر برقی خشک شد. در مرحله بعد با استفاده از بزرگ‌نمایی (۴۰×) و (۱۰۰×) میکروسکوپ نوری-فازکنتراست، ارزیابی و شمارش شدند. به‌منظور بالا بردن دقت آزمایش تا ۲۰۰ اسپرم شمارش شدند. اسپرم‌های زنده به‌دلیل داشتن غشاهای سالم در مقایسه با اسپرم‌های مرده رنگی را به خود جذب نکرده و به رنگ روشن (شفاف، سفید) و اسپرم‌های مرده به رنگ صورتی مشاهده شدند (۳۶).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

بدین منظور برای انجام محاسبات آماری پژوهش، داده‌ها پس از جمع‌آوری در نرم‌افزار کامپیوتری Excel دسته‌بندی شدند؛ سپس با استفاده از رویهٔ GLM نرم‌افزار SAS مورد آنالیز و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین صفاتی که در آزمون آنالیز واریانس معنی‌دار شده بودند، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد بهره گرفته شد.

نتایج بحث

حجم و غلظت منی

ارزیابی این دو ویژگی فقط در زمان اسپرم‌گیری (زمان صفر) انجام پذیرفت. نتایج نشان دادند که افزودن ویتامین‌های C و E و یا مخلوط آنها، حجم منی را نسبت به شاهد افزایش داد و این افزایش در ویتامین E نسبت به C نیز مشاهده می‌شود به گونه‌ای که کم‌ترین میزان حجم منی مربوط به گروه شاهد (۰/۰۵±۰/۴۸ سی سی) و بیش‌ترین میزان حجم منی مربوط به تیمار CE و E می‌باشد و گروه C در حد وسط قرار دارد. افزودن ۱ g/kg ویتامین E به‌تنهایی به جیره غذایی خروس‌ها، غلظت اسپرم در منی را نسبت به گروه شاهد و دیگر تیمارها افزایش داد. افزودن مخلوط ویتامینی در رده بعدی و پس از آن ویتامین C قرار داشت که غلظت اسپرم را از نظر عددی نسبت به شاهد افزایش داد (جدول ۲).

1- Magnification 2- Phase Contrast Microscope 3- Viability

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- تاثیر جیره‌های دارای مقادیر زیاد ویتامین‌های C و E بر حجم منی و غلظت اسپرم خروس پس از اسپرم گیری (ساعت صفر)
Table 2. Effects of diets contained high amounts of Vitamin C and E on volum and concentration of the rooster sperm immediately after semen collection (Time 0)

مقدار مکمل در جیره (mg/kg)		فراسنجه	
ویتامین C	ویتامین E	حجم منی (میلی لیتر)	غلظت اسپرم ($n\times10^9/ml$)
۰	۰	۰/۴۸^{c}±۰/۰۵۱*	۳/۶۵^{d}±۰/۱۲
۱۰۰۰	۰	۰/۵۹^{b}±۰/۰۲۶	۴/۳۹^{c}±۰/۱۵
۰	۱۰۰۰	۰/۶۶^{a}±۰/۰۳۲	۴/۸۵^{a}±۰/۳۰
۱۰۰۰	۱۰۰۰	۰/۶۸^{a}±۰/۰۴۰	۴/۶۲^{b}±۰/۱۸

*SEM

abcd : میانگین‌های در هر ستون با حروف کوچک نامشابه به‌طور معنی‌داری با یکدیگر تفاوت دارند ($p<۰/۰۵$)

بر طبق پژوهش‌های قبلی ویتامین‌های C و E در آب انار نیز به میزان قابل توجهی وجود دارند (۳۵). در افراد سیگاری مصرف روزانه ۲۰۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین E و C (به ترتیب) موجب افزایش تعداد سلول‌های اسپرم گردیده است (۹). در شرایط تنش افزایش دوز ویتامین C در جیره تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره اثر مفید بر عملکرد پرنده دارد (۲۸). ویتامین C علاوه بر اینکه یک آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمیک می‌باشد بعنوان یک کوفاکتور هم مورد توجه است بصورتیکه در داخل بدن کوفاکتور هشت آنزیم می‌باشد (Hu et al., 2010 و در فعالیت‌های بیوشیمیایی تولیدمثل نقش مؤثری دارد.

تحرک اسپرم (تحرک کل و پیشرونده)

تحرک اسپرم در هر زمان نسبت به زمان قبل، در تمام تیمارها کاهش می‌یابد و به نظر می‌رسد که تیمار کردن با ویتامین‌های C، E و مخلوط آنها، نتوانسته است از نظر زمانی تحرک اسپرم‌ها را حفظ کند. افزودن ویتامین‌های C و E به جیره و مخلوط آنها نسبت به جیره شاهد باعث افزایش تحرک اسپرم در تمام زمان‌ها شد ($p<۰/۰۵$) و البته در هر زمان، ویتامین E علاوه بر شاهد از ویتامین C نیز بهتر عمل کرده است. در ۶، ۱۲ و ۴۸ ساعت پس از اسپرم‌گیری، مخلوط دو ویتامین از نظر اثرگذاری بر تحرک اسپرم شبیه ویتامین E بود ولی در سایر زمان‌ها (صفر و ۲۴) ویتامین E برتر از مخلوط دو ویتامین ظاهر شد (جدول ۳).

جدول ۳- تاثیر جیره‌های مکمل‌سازی شده با ویتامین‌های C و E بر درصد تحرک اسپرم خروس در ساعات مختلف پس از اسپرم گیری
Table 3. Effects of diets supplemeneted with Vitamin C and E on percentage of the motility of rooster sperm at different times after semen collection

مقدار مکمل در جیره (mg/kg)		ساعت ارزیابی				
ویتامین C	ویتامین E	صفر	۶	۱۲	۲۴	۴۸
۰	۰	۷۸/۵۸^{cA}±۳/۴۲*	۷۱/۱۷^{cB}±۱/۶۹	۵۲/۰۸^{dC}±۲/۳۵	۳۵/۳۳^{cD}±۴/۷۹	۷/۹۲^{dE}±۲/۶۰
۱۰۰۰	۰	۸۲/۲۵^{bA}±۳/۰۵	۷۸/۸۳^{bB}±۱/۷۵	۶۳/۷۵^{cC}±۲/۰۹	۴۴/۲۵^{bD}±۱/۹۵	۱۷/۶۷^{cE}±۱/۸۲
۰	۱۰۰۰	۸۷/۰۸^{aA}±۲/۲۷	۸۲/۵۸^{aB}±۱/۷۳	۷۳/۰۸^{aC}±۲/۳۹	۶۰/۵۸^{aD}±۳/۰۲	۳۳/۵۰^{aE}±۲/۵۷
۱۰۰۰	۱۰۰۰	۸۵/۸۳^{aA}±۲/۸۲	۷۹/۲۵^{bB}±۱/۴۲	۶۹/۶۷^{bC}±۲/۱۸	۶۰/۳۳^{aD}±۲/۸۰	۲۸/۱۷^{bE}±۲/۰۸

*SEM

abcd: میانگین‌های موجود در هر ستون با حروف کوچک نامشابه به‌طور معنی داری با یکدیگر تفاوت دارند ($p<۰/۰۵$)

ABCDE: میانگین‌های موجود در هر ردیف با حروف بزرگ نامشابه به‌طور معنی داری با یکدیگر تفاوت دارند ($p<۰/۰۵$)

علیرغم جیره شاهد، افزودن جیره‌های ویتامین‌های C، E و مخلوط آنها فقط تا ۶ ساعت پس از اسپرم‌گیری بر حفظ اسپرم با حرکت پیش‌رونده منی اثر داشت و پس از آن در هر زمان نسبت به زمان قبلی، شاهد یک روند کاهنده بودیم البته در اثر افزودن جیره‌ای ویتامین‌های C، E و مخلوط آنها نسبت به جیره شاهد در همان زمان اسپرم‌های پیش رونده بهتر حفظ شدند. در هر زمان افزودن جیره‌ای ویتامین‌های E و یا مخلوط آن با ویتامین C باعث حفظ اسپرم‌های پیشرونده نه تنها نسبت به گروه شاهد بلکه نسبت به جیره دارای ویتامین C شد البته در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ویتامین E در این ارتباط بهتر از مخلوط دو ویتامین ظاهر شد. ویتامین C در تمام زمان‌ها به جز زمان صفر بهتر از گروه شاهد، اسپرم‌های پیشرونده را حفظ کرد. بنابراین افزودن ویتامین E و ویتامین C+E، به جیره غذایی باعث افزایش تحرک پیشرونده در دمای ۵ $^{\circ}C$ (دمای یخچال)، نسبت به گروه شاهد و گروه C می‌گردد (جدول ۴). که با نتایج Touazi و همکاران (۴۱) که ذکر نمودند ویتامین E و C می‌تواند در بهبود اسپرم خروس در برابر اکسیدان‌ها بسیار مفید باشد همخوانی دارد.

همچنین امینی و همکاران (۲) نیز گزارش کردند که افزودن ۲۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر ویتامین C به همراه ۵ پیکوگرم ویتامین E در محیط انجماد اسپرم خروس سبب بهبود فراسنجه‌های باروری در اسپرم شد. خان و همکاران (۱۹) نیز در مطالعاتشان ذکر کردند که افزودن ویتامین‌های D و C به تنهایی یا ترکیب آن دو سبب بهبود فراسنجه‌های اسپرم و صفات بیوشیمیایی در خروس‌های نر شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- تاثیر جیره‌های مکمل‌سازی شده با ویتامین‌های C و E بر درصد اسپرم‌های پیش‌رونده خروس در ساعات مختلف پس از اسپرم‌گیری

Table 4. Effects of diets supplemeneted with Vitamin C and E on percentage of the progressive motility of rooster sperm at different times after semen collection

مقدار مکمل در جیره (mg/kg)		ساعت ارزیابی				
ویتامین C	ویتامین E	صفر	۶	۱۲	۲۴	۴۸
۰	۰	۶۸/۱۸^{cA}±۳/۵۱*	۶۲/۶۴^{bB}±۲/۱۵	۴۳/۹۱^{dC}±۲/۳۹	۲۹/۰۹^{dD}±۴/۱۳	۲/۸۳^{cE}±۲/۲۰
۱۰۰۰	۰	۷۰/۷۵^{bcA}±۲/۳۷	۶۹/۵۰^{aA} ±۳/۳۱	۵۲/۸۳^{cB}±۳/۰۷	۳۷/۹۲^{cC}±۲/۳۹	۱۰/۴۲^{bD}±۱/۸۳
۰	۱۰۰۰	۷۳/۲۵^{abA}±۲/۴۵	۷۱/۹۱^{aA}±۱/۶۲	۶۳/۷۵^{aB}±۱/۷۱	۵۵/۰۸^{aC}±۲/۴۶	۲۰/۲۵^{aD}±۲/۵۶
۱۰۰۰	۱۰۰۰	۷۴/۰۸^{aA}±۴/۷۹	۷۱/۹۲^{aA}±۴/۲۵	۶۱/۵۰^{bB}±۲/۴۳	۵۱/۰۰^{bC}±۲/۲۹	۱۸/۵۸^{aD}±۲/۱۰

*SEM

abcd: میانگین‌های موجود در هر ستون عمودی با حروف کوچک نامشابه به‌طور معنی داری با یکدیگر تفاوت دارند ($p<۰/۰۵$)

ABCDE: میانگین‌های موجود در هر ردیف افقی با حروف بزرگ نامشابه به‌طور معنی داری با یکدیگر تفاوت دارند ($p<۰/۰۵$)

قدرت تحرک پیشروندهٔ اسپرم‌ها به‌عنوان یک عامل تعیین‌کننده و مؤثر در باروری مطرح بوده و متضمن لقاح مناسب و کامل است. در گزارش‌های متعددی عنوان گردیده که قدرت تحرک اسپرم‌ها در صورت افزایش رادیکال‌های آزاد و محصولات نهایی روند پراکسیداسیون چربی (LPO) در محیط به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. در واقع این کاهش به دنبال بروز اختلال در فرایندهای تبادل یونی غشاء و آنزیم‌های دخیل در آن است (۱۴). رادیکال‌های آزاد بویژه انواع ROS موجب مهار آنزیم‌های درون سلولی نیز می‌شود و بدین ترتیب اسپرم‌ها از منابع آنزیمی دخیل در تأمین ATP مورد نیاز جهت تحرک و فعالیت محروم شدند (۱۰).

در مجموع رابطه‌ای معکوس و منفی قوی بین میزان ROS موجود در مایع منی و میزان قدرت تحرک اسپرم‌ها وجود دارد. نرخ حرکت اسپرم با افزایش رقیق‌سازی، افزایش می‌یابد، رقیق‌سازی ویژگی‌های اسپرم را تغییر می‌دهد، بطوریکه آن را فعال‌تر می‌کند و موجب خستگی اسپرم شده و در دراز مدت، کاهش باروری را در پی دارد. یکی از عوامل مهم در کاهش تحرک اسپرماتوزوا، ممانعت از خسارت‌های ساختاری ناشی از فشارهای اکسیداتیو بر تمامیت غشاء می‌باشد که منجر به افزایش نفوذپذیری غشاء و کاهش توانایی تنظیم سطوح یونی در داخل سلول می‌شود، که مجموعه این شرایط برای تحرک اسپرم مضر می‌باشند (۵).

افزودن ویتامین E بر قدرت تحرک و به‌ویژه حرکت پیش‌رونده اسپرم مؤثر است در واقع آنتی‌اکسیدان با تجزیه آنیون‌های سوپراکسایداز ایجاد آسیب به غشاء اسپرم و کاهش فراسنجه‌های آن جلوگیری می‌کند ویتامین E بعنوان ترکیب اصلی سیستم آنتی‌اکسیدانی در اسپرماتوزوا می‌باشد (۲۱). با توجه به غشا اسپرم که دارای مقدار زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد، مستعد پراکسیداسیون لیپید بوده و در صورت عدم استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در محیط برون تنی دام احتمال اختلال و تخریب بسیار زیاد نمی‌باشد. افزودن ویتامین E در چنین محیطی سبب بهبود حفاظت از اسپرم و مانع اکسیداسیون شد (۲).

هنگامی که میزان ویتامین E به اندازه ۵۰۰ برابر میزان پیشنهادی NRC در جیره (۱۵۱ واحد بین‌المللی بر کیلوگرم جیره) اضافه می‌شود سبب افزایش کیفیت منی و توان باروری جوجه‌ها می‌شود (۳۸).

ویتامین E تحرک اسپرم گراز را به طور معنی‌داری افزایش داد و از صدمات ناشی از انجماد اسپرم جلوگیری می‌کند (۷). ویتامین E باعث افزایش تحرک اسپرم می‌شود. آزمایش انجام شده توسط (۱۱)، نشان‌دهنده بهبود تحرک اسپرم در رقیق‌کننده‌های حاوی ویتامین E بود.

نتایج نشان دادند که افزودن ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ویتامین E در محیط رقیق‌کننده منی خروس نژاد لگهورن موجب بهبود کیفیت اسپرم و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو اسپرم در طی سردسازی نسبت به گروه شاهد شد (۳۲) که با نتایج این آزمایش در توافق است.

افزایش میزان ویتامین E در پلاسمای منی خروس با میزان آن در جیره پرنده تناسب دارد و از آن تبعیت می‌کند (۳۷). همچنین بین لیپید پراکسیداسیون اسپرماتوزوا و میزان غلظت ویتامین E در مایع منی خروس همبستگی منفی وجود دارد یعنی اینکه هرچه میزان ویتامین مذکور بیشتر باشد سبب کاهش اکسیداسیون در اسپرم خواهد شد (۳۷). از طرف دیگر افزودن ویتامین E به جیره خروس سبب افزایش میزان LH و FSH شد (۱۹). بنابراین اینگونه تغییرات در مایع پلاسمای منی و همچنین هورمون‌های اصلی تولیدمثلی می‌تواند دلیل مشخص و قانع‌کننده‌ای در خصوص اثر مثبت ویتامین در فراسنجه‌های اسپرم باشد.

افزودن سطوح بالاتر ویتامین E به مدت ۴ هفته به جیره جوجه‌خروس‌های کامپونگ سبب بهبود فراسنجه‌های منی شد (۲۶). که نتایج مشابهی با مطالعه حاضر داشت.

طبق پژوهش (۴)، ویتامین E به میزان معنی‌داری موجب تغییر قدرت تحرک در طول دورهٔ ذخیره‌سازی اسپرم نریان در ۷۲ یا ۹۶ ساعت نشد. ویتامین E تأثیر نگه‌دارنده در میزان قدرت تحرک دارد (۲۰). اضافه کردن ویتامین C به منی

www.SID.ir

Archive of SID

خرگوش باعث افزایش قدرت تحرک اسپرم می‌گردد (۴). در اسب با افزودن ویتامین C به مایع منی اسب و در طی ۹۶ ساعت ذخیره‌سازی، تأثیر معنی‌داری روی قدرت تحرک اسپرم مشاهده نکردند (۴). مصرف روزانه ۲۲۵ µg/day سلنیوم و ۴۰۰mg/day ویتامین E به صورت خوراکی برای سه ماه به طور معنی‌داری با کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید مایع سمینال، منجر به بهبود تحرک اسپرم شد (۱۸).

آزمایش‌های انجام شده توسط (۱۱،۳۲)، نشان‌دهنده بهبود خصوصیات اسپرم (تحرک و زنده مانی) در رقیق‌کننده‌های حاوی ویتامین E بودند. انواع اکسیژن‌های فعال می‌توانند تغییراتی را در عملکرد میتوکندری ایجاد کنند که نتیجه آن در تحرک اسپرم بروز می‌نماید (۷). از دیگر فرضیات موجود در زمینه کاهش تحرک اسپرم در طی نگهداری سرمایی، کاهش فسفوریلاسیون پروتئین‌های اکسونم می‌باشد، که برای جابجایی اسپرم ضروری هستند. انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر از توانایی لازم جهت جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های مؤثر در فرایندهای فسفوریلاسیون اکسیداتیو، گلیکولیز یا دیگر مسیرهای تولیدکننده ATP برای سلول اسپرم برخوردار می‌باشند. استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی می‌تواند سبب خنثی شدن اثر اکسیژن‌های فعال بر این آنزیم‌ها شود و در نتیجه از کاهش تحرک اسپرم جلوگیری نماید (۷).

زنده‌مانی اسپرم

زنده‌مانی اسپرم در هر زمان نسبت به زمان قبل از خود در تمام تیمارها کاهش یافت و به نظر می‌رسد که تیمار کردن با ویتامین‌های C، E و مخلوط آنها نتوانسته است از نظر زمانی زنده‌مانی اسپرم‌ها را حفظ کند. در هر زمان افزودن جیره‌ی ویتامین‌های E و یا مخلوط آن با ویتامین C باعث حفظ زنده‌مانی اسپرم‌های خروس نه تنها نسبت به گروه شاهد بلکه نسبت به جیره دارای ویتامین C شد، ضمن اینکه ویتامین E در زمان‌های صفر و ۴۸ بهتر از مخلوط دو ویتامین زنده‌مانی را حفظ کرد. ویتامین C در تمام زمان‌ها به جز زمان صفر بهتر از شاهد باعث زنده‌مانی اسپرم‌ها شد. بنابراین در رتبه اول افزودن ویتامین E به جیره و افزودن مخلوط ویتامین C+E در رتبه دوم، و در نهایت افزودن ویتامین C به جیره غذایی در مرتبه بعدی باعث افزایش اسپرم زنده منی در دمای ۵°C (دمای یخچال)، نسبت به گروه شاهد می‌شود (جدول ۵).

جدول ۵- تاثیر جیره‌های مکمل‌سازی شده با ویتامین‌های C و E بر درصد اسپرم‌های زنده خروس در ساعات مختلف پس از اسپرم‌گیری

Table 5. Effects of diets supplemeneted with Vitamin C and E on percentage of the viability of rooster sperm at different times after semen collection

مقدار مکمل در جیره (mg/kg)		ساعت ارزیابی				
ویتامین C	ویتامین E	صفر	۶	۱۲	۲۴	۴۸
۰	۰	۸۱/۲۵^{dA}±۲/۲۲*	۷۴/۶۷^{cB}±۱/۶۶	۶۱/۷۵^{cC}±۲/۰۰	۴۷/۵۰^{cD}±۳/۲۸	۱۱/۸۳^{dE}±۲/۱۶
۱۰۰۰	۰	۸۷/۰۸^{cA}±۲/۲۳	۸۲/۲۵^{bB}±۱/۷۶	۷۰/۷۵^{bC}±۲/۰۵	۶۰/۵۸^{bD}±۲/۱۹	۲۱/۷۵^{cE}±۱/۷۱
۰	۱۰۰۰	۹۲/۰۸^{aA}±۱/۶۲	۸۵/۵۸^{aB}±۱/۴۴	۷۶/۸۳^{aC}±۱/۴۶	۶۵/۸۳^{aD}±۲/۹۷	۳۹/۷۵^{aE}±۲/۶۳
۱۰۰۰	۱۰۰۰	۹۰/۱۷^{bA}±۲/۷۲	۸۵/۲۵^{aB}±۱/۲۱	۷۶/۵۰^{aC}±۱/۳۷	۶۷/۳۳^{aD}±۱/۹۲	۳۴/۴۲^{bE}±۱/۷۳

*SEM

abcd: میانگین‌های موجود در هر ستون با حروف کوچک نامشابه به‌طور معنی داری با یکدیگر تفاوت دارند ($p<۰/۰۵$)

ABCDE: میانگین‌های موجود در هر ردیف با حروف بزرگ نامشابه به‌طور معنی داری با یکدیگر تفاوت دارند ($p<۰/۰۵$)

طی نگهداری سرمایی و در شرایط یخچال مقدار زنده‌مانی نمونه‌های اسپرم کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تأثیر رادیکال‌های آزاد بر ساختار غشاء باشد (۴). یکی از نتایج تخریب آکروزوم ترشح مواد آنزیمی است. ترشح پنج آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز، آلانین آمینو ترانسفراز، هیالورونو گلوکوزامینداز، اسید فسفاتاز و آلکالین فسفاتاز در اثر تخریب اکروزوم گزارش شده است و مشخص شده که بین آزاد شدن این آنزیم‌ها و تحرک اسپرم ارتباط منفی وجود دارد (۱۷). ویتامین E دارای اثرات بالقوه در حفظ و نگه‌داری اسپرم است و قادر است زمان ماندگاری اسپرم بوقلمون را در آزمایشگاه افزایش دهد (۱۱).

توسعه سیستم دفاعی جهت جلوگیری از اثرات پراکسید چربی بر لایه اسپرم در محیط آزمایشگاهی بسیار مهم است، با اضافه نمودن آنتی‌اکسیدان‌های E و C در محیط آزمایشگاهی خصوصیات اسپرم گاو به طور معنی‌دار بهبود یافتند، به‌طوری که ویتامین E موجب افزایش طول عمر اسپرم تا ۴۸ ساعت و ویتامین C تا ۲۴ ساعت گردید.

غلظت بالای آلفاتوکوفرول دارای اثرات اکسیداتیو، ولی غلظت‌های پایین آن اثرات آنتی‌اکسیداتیو دارد، افزودن ویتامین C به محلول اسپرم ممکن است به‌عنوان پرواکسیدان عمل کندتا آنتی‌اکسیدان (۲۹).

اسپرم در محیط اطراف خود برای تولید ATP در درجه حرارت پایین نیاز به اکسیژن زیادی دارد. اکسیژن مربوطه نیز ممکن است منجر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) شود. باروری یک اسپرم به فراسنجه‌های مختلفی نظیر تعداد، تحرک و مورفولوژی آن بستگی دارد (۱۵). در این میان ROS از جمله قوی‌ترین رادیکال‌های آزاد به شمار می‌آید که در بروز حالات پاتولوژیک بطور اعم و در ایجاد عقیمی بطور اخص، دخالت مستقیم دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

پراکسیداسیون لیپید (LPO) به‌عنوان یکی از نتایج هجوم ROS به غشاءهای زیستی ضمن آسیب‌رسانی به استحکام غشاء، موجب غیرفعال شدن بسیاری از آنزیم‌های غشایی مؤثر در تحرک و فعالیت اسپرم‌ها نیز می‌شود. بارزترین اثر LPO در سلول‌ها، ایجاد اختلال در نظم و کار غشاء سلول‌ها است، به‌طوری که روند انتقال یون‌ها و مواد گوناگون و نیز شیب‌های غلظتی در دو طرف غشاء همراه با انتقال پیامبرهای شیمیایی به واسطهٔ گیرندهای غشایی دستخوش تغییر شده و مختل شود (۱۵).

سلول‌های اسپرم طی روند اسپرماتوژنز حجم عمده‌ای از سیتوپلاسم خود را از دست داده، بنابراین در مقایسه با سلول‌های سوماتیکی با کمبود آنتی‌اکسیدان‌ها روبرو می‌شود. با جدا شدن پلاسمای مایع اسپرمی یا محیط زیست و شناوری اسپرم‌ها که حاوی انواع زیادی از آنتی‌اکسیدان‌ها است، شرایط بسیار خطرناک و نامطلوبی برای این سلول‌ها فراهم خواهد آورد که اولین پیامد آن هجوم ROS موجود در محیط خواهد بود (۱).

اسپرم فاقد سیستم آنزیمی سیتوپلاسمی لازم برای ترمیم ضایعهٔ ناشی از میزان بالای ROS می‌باشدکه اسپرم را در برابر استرس اکسیداتیو ناتوان می‌کند (۳۳). در طرف مقابل رادیکال‌های آزاد، آنتی‌اکسیدان‌ها وجود دارند که تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپید را کنترل و لاشه‌خواری را سرکوب می‌کنند (۴۳). آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با کاهش سرعت اکسیداسیون، باعث حفظ سلول از آسیب‌های شدید اکسید شدن می‌شوند.

مکانیزم اثر این ترکیبات به این صورت است که با دادن یک اتم هیدروژن به رادیکال آزاد تشکیل شده، از گسترش واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند (۱۷). تقریباً تمام سلول‌ها دارای مواد و آنزیم‌هایی هستند که می‌توانند اثرات سمی انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر ROS را خنثی کنند. اما میزان توانایی آنتی‌اکسیدان‌های اسپرم در مقایسه با دیگر سلول‌ها پایین‌تر است و این سلول‌ها نسبت به فشارهای اکسیداتیو آسیب‌پذیرتر هستند (۳۶). اسپرم خروس حاوی مقدار زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در غشاء پلاسما می‌باشند که همین امر دلیل اصلی حساسیت آن‌ها نسبت به آسیب‌های ایجاد شده توسط پراکسیداسیون لیپید می‌باشد آنتی‌اکسیدان‌ها از کاهش تحرک اسپرم جلوگیری می‌کنند (۱).

این ویتامین، ROS مایع را از طریق انتقال خیلی سریع الکترون هضم کرده و از پراکسیداسیون چربی جلوگیری می‌کند ویتامین E به دلیل حلالیت در چربی به راحتی می‌تواند در پلاسمای غشاء نفوذ کند و باعث کاهش خسارات ناشی از رادیکال‌های آزاد بر ساختار اسپرم شود. از طرفی بین تولید ROS در اسپرم و نسبت اسپرم‌های بدشکل ارتباط معنی‌دار وجود دارد (۳). استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم مؤثر باشد. اسپرم به صورت طبیعی خود دارای آنتی‌اکسیدان‌های مختلفی می‌باشد، ولی این آنتی‌اکسیدان‌ها برای نگه‌داری طولانی مدت کافی نیستند (۱۳). ویتامین C اثرات آنتی‌اکسیدانی کمتری نسبت به ویتامین E دارد (۲۹).

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهند، بهبود خصوصیات اسپرم خروس در تیمار ویتامینE در جیره غذایی خروس بومی ورامین به طور معنی‌دار نسبت به گروه شاهد بهبود یافتند، به طوری در وحله اول ویتامین E و بعد از آن ویتامین C+E، موجب افزایش طول عمر و ارتقای دیگر ویژگی‌های اسپرم خروس تا ۴۸ ساعت و ویتامین C تا ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه شاهد گردیدند. به نظر می‌رسد که ویژگی آنتی‌اکسیدانی ویتامین E در حفظ و نگهداری اسپرم در شرایط این مطالعه موثرتر از ویتامین C می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که برای بهبود ویژگی‌ها اسپرم برای دست‌یابی به تلقیح مصنوعی موفق در شرایط طبیعی نگهداری خروس بومی ورامین، با اضافه نمودن ویتامین E به جیره غذایی به این مهم دست یافت.

منابع

1. Agarwal, A., R.A. Saleh and M.A. Bedaiwy. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproductio. Fertility and Sterility, 79: 829-843.
2. Amini, M.R., H. Kohram, A. Zare Shahaneh, M. Zhandi, H. Sharideh and M.M. Nabi. 2015. The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. Cell and Tissue Banking, 16: 587-592.
3. Aziz, N., R.A. Saleh, R.K. Sharma, I. Lewis-Jones, N. Esfandiari, A.J. Thomas and A. Agarwal. 2004. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. Fertility and Sterility, 81: 349- 54.
4. Ball, B.A., V. Medina, C.G. Gravance and J. Baumber. 2001. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degree C. Theriogenology, 56: 577-589.
5. Baumber, J., B.A. Ball, C.G. Gravance, V. Medina and M.C.G. Davies-Morel. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. Andrology, 21: 895-902.
6. Beconi, M.T., C.R. Francia, N.G. Mora and M.A. Affranchino. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation, Theriogenology, 40: 841-851.
7. Breinger, V.E., N.B. Beorlegui, C.M. Oflaherti and M.T. Beconi. 2005. Alpha tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. Theriogenology, 63: 2126-2135.

www.SID.ir

Archive of SID

8. Burton G.W. and K.U. Ingold. 1988. Mechanisms of antioxidant action: prevention and chain – breaking antioxidants, in: Maquel A., Quintanilha T., Weber H., Boca Raton F. L., (eds.), CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Vol II, pp: 29-48.
9. Dawson, E.B., W.A. Harris, M.C. Teter and I.C. Powel. 1992. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers, Fertility and Sterility, 58: 1034-1039.
10. De Lamirande, E. and C. Gagnon. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. Journal of Andrology, 13: 379-386.
11. Donoghue, A.M. and D.J. Donoghue. 1997. Effects of water-and lipid soluble antioxidants on turkey sperm viability. Membrane, 76: 1440-1445.
12. Donoghue, A.M. and G.J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. Animal Reproduction Science, 62: 213- 232.
13. Douard, V., D. Hermier, M. Magistrini, C. Labbe and E. Blesbois. 2004. Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology, 61: 1-13.
14. Engel, S., T. Schreiner and R. Petzoldt. 1999. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. Andrologia, 31: 17-22.
15. Esmaelzadeh, S., M. Fars and A. Bijany. 2007. Effects of sperm morphology on pregnancy rate in IUI cycles. Journal of Reproduction and Infertility, 8: 205-212 (In Persian).
16. Farhadi, R., H. Daghigh Kia and I. Ashrafi. 2016. The Effect of Salvia Sahendica ethanolic extract as natural antioxidant on quality parameters of cryopreserved Holstein bull Sperm. Resarch on Animal Production, 6(12): 79-86.
17. Jousef, M.I., G.H., Abdallahe and K.I. Kamel. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E Supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. Animal Reproduction Science, 76: 99-111.
18. Keskes-Ammar, L., N. Feki-Chakroun, T. Rebai, Z. Sahnoun, H. Ghozzi, S. Hammami, K. Zghal, H. Fki, J. Damak and A. Bahloul. 2003. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. Archieve Andrology, 49: 83-94.
19. Khan, R.U., Z.U. Rahman, I. Javed and F. Muhammad. 2013. Effect of vitamins, probiotics and protein level on semen traits and seminal plasma biochemical parameters of post-moult male broiler breeders. British Poultry Science, 54: 120-129.
20. Kheradmand, A., H. Babaei and J. Abshenas. 2006. Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen. Iranian Journal of Veterinary Researche, 7: 40-45.
21. Lenzi, A., M. Picardo, L. Gandini and F. Dondero. 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. Human Reproduction Update, 2: 246-256.
22. Lucesoli, F. and C.G. Fraga. 1999. Oxidative stress in testes of rats subjected to chronic iron intoxication and alpha-tocopherol supplementation. Toxicology, 132: 179-86.
23. Min, Y., T. Sun, Z. Niu and F. Liu. 2016a. Vitamin C and vitamin E supplementation alleviates oxidative stress induced by dexamethasone and improves fertility of breeder roosters. Animal Reproduction Science, 171: 1-6.
24. Min, Y., T. Sun, Z. Niu and F. Liu. 2016b. Vitamin C and vitamin E supplementation alleviates oxidative stress induced by dexamethasone and improves fertility of breeder roosters. Animal Reproduction Science, 171: 176.
25. Moghbeli, M., M. Sharafi, H. Kohram, A. Zare-Shahaneh, M. Zhandi, M.M. Nabi, V. Zahedi and H. Sharideh. 2016. Are the optimum levels of the catalase and vitamin E in rooster semen extender after freezing-thawing influenced by sperm concentration? Cryobiology, 72: 264-268.
26. Mohamad, A. and R. Abdul. 2017. Effect of vitamin E supplementation on semen quantity and quality of Local Kampong roosters. Malaysian Society of Animal Production, 20: 37-43.
27. Mohammadi, P., S. Tabatabaei Vakil, M. Zarei, J. Fayazi and M. Mamouei. 2016. Evaluation of the effect of different concentrations of vitamin e and selenium in tris extender on sperm quality of Arabic Ram. resarch on Animal Production, 7(13): 99-93.
28. Nowaczewski, S. and H. Kontecka. 2005. Effect of dietary vitamin C supplement on reproductive performance of aviary pheasants. Czech Journal Animal Science, 50: 208-212.
29. Olson, S.E. and G.E. Seidel. 2000. Culture of In Vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. Biology of Reproduction, 62: 248-252.
30. Ommati, M.M., M.J. Zamiri, A. Akhlaghi, H. Atashi, M.R. Jafarzadeh, M.R. Rezvani and F. Saemi. 2013. Seminal characteristics, sperm fatty acids, and blood biochemical attributes in breeder roosters orally administered with sage (Salvia officinalis) extract. Animal Production Science, 53: 548-554.
31. Peruma, P., J.K. Chamuah and C. Rajkhowa. 2013. Effect of catalase on the liquid storage of mithun (Bos frontalis) semen. Asian Pacific Journal of Reproduction, 2: 209-214.
32. Safa, S., G.H. Moghaddam, R. Jafari Jozani, H. Daghigh Kia, H. Janmohammadi and Z. Nemati. 2017. Evaluation the effects of different levels of vitamin E and Nano Selenium on sperm quality

www.SID.ir

Archive of SID

parameters of Leghorn rooster during chilled storage on 4°C. Journal of Animal Science Researchs, 26(4): 59-70 (In Persian).
33. Saleh, R.A., A. Agarwal, E. Kandirali, R.K. Sharma, J. Anthony, A.J. Thomas, A. Essam, D.P. Nada and G. Alvarez. 2002. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. Fertility and sterility, 78(6): 1215-24.
34. Sarlos, P., A. Molnar, M. Kokai, G. Gabor and J. Ratkey. 2002. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. Acta Veterinaria Hungarica, 50: 235-245.
35. Sönmez, M., A. Yüce and G. Türk. 2007. The protective effects of melatonin and vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. Reproductive Toxicology, 23: 226-231.
36. Sreejith, J.N., A.S. Brar, C.S. Ahuja and S.P.S. Sangha. 2006. A comparative study on lipid peroxidation activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. Animal Reproduction Science, 96: 21-29.
37. Surai, P.F. 2002. Fatty acid composition and antioxidant protection of avian semen. In Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction - P.F. Surai (Ed.). NottinghamUniversity Press, Nottingham pp: 391-435.
38. Tabatabaei, S., R. Batavani, E. Ayen, F. Sciences and R. Agriculture. 2011. Effects of Vitamin E Addition to Chicken Semen on Sperm Quality during in Vitro Storage of Semen. Veterinary Research Forum, 2: 103-111.
39. Thiele, J.J., H.J. Friesleben, J. Fuchs and F.R. Ochsendorf. 1995. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. Humuman Reproduction, 10: 110 - 115.
40. Thurston, R.J. 1995. Storage of poultry semen above freezing for 24-48 hours, in: Proceedings of the First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry, Bakst M. R., Wishart G. J., (eds.) Poultry Science Association, Savoy, pp: 107-122.
41. Touazi, L., B. Aberkane, Y. Bellik, N. Moula and M. Iguer-Ouada. 2018. Effect of the essential oil of Rosmarinus officinalis (L.) on rooster spermB motility during 4°C short-term storage. Veterinary World, 11: 590-597.
42. Triques, G.E., J.M. Schmidt, C.S. Oro, H.F. Bordignon, D.G. Donin and J.I.M. Fernandes. 2016. Effect of dietary antioxidant supplementation on reproductive characteristics of male broiler breeders during the post-peak production phase. Semina: Ciências Agrárias, 37: 2557-2566.
43. Türk, G., M. Sönmez, M. Aydin, A. Yüce, S. Gür, M. Yüksel, E.H. Aksu and H. Aksoy. 2008. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. Clinical Nutrition, 27: 289-296.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of Vitamins C and E on Some Sperm Characteristics in Varamini Rooster in Cold Conditon

Amirabas Darestani[1], Kazem Karimi[2], Kamran Zand[3] and Mahdi Khodaei Motlagh[4]

1 and 3- Graduated M.Sc. and Faculty Member, Department of Animal Science Physiology Islamic Azad University Varamin-Pishva Branch
2- Faculty Member, Department of Animal Science Physiology Islamic Azad University Varamin-Pishva Branch (Corresponding author: karimikazem@gmail.com)
4- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources Arak University

Received: June 14, 2018 Accepted: May 1, 2019

Abstract

A total of 36 breeder roosters were divided to 4 dietary treatments which were consisting of 3 pens with 3 birds per pen**.** Treatments were as follow: 1) Control diet without vitamins C and vitamin E, 2) C-diet containing 1000 mg/kg vitamin C, 3) E-diet containing 1000 mg/kg vitamin E and 4) E+C diet containing vitamins C and E (1000mg/kg of each vitamin). Diets were fed to the roosters for a 28 d experimental period. Sperm collection was done by rubbing the belly method, and semen was diluted by of solution tris buffer and kept at 5°C temperature. Evaluated parameters were as follow: semen volume, sperm concentration, sperm motility, progressive sperm, live sperm, at 0, 6, 12, 24, 48, hours after sperm collection. Data analyzed by CRD and mean compared with Duncan multiple range test at the 5% level ($P<0.05$). Results indicated that Vitamin E resulted in increasing of semen volume and concentration, motility, live sperm, progressive sperm, at all evaluated times. Results of vitamin E+C diet were similar to vitamin E diets but despite of vitamin E ~~this~~ diet (C+E) is same as vitamin C diets, too. It seems that, in this study, dietary vitamin E can improve Varaminian rooster sperm characteristic rather than the other experimental groups in dirds. Therefore addition of vitamin E in the rooster diets in order to improve sperm characteristics, can be recommended.

Keywords: Semen, Sperm, Varaminian Rooster, Vitamin E, Vitamin C

www.SID.ir