مجله علوم پایه پزشکی ایران، جلد ۹، شماره۲، تابستان ۱۳۸۵، ۸۲-۷۵
تاریخ دریافت: ۸٤/۱۰/۱۱، تاریخ پذیرش: ۸۵/٤/۱۵

بررسی اثرات ویتامین های E وC بر خصوصیات اسپرم در محیط In Vitro

*[۱]دکتر جواد آرشامی ، [۲]حسین اسماعیل زاده ، [۳]دکتر مهدی نصیری محلاتی، [٤]مرتضی هاشمی عطار

چکیده

هدف

تعیین اثرات آنتی اکسیدانی ویتامین های E و C بر خصوصیات اسپرم در شرایط in vitro .

مواد و روش کار

مایع اسپرم یک نوبت ازگاو نر بالغ و سالم جمع آوری و با استفاده از رقیق کننده، غلظت آن به ۲۰×۱۰^{۶}/ ml رسید. مایع اسپرم رقیق شده ابتدا به سه قسمت مساوی تقسیم و سپس هر بخش ویتامین E (T_E = ۴۰ µg / ml) یا ویتامین C (T_C = ۲۰۰ µg/ml) و یا هیچ کدام (کنترل) دریافت نمودند. تعداد ۸ نمونه از هر تیمار (اپندورف ۱ ml) تهیه و در یخچال در دمای ۵°C نگهداری شدند. ارزیابی تیمارها در فاصله زمانی E_1,C_1 = ۲۴ و E_2,C_2 = ۴۸ و E_3,C_3 = ۷۲ و E_4,C_4 = ۹۶ ساعت انجام شد. در هر نوبت سنجش، دو عدد اپندورف از هر تیمار به طور تصادفی برای فاکتورهای کیفیت اسپرم شامل pH ، درصد سلول های اسپرم متحرک نرمال (SNM%)، غلظت اسپرم نرمال با حرکت پیشرونده (FSC)، ایندکس اسپرم متحرک (SMI)، درصد اسپرم های متحرک با حرکت پیشرونده (PSM %)، غلظت اسپرم های متحرک در واحد حجم (MSC) و غلظت سلولهای اسپرم (TSC) ارزیابی شدند. تیمار کنترل فقط در روز اول ارزیابی گردید و اسپرم های تیمار C_4 مرده بودند.

نتایج

میزان pH تیمار E_1 در مقایسه با کنترل افزایش معنی دار نشان داد. تعداد اسپرم های نرمال در تیمارهای E_1 ، E_2 و C_1 به طور معنی داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. همچنین فاکتور FSC در تیمارهای E_1 ، E_2 و C_1 افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند در حالی که تیمارهای E_4 ، C_2 وC_3 کاهش معنی داری پیدا نمودند. درصد SMI در تیمارهای E_1 ، E_2 و C_1 نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری پیدا نمود اما تیمارهای E_3 و C_2 تفاوتی نداشتند در حالی که تیمارهای E_4 و C_3 به طور معنی داری کاهش نشان دادند. میزان PSM% در تیمار های E_1 ، E_2 و C_1 افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل پیدا نمودند اما تیمارهای E_3 ، E_4 و C_2 تفاوتی نداشتند؛ در حالی که تیمار C_3 کاهش معنی داری را نشان داد. میزان MSC در تیمارهای E_1 ، E_2 و C_1 افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل نشان می دهند. اگرچه سطح MSC در تیمارهای E_3 ، E_4 و C_2 تفاوتی ندارند اما C_3 کاهش معنی دار نشان می دهد. غلظت سلول های اسپرم در تیمارهای E_1 ، E_2 و C_1 افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان می دهد اما تیمارهای E_3 ، E_4 و C_2 اختلافی ندارند، ولی تیمار C_3 کاهش معنی دار پیدا نمود.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می دهد که افزودن ۴۰µg/ ml ویتامین E و یا ۲۰۰ µg / ml ویتامین C به مایع اسپرم از تخریب سلول های اسپرم حداقل برای مدت ۴۸ و یا ۲۴ ساعت به ترتیب در محیط in vitro جلوگیری و سبب بهبود کیفیت اسپرم می گردد.

کلمات کلیدی : ویتامین E، ویتامین C، خصوصیات اسپرم، ذخیره اسپرم، in vitro.

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
* نویسنده مسئول، تلفن و نمابر: ۰۵۱۱-۸۵٤۲۵۵۷، arshamijavad@hotmail.com
۲- کارشناس ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٤- کارشناس ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

حفظ و نگهداری سلول اسپرم در محیط in vitro (۵ °C) در مراکز ناباروری جهت استفاده در IVF و یا سایر اهداف موجب افزایش متابولیسم، کاهش قدرت باروری و تخریب آن می گردد. تاکنون مطالعاتی جهت ذخیره semen برای مدت ۴۸ ساعت در in vitro انجام شده است. گزارشات نشان می دهند که نگهداری اسپرم طیور در محیط یخچال (۵ °C) آزمایشگاه برای مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت سبب کاهش باروری گردیده است (۱). سلول اسپرم برای ادامه حیات و ابقاء قدرت باروری در in vitro نیاز شدید به اکسیژن دارد (۲). از طرفی اسپرم نسبت به اکسیژن حاصل از پراکسیداسیون چربی حساس بوده به طوری که این امر موجب تخریب غشا، کاهش تحرک و باروری آن می گردد (۳، ۴). مطالعات بر روی اسپرم نشان می دهد که ویتامین E به علت حلالیت در چربی می تواند از غشا پلاسمایی عبور نماید و اثرات تخریبی رادیکالهای آزاد را سرکوب کند(۵). مطالعات نشان می دهند که گونه های اکسیژن فعال تولید شده توسط لوکوسیت ها و یا اسپرماتوزوآ در مردان عقیم اثرات مهلکی بر فعالیت اسپرم دارند (۶). پراکسیداسیون چربی موجب ناهنجاری در قطعه میانی اسپرم، کاهش تحرک اسپرماتوزوآ و از دست دادن ظرفیت آکروزوم در لقاح می گردد (۷). آنزیم ها و مواد مختلفی در مایع اسپرم وجود دارند که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشند، ازجمله گلوتاتیون پراکسیداز ریداکتاز، سوپراکسید دیس موتاز، پیروات، تایورین، هیپوتایورین، یورات و ویتامین های E و C (۸، ۹). همچنین،گزارش شده است که درجه حاملگی افراد دریافت کننده ویتامین E (۳۰۰mg/d) در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی داری افزایش یافته است (۱۰). مصرف روزانه ویتامین C به مقدار ۲۰۰ mg و ۱۰۰۰mg سبب افزایش میزان آسکوربیت در مایع اسپرم از ۵/۶ به ۱۳/۱ و mg/dl ۱۶/۱ گردیده است (۱۱) . از طرفی سایر مطالعات نشان داده اند که مصرف توام ویتامین های (۳۵۰ mg/d) C و (۲۵۰ mg/d) E به صورت in vivo از آسیب وارده به DNA اسپرم جلوگیری نمی کند (۱۲) .

در این مطالعه ما از دو نوع آنتی اکسیدان یکی ویتامین C (ascorbic acid) محلول در آب که باعث کاهش پراکسیداسیون خارج سلولی می گردد اما اثرات کمی بر غشا سلول یا داخل سلول دارد و دیگری ویتامین E (α-tocopherol) محلول در چربی که سبب کاهش آسیب به غشاء پلاسمایی سلول می گردد، استفاده نمودیم (۱۳، ۱۴). هدف از این مطالعه تعیین اثرات افزودن آنتی اکسیدانهای ویتامین E و C بر بهبود خصوصیات کیفی اسپرم در دوره نگهداری in vitro (۵ °C) برای مدت ۴ روز بود.

مواد و روش کار

در این مطالعه مایع اسپرم از یک راس گاو سالم و تست شده از نظر بیماریها از مرکز تحقیقات عباس آباد جهاد کشاورزی واقع در ۳۰ کیلومتری جاده کنه بیست مشهد تهیه گردید. مایع اسپرم در لوله های مدرج جمع آوری و از نظر حجم، کیفیت و رنگ مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه بلافاصله در جعبه مخصوص حاوی آب ۳۰ °C قرار داده شد و سپس به آزمایشگاه فیزیولوژی و بیوتکنولوژی تولید مثل واقع در گروه علوم دام دانشگاه فردوسی مشهد منتقل گردید. ابتدا نمونه رقیق شد (۹) و سپس مقدار ml ۴ به عنوان گروه شاهد برداشته شد و بقیه به دو قسمت مساوی تقسیم و در لوله های مدرج ریخته شدند. در لوله اول (تیمار۱) مقدار ۴۰µg/ml ویتامین E و در لوله دوم (تیمار۲) مقدار µg/ml ۲۰۰ ویتامین C اضافه شدند. هر نمونه توسط شیکر به آهستگی مخلوط و در یخچال (۵ °C) نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت هر تیمار به ۸ قسمت مساوی تقسیم و در اپندورف ریخته شدند و تعداد ۴ نمونه از گروه شاهد نیز تهیه گردید (هر اپندورف حاوی ۱ml مایع سیمن رقیق شده با غلظت ۲۰ میلیون اسپرم تهیه گردید). تعداد ۲ عدد اپندورف از هر تیمار و یک عدد از گروه شاهد از روز اول تا چهارم (زمان بندی سنجش تیمارها شامل: E_4,C_4 = ۹۶ و E_3,C_3 =۷۲ ، E_2,C_2= ۴۸ ، E_1,C_1 =۲۴ ساعت بودند) در یخچال نگهداری و برای متغیرهای pH، TSC , %PSM ، %SNM ، MSC ، FSC و SMI توسط

Archive of SID

www.SID.ir

دستگاه آنالیز اسپرم (مدل *SQA II C-P , MES, Co..USA*) مورد سنجش قرار گرفتند. سه پارامتر اولیه به جز pH جزء معیارهای استاندارد بهداشت جهانی می باشند و شامل: تعداد اسپرم در واحد حجم (TSC)، درصد اسپرم های دارای حرکت پیشرونده (%PSM) و درصد اسپرم های دارای تحرک نرمال (%SNM) هستند. سه پارامتر دیگر که در محدوده مراحل آنالیز نمونه تعریف می شوند شامل: غلظت اسپرم های متحرک در واحد حجم یا MSC، غلظت اسپرم های نرمال که دارای حرکت پیشرونده و ساختار طبیعی در واحد حجم می باشند یا FSC و اندیکس تحرک اسپرم در واحد حجم یا SMI که توسط آن می توان به وجود فضای آکروزومی طبیعی اسپرم پی برد و توسط معادله زیر محاسبه می گردد (۱۵). قابل ذکر است که کاهش pH در تیمار ویتامین C در روز چهارم اندازه گیری، موجب مرگ سلول های اسپرم گردید در نتیجه سایر پارامترها قابل اندازه گیری نبودند.

$$(MSC \times 20) + (\%\ PSM) = SMI$$

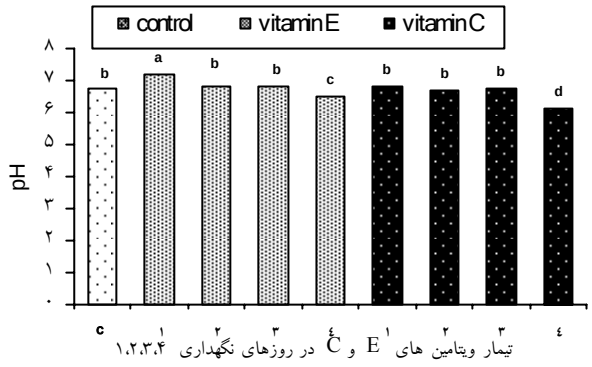
محاسبات آماری : داده های در قالب طرح کاملا تصادفی و با استفاده از دستور GLM در نرم افزار Minitab ver.13 آنالیز شد. مدل آماری داده ها به صورت $X_{ij}=\mu+T_j+\sum_{ij}$ است و میانگین صفات تحت بررسی پس از انجام تجزیه واریانس به وسیله آزمون LSD مورد مقایسه قرار گرفت (۱۶).

نتایج

نتایج تیمارهای مختلف به صورت میانگین گزارش شده اند. ارزیابی هر تیمار در روزهای مختلف (روز اول = E_1, C_1، روز دوم = E_2, C_2، روز سوم= E_3, C_3 و روز چهارم = E_4, C_4) اندازه گیری و با گروه کنترل برای فاکتورهای pH، TSC، %PSM، SNM، MSC، FSC، SMI مقایسه شدند. سلول های تیمار C_4 به علت مرگ سلولی مورد محاسبه قرار نگرفتند (نمودارهای ۱ تا ۷).

pH

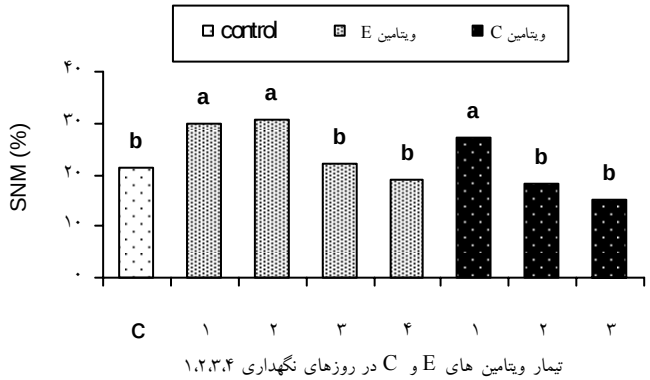
نمودار ۱، اثرات ویتامین های E و C را بر pH سیمن در روزهای اندازه گیری نشان می دهد. تیمار E_1 در مقایسه با کنترل افزایش معنی داری نشان می دهد ولی تیمارهای E_2 و E_3 تفاوتی نشان نمی دهند و تیمار E_4 کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل پیدا نمود. تیمارهای C_1، C_2 و C_3 تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان ندادند (نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه میانگین اثر تیمارهای E و C بر pH . میانگین ها با حروف مشترک بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی داری ندارند ($p< ۰/۰۵$).

درصد سلول های اسپرم متحرک نرمال (SNM%)

نمودار ۲، اثرات ویتامین های E و C را بر تعداد اسپرم های نرمال متحرک در روزهای اندازه گیری نشان می دهد. تیمارهای E_1 و E_2 در مقایسه با شاهد افزایش معنی دار نشان می دهند در حالی که تیمارهای E_3 و E_4 تفاوتی نشان نمی دهند. تیمار C_1 در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی دار نشان داد و تیمار C_2 تفاوتی نداشت ولی تیمار C_3 نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری پیدا نمود (نمودار ۲).

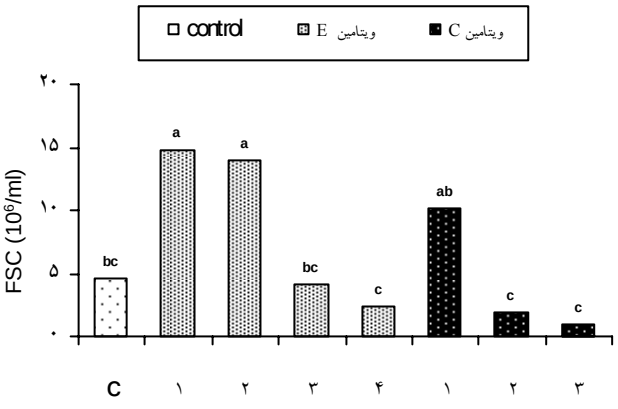


نمودار ۲: مقایسه میانگین اثر ویتامین های E و C بر SNM%. میانگین در روزهای مختلف با حروف مشترک بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی داری ندارند ($p< ۰/۰۵$).

www.SID.ir

غلظت اسپرم نرمال با حرکت پیشرونده (FSC)

نمودار ۳، اثرات ویتامین های E و C را بر حرکت پیشرونده سلولهای اسپرم در روزهای اندازه گیری نشان می دهد. تیمار های E_1 و E_2 در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری نشان می دهند در حالی که تیمار E_3 تفاوتی نشان نمی دهد اما تیمار E_4 به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. تیمار C_1 نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری نشان می دهد اما تیمارهای C_2 و C_3 نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری پیدا نمودند (نمودار ۳).

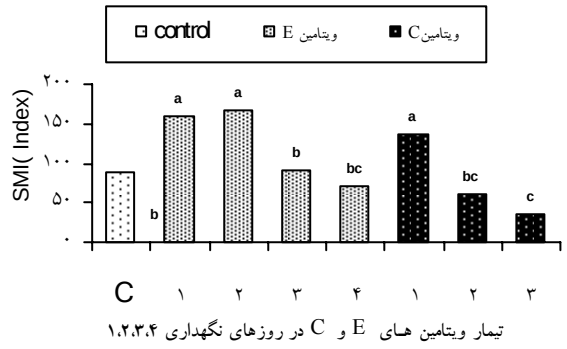


تیمار ویتامین های E و C در روزهای نگهداری ۱،۲،۳،۴

نمودار ۳: مقایسه میانگین اثر تیمارهای E و C برFSC. میانگین ها با حروف مشترک بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی داری ندارند ($p< ۰/۰۵$).

ایندکس اسپرم متحرک (SMI)

نمودار۴ ، اثرات ویتامین های C و E را بر SMI در روزهای اندازه گیری نشان می دهد. تیمارهای E_1 و E_2 افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل نشان می دهند در صورتی که تیمارهای E_3و E_4 نسبت به گروه کنترل تفاوتی ندارند اما تیمار E_4 کاهش معنی داری نسبت به گروههای کنترل و E_1 و E_2 دارد. تیمار C_1 تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل نشان داد در حالی که تیمار C_2 اختلافی نداشت اما تیمار C_3 به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل و تیمار C_1 کاهش یافت (نمودار ۴).

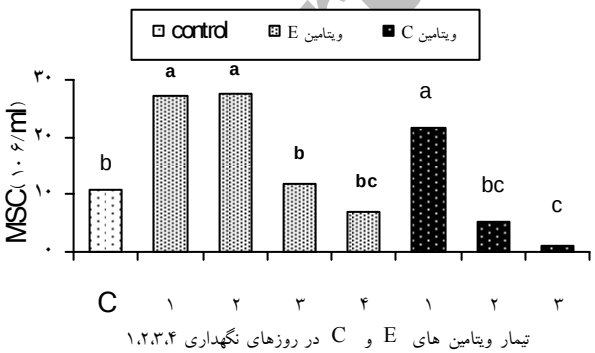


تیمار ویتامین های E و C در روزهای نگهداری ۱،۲،۳،۴

نمودار٤: مقایسه میانگین اثر تیمارهای E و C بر SMI. میانگین ها با حروف مشترک بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی داری ندارند ($p< ۰/۰۵$).

غلظت اسپرم های متحرک در واحد حجم (MSC)

نمودار ۵، اثر ویتامین های E و C را بر MSC در روزهای اندازه گیری نشان می دهد. تیمارهای E_1 و E_2 افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل نشان می دهند اما تیمارهای E_3 و E_4 مشابه هستند. همچنین تیمارهای E_1 و E_2 افزایش معنی داری نسبت به تیمارهای E_3 و E_4 دارند. درحالی که تیمار E_4 نسبت به تیمار E_3 کاهش معنی داری نشان می دهد. تیمار C_1 افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل نشان می دهد در حالی که تیمار C_2 مشابه است اما تیمار C_3 کاهش معنی دار دارد. همچنین تیمارهای C_2 و C_3 با تیمار C_1 نیز کاهش معنی داری دارند (نمودار ۵).



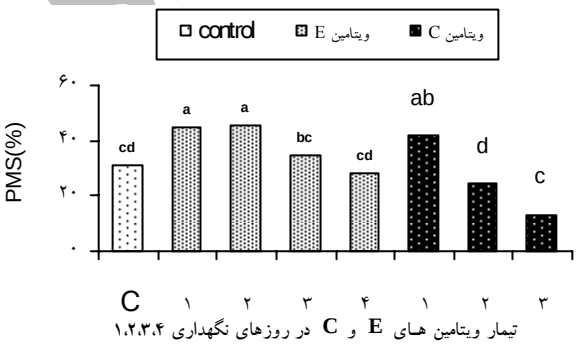
تیمار ویتامین های E و C در روزهای نگهداری ۱،۲،۳،۴

نمودار ۵ : مقایسه میانگین اثر تیمارهای E و C بر MSC. میانگین ها با حروف مشترک بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی داری ندارند ($p< ۰/۰۵$).

www.SID.ir

درصد اسپرم های متحرک با حرکت پیشرونده (PMS %)

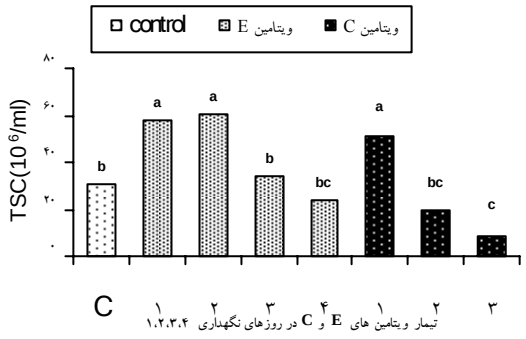
نمودار ۶، اثر ویتامین های E و C را بر PMS % در روزهای اندازه گیری نشان می دهد. تیمارهای E_1 و E_2 افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل نشان می دهند در صورتی که تیمارهای E_3 و E_4 تفاوت معنی داری ندارند. هم چنین تیمارهای E_1 و E_2 با تیمارهای E_3 و E_4 افزایش معنی داری دارند . تیمار C_1 افزایش معنی دار نسبت به گروههای کنترل، C_2 و C_3 نشان می دهد در حالی که با تیمار C_2 تفاوتی ندارد اما تیمار C_3 کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل دارد. هم چنین روند کاهشی معنی داری بین تیمارهای $C_1>C_2>C_3$ به ترتیب مشاهده گردید (نمودار ۶).



نمودار ٦: مقایسه میانگین اثر تیمارهای E و C بر PMS % . میانگین ها با حروف مشترک بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی داری ندارند ($p< ۰/۰۵$).

غلظت سلولهای اسپرم (TSC)

نمودار ۷، اثر ویتامین های E و C را بر TSC در روزهای اندازه گیری نشان می دهد. تیمارهای E_1 و E_2 افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل نشان می دهند اما تیمارهای E_3 و E_4 تفاوت معنی داری ندارند. همچنین تیمارهای E_3 و E_4 با تیمارهای E_1 و E_2 وتیمار E_4 با E_3 کاهش معنی داری نشان می دهند. تیمار C_1 افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل دارد در حالی که تیمار C_2 تفاوتی ندارد اما تیمار C_3 کاهش معنی داری را نشان می دهد. تیمار C_1 افزایش معنی داری با تیمارهای C_2 و C_3 نیز نشان می دهد (نمودار۷).



نمودار ۷ : مقایسه میانگین اثر تیمارهای E و C بر TSC. میانگین ها با حروف مشترک بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی داری ندارند ($p< ۰/۰۵$).

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه اثرات آنتی اکسیدانی ویتامین های E و C بر محافظت سلولهای اسپرم در طی ۴ روز نگهداری در یخچال (۵ °C) بررسی شد. ویتامین E ابتدا به عنوان یک فاکتور محلول در چربی که از مرگ و جذب جنین در موش جلوگیری می کند کشف شد (۱۷) . در مطالعه ای دیگر ویتامین E ، جنین ابتدایی Murine را از شوک حرارتی محافظت نمود، و این امر یک حادثه Cytotoxic است که به وسیله رادیکال آزاد کنترل می شود (۱۱). عملکرد و فعالیت اصلی ویتامین E محافظت از زنجیره اسیدهای چرب غیراشباع در غشا سلول است. پراکسیداسیون لیپیدهای این لایه سبب اختلال در عملکرد و قابلیت نفوذ پذیری غشا گردیده، در نتیجه سلول تخریب شده و می میرد. همچنین ویتامین C یک آنتی اکسیدان قوی است مادامی که در محیط رادیکال های پراکسیل قرار می گیرد اما برای انواع رادیکال های اکسیژن در غشا لیپیدی ضعیف عمل می کند (۱۸). جالب است که ویتامین C به عنوان آنتی اکسیدان عمل می کند اما در غلظت بالا فعال کننده سلول است (۱۱).

در این مطالعه pH در روز اول برای تیمار E_1 به طور معنی دار در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان می دهد که خود نمایانگر تثبیت pH در روز اول توسط تیمار E_1 است در حالی که تیمار های E_2 و E_3 تفاوت معنی داری با تیمار کنترل ندارند. تیمار E_4 در روز چهارم کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد که این امر نمایانگر اسیدی شدن

Archive of SID
www.SID.ir

محیط اسپرم است. کاهش pH محیط اسپرم که بر اثر فعالیت آن و تولید اسید لاکتیک ایجاد می شود موجب مرگ اسپرم می گردد. مطالعات نشان داده است که کاهش pH به کمتر از ۶/۹ در محیط بی هوازی تولید اسید لاکتیک می کند که خود سبب کاهش متابولیسم و نهایتا مرگ اسپرم می گردد (۱۹). درجه pH در تیمارهای C_1 ، C_2 و C_3 در مقایسه با تیمار کنترل تفاوتی نشان نمی دهند. تیمار C_4 در طی این مطالعه به علت مرگ سلول های اسپرم در روز چهارم قابل سنجش نبود در نتیجه فاکتورهای مربوط به این تیمار اندازه گیری نشدند. به نظر می رسد که ویتامین C موجب کاهش pH محیط گردیده است و این امر در روز چهارم موجب از بین رفتن اسپرم های تیمار C شده است. همچنین ویتامین C موجب کاهش چسبندگی اسپرم به یکدیگر و در نتیجه افزایش باروری نیز می گردد (۱۲، ۲۰).

افزایش درصد سلول های نرمال در مایع اسپرم سبب باروری بیشتر می گردد. در این مطالعه اضافه نمودن ویتامین E درصد بیشتر سلول های نرمال را در روز اول و دوم سنجش در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری نشان می دهد، در صورتی که در روزهای سوم و چهارم یک روند نزولی اما غیر معنی داری را نسبت به تیمار کنترل دارد. گزارش شده است که کمبود ویتامین E در جیره غذایی حیوانات موجب عقیمی می گردد (۲۱) . در یک مطالعه مصرف IU ۲۰۰ ـ ۱۰۰ ویتامین E به طور روزانه در انسان عقیم موجب افزایش باروری گردیده است (۲۲). در این مطالعه تعداد سلولهای اسپرم در تیمار C_1 به طور معنی داری بیشتر از تیمار کنترل ، C_2 و C_3 می باشند در صورتی که تفاوت معنی داری بین C_2 و C_3 مشاهده نمی شود. این یافته نمایانگر کاهش شدید تعداد سلول های نرمال اسپرم در روزهای دوم و سوم است و اینکه ویتامین C اثرات آنتی اکسیدانی کمتری نسبت به ویتامین E دارد. سایر مطالعات نشان می دهد که مصرف روزانه ۲۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم ویتامین C به ترتیب موجب افزایش تعداد سلول های اسپرم در افراد سیگاری گردیده، و از تخریب و اکسیداسیون DNA اسپرم آنها جلوگیری نموده است (۱۲، ۲۳). در این تحقیق، درصد سلول های اسپرم نرمال که دارای حرکت پیشرونده بودند بعد از ۴۸ ساعت ذخیره در تیمار های E_1 و E_2 به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش نشان می دهند که این امر نشانگر اثرات بالقوه ویتامین E در حفظ و نگهداری اسپرم است. سایر مطالعات نشان می دهند که پراکسیداسیون چربی تحرک اسپرم های خروس را کاهش می دهد (۲۴) اما دیگر یافته ها بالعکس افزایش تحرک اسپرم ها را گزارش نموده اند (۴). افزودن ویتامین C در ۲۴ ساعت اول موجب پایداری تحرک سلول های نرمال گردید اما در روزهای دوم و سوم تحرک اسپرم به طور معنی داری کاهش یافت که این امر نمایانگر اسیدی شدن محیط در مقایسه با روز اول است و سلول اسپرم در محیط با pH اسیدی فعالیت خود را از دست داده و می میرد. همان طوری که قبلا اشاره شد سلولهای اسپرم در تیمار C_4 به همین علت از بین رفته بودند.

سایر مطالعات نشان می دهند که پراکسید آلی در طی ذخیره اسپرم قوچ تشکیل می شود و تجمع آن موجب از دست رفتن تحرک اسپرم می گردد (۲۵). در این مطالعه ویتامین C در مقایسه با ویتامین E اثرات کمتری در حفظ، نگهداری و تحرک اسپرم دارد. مطالعات اخیر گزارش نموده اند که افزودن ویتامین C به محلول اسپرم ممکن است به عنوان پرواکسیدان عمل کند تا آنتی اکسیدان (۱۷) .

در این مطالعه، ایندکس تحرک اسپرم (SMI) برای تیمارهای E_1 و E_2 در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری در ۴۸ ساعت اول ذخیره اسپرم نشان می دهد در حالی که در روزهای سوم و چهارم (E_3 , E_4) تفاوت معنی داری ندارند. به طور مشابه سایر مطالعات در ۲۴ ساعت اول ذخیره اسپرم بوقلمون، تفاوت معنی دار نشان می دهند (۲۵). همچنین گزارش شده است که ویتامین C یک آنتی اکسیدان قوی است مادامی که رادیکال های پراکسیل در حالت محلول باشند اما برای رادیکال های اکسیژن موجود در لایه چربی سلول ضعیف عمل می کند(۲۶). در این مطالعه تیمار C_1 موجب افزایش SMI در مقایسه با گروه کنترل گردید؛ در حالی که در روز دوم تفاوتی با گروه کنترل نشان نمی دهد و این امر با سایر یافته ها که ویتامین C تاثیری بر خصوصیات اسپرم ندارد همخوانی نشان می دهد (۲۵). تیمار C_3 در روز سوم یک کاهش معنی دار نسبت به کنترل را نشان

Archive of SID
www.SID.ir

می دهد که بیانگر یک روند کاهشی در مقایسه با تیمار C_1 در ۲۴ ساعت اول می باشد.

درصد غلظت اسپرم های متحرک پیشرونده در تیمار های E_1 و E_2 به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان می دهد که این امر بیانگر درجه باروری بالا می باشد. به طوری که گزارش شده است ، افزودن ویتامین E به سیمن خروس موجب بهبود باروری بعد از ۲۴ ساعت ذخیره در مقایسه با کنترل می شود (۲۶). در روزهای سوم و چهارم ذخیره ی اسپرم (E_3 , E_4) ، درصد PMS تفاوتی با گروه کنترل نشان نمی دهند که این یافته تاثیرگذاری مثبت ویتامین E حداقل برای اولین ۴۸ ساعت نگهداری را نشان می دهد. همچنین تیمار C_1 درصد بیشتر PSM را در مقایسه با گروه کنترل نشان می دهد اما در روزهای دوم و سوم ذخیره اسپرم روند کاهشی را نسبت به گروه کنترل پیدا می کند که خود نمایانگر تاثیر مثبت ویتامین C بر حفاظت اسپرم در ۲۴ ساعت اول ذخیره است.

درصد سلول های اسپرم متحرک نرمال با ساختار طبیعی (%SNM) در تیمارهای E_1 ، E_2 و C_1 به طور معنی دار در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان می دهند. این یافته نشانگر عملکرد مثبت این آنتی اکسیدان ها در حفظ ساختار مرفولوژیکی و فعالیت فیزیولوژیکی سلول های اسپرم می باشد، اگرچه اثرات آنتی اکسیدانی در تیمارهای E_3 , E_4 , C_2 و C_3 روند کاهشی را نشان می دهند. همچنین گزارش شده است که آنتی اکسیدان E قادر است زمان ماندگاری اسپرم بوقلمون را در آزمایشگاه افزایش دهد (۲۷). سایر تحقیقات نشان داده اند که اسپرم در محیط اطراف خود جهت تولید ATP در درجه حرارت پایین نیاز به اکسیژن زیادی دارد (۲). به طوری که اکسیژن مربوطه نیز ممکن است منجر به تولید رادیکال های آزاد شود، در نتیجه سبب تخریب لایه اسپرم گردد (۳).

توسعه سیستم دفاعی جهت جلوگیری از اثرات پراکسید چربی بر لایه اسپرم در محیط in vitro بسیار مهم است. در مطالعه اخیر، و بهبود خصوصیات اسپرم گاو با اضافه نمودن آنتی اکسیدان های E و C در محیط in vitro به طور معنی دار بهبود یافتند، به طوری که ویتامین E موجب افزایش طول عمر اسپرم تا ۴۸ ساعت و ویتامین C تا ۲۴ ساعت گردید.

نتایج کلی به دست آمده از این مطالعه نشان می دهند که افزودن ۴۰ µg /ml ویتامین E به مایع اسپرم در محیط in vitro سبب ارتقاء خصوصیات اسپرم حداقل برای دو روز اول نگهداری در مقایسه با گروه کنترل می شود. همچنین خاصیت آنتی اکسیدانی ویتامین E موجب حیات اسپرم تا روز چهارم نیز گردید. استفاده از ۲۰۰µg / ml ویتامین C نیز سبب ارتقاء خصوصیات اسپرم تا روز دوم نگهداری در مقایسه با گروه کنترل گردید اما در روز دوم تفاوت معنی دار بین دو گروه مشاهده نگردید. به نظر می رسد که خاصیت آنتی اکسیدانی ویتامین E در حفظ و نگهداری اسپرم در شرایط این مطالعه موثرتر از ویتامین C می باشد. بنابراین پیشنهاد می شود که برای مقابله با گونه های اکسیژن مخرب در محیط اسپرم در شرایط آزمایشگاهی بهتر است از ویتامین E در رقیق کننده های اسپرم استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

منابع مالی این طرح توسط قطب علمی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تامین گردید و مایع اسپرم از مرکز تحقیقات عباس آباد جهاد کشاورزی استان خراسان رضوی تهیه شد که به این وسیله مراتب تشکر و قدردانی به عمل می آید.

References

1. 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, IL, 107-122.
2. Sexton T. J., Giesen A. F., 1982, Beltsville poultry semen extender 6. Holding turkey semen for six hours at 15°C, Poultry Sci., 61:1202-1208.
3. Ravie O., Lake P. E., 1985, The phospholipids-bound fatty acids of fowl and turkey spermatozoa, Anim. Report. Sci., 9:189-192.
4. Wishart G. J., 1984, Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilizing ability, J. Rep. Fertil., 71:113-118.

Archive of SID
www.SID.ir

5. Aitken R. J., Clarkson J. S., 1988, Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of spermatozoa preparation techniques, J. Androl., 9:367-376 .
6. Aitken R. J., Clarkson J. S., Hargreave T. B., 1989, Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia, J. Androl., 10: 214-220.
7. Aitken R. J., West K., Buckingham D., 1994, Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function, J. Androl., 15:343-352.
8. Griveau J. F., Le Lannou D., 1997, Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology, Int. J. Androl., 20: 61-69.
9. Hughes C. M., Lewis S. E. M., Mc Kelvey-Martin V. J., Thomson, W. B., 1997, Effect of antioxidant supplementation in vitro and in vivo on human sperm DNA integrity [Abstr.], Hum. Reprod., 12 (Abstr. Book 1) , 37.
10. Menditto A., Pietraforte D., Minetti M., 1997, Ascorbic acid in human seminal plasma is protected from iron-mediated oxidation, but is potentially exposed to copper-induced damage, Hum. Reprod., 12:1699-1705.
11. Beconi M. T., Francia C. R., Mora N. G., Affranchino M. A., 1993, Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation, Theriogenology, 40:841-851.
12. Dawson E. B., Harris W. A., Teter M. C., Powel I. C., 1992, Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers, Fertil. Steril., 58:1034-1039.
13. Hammerstedt R. H., 1993, Maintenance of biogenetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation; A review of the effect on design of storage prevention systems, Repord. Fertil. Dev., 5:657-690 .
14. Lindermann C. B., Kanous K., 1991, The cyclic nitroxide free radical, 4-hydroxy-2,2,6,6-tetra-methylpiperidine-1-oxyl (Tempol), is effective in prolonging the motility of bull sperm in vitro, Biol. Reprod., 44 (Suppl 1):117 (Abstr).
15. Howard J. G., Bush M., Wildt D. E., Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals, in: Morrow D. A., (eds.), Current Therapy in Theriogenology, Saunders W. B., Philadelphia, 1986, 1047-1053.
16. Snedecor G. W., Cochran W. G., 1990, Statistical Methods, Iowa State University Press.
17. Olson S. E., Seidel J. R. G. E., 2000, Culture of In Vitro – produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients, Biol. Reprod., 62: 248-252 .
18. Burton G. W., Ingold K. U., 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, 1988, 29-48.
19. Bearden H. J., Fuquay J., Applied Animal Reproduction, Second ed., Prentice-Hall Co., Reston, Virginia,U.S.A., 1984, 155-56.
20. Dawson E. B., Harris W. A., McGanity W. J., 1983, Effect of ascorbic acid on sperm fertility, Fed. Proc., 42: 931 [abstr 3].
21. Thiessen D. D., Ondrusek G., Coleman R. V., 1975, Vitamin E and sex behavior in mice, Nutr., Metab., 18: 116-119 .
22. Bayer R., 1960, Treatment of infertility with vitamin E, Int. J. Fertil., 5:70-78.
23. Fraga C. G., Motchnik P. A., Shigena M. K., 1991, Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm, Proc. Natl. Acad. Sci.,USA, 88:11003-11006 .
24. Fujihara N., Howarth B. Jr.,1978, Lipid peroxidation in fowl spermatozoa, Poultry Sci., 57:1766-1768.
25. Jones R., Mann T., 1973, Lipid peroxidation in spermatozoa, Proc. R. Soc. Lond. B., 184:103-107.
26. Blesbois E., Greasseau I., Blum J. C., 1993, Effects of vitamin E on fowl semen storage at 4°C, Theriogenology, 39:771-179.
27. Donoghue Ann M., Donoghue D. J., 1997, Effects of water-and lipid- soluble antioxidants on turkey sperm viability, Membrane, 76: 1440-1445.

Archive of SID
www.SID.ir