Archive of SID

اثر ویتامین سی و گلیسرول بر مشخصات پس از ذوب منی قوچ سنگسری

رضا نارنجی ثانی

سمنان، دانشگاه سمنان، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۲

چکیده

گوسفند نژاد سنگسری یکی از مهمترین نژادهای تولیدکننده گوشت در مرکز ایران است. بنابراین لزوم حمایت از این نژاد از طریق حفظ اسپرم منجمد ضروری بنظر می‌رسد. از طرفی دلیل مهم کاهش باروری در طی انجماد سازی منی، تشکیل لیپیدپراکسیدازها در حضور رادیکالهای اکسیژن است. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیرات ویتامین سی و گلیسرول بر مشخصات پس از ذوب منی در قوچ سنگسری است. در این مطالعه ۵ قوچ سنگسری استفاده‌شده است. منی هر قوچ سه روز یکبار توسط الکترواجاکولاتور اخذ شده و پس از تعیین مشخصات ادغام شده و پس از رقیق‌سازی تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سرد شدند. منی‌های سرد شده به ۱۵ گروه تقسیم شدند. گروهها به نسبت ۱:۱ با یکی از گروههای رقیق‌کننده شامل نسبتهای مختلف گلیسرول (۰٪، ۱٪، ۳٪، ۵٪ و ۷٪) و ویتامین سی (۱، ۰/۱۵، ۰/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) رقیق شدند. پس از منجمد کردن، منی‌ها ذوب شدند. این مطالعه نشان داد که ویتامین سی و گلیسرول بصورت معنی‌داری بر مشخصات پس از ذوب منی مؤثر هستند. در میان گروههای درمانی ترکیبی، بالاترین میزان تحرک و زنده مانی اسپرم مربوط به گروه ۰/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر ویتامین سی بعلاوه ۵٪ گلیسرول بود. بالاترین میزان زنده مانی اسپرم در گروه‌های درمانی ساده در گروه ۰/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر ویتامین سی مشاهده شد. درمجموع، بهترین ترکیب برای رقیق‌سازی منی قوچ سنگسری ۰/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر ویتامین سی بعلاوه ۵٪ گلیسرول می‌باشد.

واژه های کلیدی: انجماد، قوچ سنگسری، گلیسرول، منی، ویتامین سی

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳۳۳۶۵۴۲۱۴ ، پست الکترونیکی: rezasani_vet@profs.semnan.ac.ir

مقدمه

تلقیح مصنوعی در گوسفند مزایای بسیاری برای بهبود ژنتیک دارد. این روش تکنیکی نوین نیست، اما بعلت مزایای فراوانش، یک روش باصرفه است. از جمله فواید این روش برای تولیدکنندگان می‌توان بهبود ژنتیکی بوسیله افزایش فشار انتخابی بر جمعیت قوچ و افزایش تعداد نتایج از قوچهای باکیفیت را نام برد. از سوی دیگر، حیوانات بومی هر منطقه ذخایر ژنتیکی آن منطقه هستند که در طی سالها با محیطشان سازگار شده و ژنهای مطلوب در آنها ماندگار شده است. نژاد سنگسری نژادی است که منشأ آن شمال و مرکز ایران در مهدیشهر (سنگسر) در استان سمنان و همچنین در استان مازندران است. بهبود ژنتیکی این نژاد، بعلت اهمیت تولید گوشتی با میزان چربی کم بسیار مهم است، و از آنجایی که تلقیح مصنوعی بعنوان یکی از روش‌های مهم بهبود ژنتیکی محسوب می‌شود، بنابراین در این مطالعه، ما بدنبال رقیق‌کننده‌ای هستیم که بتواند منی قوچ سنگسری را برای تلقیح مصنوعی بخوبی حفظ کند.

موفقیت ذخیره طولانی‌مدت اسپرم بر محتویات رقیق‌کننده که حاوی مواد محافظ در برابر سرما است بستگی دارد تا بتواند سلولها را در برابر انجماد و ذوب کردن محافظت کند. گلیسرول بصورت موفقی بعنوان یک ماده

www.SID.ir

Archive of SID

محافظت‌کننده در برابر سرما در رقیق‌کننده‌های اسپرم جهت انجماد استفاده‌شده است (۱۷، ۲۶). منی منجمد در رقیق‌کننده‌ای بدون گلیسرول ممکن است با ایجاد کریستال یخ داخل سلولی همراه باشد که می‌تواند ساختار اسپرم را در طی فرایند ذوب آسیب زند (۱۵، ۳۶). بهرحال، اضافه کردن گلیسرول به رقیق‌کننده‌ها در جهت ذخیره‌سازی اسپرم قوچ بدلیل خاصیت سمی آن با محدودیت‌هایی نیز همراه می‌باشد (۱۴ و ۴۴).

یک دلیل مهم برای کاهش باروری در طی ذخیره‌سازی منی تشکیل لیپیدپراکسیدازها در حضور رادیکالهای اکسیژن است. غشا پلاسمایی اسپرم حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباعی است که حساس به آسیب پراکسیداتیو هستند و بنابراین موجب کاهش تمامیت غشایی اسپرم، نقص در فعالیت اسپرم و کاهش تحرک اسپرم می‌شوند (۴ و ۲۰). علاوه بر تأثیرات آسیب‌زننده، اکسیژن واکنش‌زا بصورت فیزیولوژیک در بیش‌فعالی اسپرم درگیر است، و تولید مداوم آن پیش‌نیازی برای ظرفیت پذیر شدن اسپرم است (۱۲). منی دارای میزان قابل‌توجهی از آنتی‌اکسیدان است که بین پراکسیداسیون چربی و تشکیل بیش‌ازحد پراکسید تعادل برقرار می‌کنند (۲۳). بهرحال، ظرفیت داخلی آنتی‌اکسیدانی منی شاید در طی ذخیره‌سازی و رقیق‌سازی آن کافی نباشد (۲۶). مطالعات آزمایشگاهی (۲۹، ۳۷) نشان داده‌اند که اضافه کردن برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها بر رقیق‌کننده‌های منی می‌تواند تحرک و زنده مانی اسپرم را بهبود بخشند، و همچنین استفاده از غلظتهای پایین گلیسرول را اجازه داده‌اند. بنابراین، بهبود شرایط ذخیره‌سازی اسپرم در دمای پایین اثر مهمی بر بهبود تلقیح مصنوعی خواهد داشت.

با توجه به نکات ذکرشده، هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی تأثیر ویتامین سی بعنوان یک آنتی‌اکسیدان و گلیسرول بعنوان یک ماده محافظ در برابر سرما بر مشخصات پس از ذوب منی در قوچ سنگسری می‌باشد.

مواد و روشها

حیوانات و جمع‌آوری منی: پنج قوچ سنگسری باسن بین ۲ تا ۳ سال در این مطالعه استفاده‌شده‌اند. این مطالعه در فیروزکوه (عرض جغرافیایی ۳۵، ۴۵ درجه شمالی، طول جغرافیایی ۵۲، ۴۴ درجه شرقی، و ارتفاع ۱۹۳۰ متر از کف دریا) و در طی فصل تولیدمثلی (آبان و آذر ۱۳۹۳) انجام‌گرفته است. منی هر سه روز یکبار بوسیله الکترواجاکولاتور از هر قوچ اخذ شده است.

فرآوری منی: تمام نمونه‌های منی که میزان تحرک اسپرم زیر ۷۰٪ را نشان داده‌اند حذف شدند. پس از تعیین مشخصات منی هر قوچ، انزالهای هر قوچ ادغام شده و با نسبت ۳:۱ (منی:رقیق‌کننده) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رقیق‌کننده تریس رقیق شدند. رقیق‌کننده حاوی تریس (هیدروکسی متیل)، آمینومتان (۳/۸۷۶ گرم) (مرک، آلمان)، گلوکز (۰/۵۲۳ گرم) (مرک، آلمان)، اسیدسیتریک (۲/۱۲۳) (مرک، آلمان) و زرده تخم‌مرغ (۱۶٪) پنیسیلین (۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی) است. برای تأثیر آنتی‌بیوتیک، نمونه‌ها در بن‌ماری برای ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. منی‌های رقیق‌شده بصورت تدریجی در طی ۲ ساعت تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سرد شدند.

منی‌های سرد و رقیق‌شده هر قوچ به ۱۵ بخش تقسیم شدند. هر بخش با نسبت ۱:۱ با یکی از گروههای رقیق‌کننده حاوی نسبتهای مختلف گلیسرول (مرک، آلمان) (۰٪، ۱٪، ۳٪، ۵٪ و ۷٪) و ویتامین سی (پودر، مهردارو، ایران) (۰ (کنترل)، ۰/۱۵، ۰/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) در گروههای ساده و ترکیبی از دوزهای ذکرشده از ویتامین سی و غلظتهای مختلف مذکور از گلیسرول در گروههای ترکیبی رقیق شدند. منی رقیق‌شده در پایت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری بسته‌بندی شدند. منی در پایت‌ها در بخار ازت مایع منجمد شدند. سپس پس از ۲۰ روز در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه ذوب شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

معاینات منی: میزان تحرک و زنده مانی اسپرم پس از ذوب کردن تعیین گردیده است. حرکت انفرادی اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر) مجهز به گرما دهنده تنظیم شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شده است. تخمین تحرک با مشاهده ۵ عدد شان میکروسکوپ مختلف از هر نمونه توسط یک فرد در طی مطالعه انجام شد. نمره تحرک با میانگین ۵ تخمین متوالی بدست آمده است. برای ارزیابی میزان اسپرم زنده/ مرده، رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین براساس روش توصیف‌شده توسط فراگا و همکارانش (۱۹۹۱) انجام‌گرفته است (۱۸). درمجموع ۱۰۰ سلول اسپرم بر روی هر لام در بزرگنمایی ۴۰۰ برابر محاسبه‌شده است.

آنالیز آماری

اطلاعات بدست آمده توسط روش GLM بر روی نمونه‌های کاملاً تصادفی در ۱۵ گروه‌درمانی در شکل طراحی فاکتوریل ۳×۵ با سه سطح درمانی ویتامین سی‌وپنج سطح درمانی گلیسرول با استفاده از نرم‌افزار SAS (نرم‌افزار آماری SAS، نسخه ۸/۲) (SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA, 2005) تحلیل آماری شده و میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن با رنج چندتایی در سطح P < ۰/۰۵ مقایسه شده‌اند.

نتایج

میزان تحرک اسپرم: این مطالعه نشان داد که ویتامین سی و گلیسرول بصورت معنی‌داری بر میزان تحرک اسپرم تأثیرگذار هستند (جدول ۱، P < ۰/۰۵). در میان گروههای درمانی گلیسرول، بیشترین میزان تحرک اسپرم در گروه با غلظت ۵٪ مشاهده شد و در میان گروههای درمانی ویتامین سی، دوز ۰/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بالاترین میزان تحرک اسپرم را باعث شد. از طرفی در بین گروههای درمانی ساده، گروه ویتامین سی با دوز ۰/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بالاترین میزان تحرک را نشان داد.

جدول ۱- اثر گروههای درمانی ساده بر میزان تحرک و میزان زنده مانی اسپرم پس از انجماد و ذوب قوچ سنگسری

	گلیسرول ٪۷	گلیسرول ٪۵	گلیسرول ٪۳	گلیسرول ٪۲	ویتامین سی ۰/۳	ویتامین سی ۰/۱۵	کنترل
میزان تحرک اسپرم	۲۳/۵۵± ۰/۲۴^{d}	۳۰± ۰/۲۴^{b}	۲۷/۷۷± ۰/۲۴^{c}	۲۵/۷۷± ۰/۲۴^{cd}	۳۷/۸± ۰/۱۹^{a}	۲۳/۰۹± ۰/۱۹^{d}	۱۳/۶۶± ۰/۱۹^{e}
میزان زنده مانی اسپرم	۳۰/۶۶± ۰/۲۴^{ef}	۳۸± ۰/۲۴^{b}	۳۵/۵۵± ۰/۲۴^{c}	۳۳/۳۳± ۰/۲۴^{cd}	۴۴/۷۳± ۰/۱۹^{a}	۳۲/۸± ۰/۱۹^{def}	۲۰/۳۳± ۰/۱۹^{g}

$^{a, b, c, d, e, f, g}$ نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در هر ردیف است (P <۰/۰۵)

نتایج بصورت میانگین گزارش‌شده‌اند (± SEM)

در گروههای ترکیبی، ویتامین سی ۰/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بعلاوه ۵٪ گلیسرول بالاترین تحرک اسپرم را نشان داد (جدول ۲، P < ۰/۰۵). کمترین میزان تحرک اسپرم نیز در گروه کنترل (بدون ویتامین سی و گلیسرول) مشاهده شد.

میزان زنده مانی اسپرم: افزایش سطح گلیسرول تا ۵٪ افزایش معنی‌دار (P< ۰/۰۵) را در میزان زنده مانی اسپرم نشان داد، بنابراین بالاترین میزان زنده مانی اسپرم در سطح گلیسرول ۵٪ در بین گروههای درمانی گلیسرول بوده است (جدول ۱، P < ۰/۰۵). بالاترین میزان زنده مانی در میان گروههای درمانی ویتامین سی به گروه ۰/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر تعلق داشته و همچنین این گروه بالاترین میزان زنده مانی را در میان گروههای درمانی ساده نشان داده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- اثر گروههای درمانی ساده و ترکیبی بر میزان تحرک و زنده مانی اسپرم پس از انجماد و ذوب منی در قوچ سنگسری

گروههای درمانی	میزان تحرک اسپرم	میزان زنده مانی اسپرم
VC0G0 (Control)	۱۳/۶۶± ۰/۱۹^{mj}	۲۰/۳۳± ۰/۱۹^{jo}
VC0G1%	۲۵/۷۷± ۰/۲۴^{gh}	۳۳/۳۳± ۰/۲۴^{gh}
VC0G3%	۲۷/۷۷± ۰/۲۴^{fg}	۳۵/۵۵± ۰/۲۴^{fg}
VC0G5%	۳۰± ۰/۲۴^{e}	۳۸± ۰/۲۴^{e}
VC0G7%	۲۳/۵۵± ۰/۲۴^{hi}	۳۰/۶۶± ۰/۲۴^{i}
VC0.15G0	۲۳/۰۶± ۰/۱۹^{hi}	۳۲/۸± ۰/۱۹^{hi}
VC0.15G1%	۲۲/۶۶± ۰/۱۹^{i}	۳۳± ۰/۱۹^{gh}
VC0.15G3%	۲۵/۳۳± ۰/۱۹^{gh}	۳۵/۳۳± ۰/۲۴^{fg}
VC0.15G5%	۲۸± ۰/۱۹^{ef}	۳۷/۳۶± ۰/۲۴^{ef}
VC0.15G7%	۲۱± ۰/۲۴^{i}	۳۰± ۰/۱۹^{i}
VC0.3G0	۳۷/۸± ۰/۱۹^{c}	۴۴/۷۳± ۰/۱۹^{c}
VC0.3G1%	۳۸/۶۶± ۰/۲۴^{c}	۴۴/۳۳± ۰/۲۴^{c}
VC0.3G3%	۴۱± ۰/۲۴^{b}	۴۷/۳۳± ۰/۱۹^{b}
VC0.3G5%	۴۴/۶۶± ۰/۱۹^{a}	۵۱/۳۳± ۰/۱۹^{a}
VC0.3G7%	۳۴/۶۶± ۰/۱۹^{d}	۴۱/۶۶± ۰/۲۴^{d}

a، b، c، d، e، f، g، h، i، j، k، l، m، n، o نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون است

G: گلیسرول، VC: ویتامین سی

بالاترین میزان زنده مانی در بین گروههای درمانی ترکیبی در گروه ۰/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر ویتامین سی بعلاوه ۵٪ گلیسرول مشاهده شده (جدول ۲، $P < ۰/۰۵$) و پایین‌ترین میزان نیز در گروه کنترل مشاهده شده است.

بحث

امروزه در جهت افزایش باروری در گونه‌های گوناگون، انجماد طولانی‌مدت سلولهای مختلفی چون اسپرم و تخمک بکار برده می‌شود (۱). در بسیاری از ارگانها من جمله بیضه‌ها، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS: Reactive Oxygen Species) یک رخداد فیزیولوژیک است. در مطالعات انجام‌شده بر روی انجماد منی انسان گزارش شده است که، تولید ROS در سرمایش ۴ درجه سانتی‌گرادی پیش از انجماد، افزایش می‌یابد (۴۳). ROS مانند آب‌اکسیژنه موجب کاهش تحرک اسپرم در موش، انسان، گاو و خرگوش شده است (۵، ۳۳، ۴۲) تولید بیش‌ازحد ROS میتواند با از بین بردن اسپرم، در باروری جنس نر نقش داشته باشد. غشا پلاسمایی اسپرم حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع است. بنابراین، خصوصاً نسبت به آسیب پراکسیداتیو حساس است. پراکسیداسیون چربی ساختار ماتریکس چربی در غشا اسپرم را تخریب کرده، و باعث کاهش تحرک اسپرم و نقص در تمامیت غشایی آن می‌شود (۱۲، ۳۸). یکی از دلایل مهم برای آسیب‌پذیر بودن اسپرم منجمد نسبت به تازه، کاهش مواد آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی مانند سوپراکسیددسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز است (۹). در مطالعه‌ای که بر روی اسپرم گاو نر انجام‌گرفته، نشان داده‌شده است که فعالیت کمتر آنزیمهای آنتی‌اکسیدان باعث پراکسیداسیون چربی می‌شود (۳۱).

المصری (۱۹۹۹) گزارش کرده است که ویتامین سی بعلت دارا بودن رادیکالهای آزاد، اثرات محافظتی در برابر آسیب اکسیداتیو دارد (۱۳)، و تجویز ویتامین سی پس از درمان آلوکسان افزایش پراکسیداسیون چربی بیضه را کند و بنابراین سطح تستسترون را کاهش می‌دهد. کاهش غلظت

www.SID.ir

Archive of SID

ویتامین سی با کاهش استروئیدوژنز در ارتباط است (۱۰). ویتامین سی درصد غشا سالم اسپرم را در اسپرم رقیق‌شده با رقیق‌کننده شیر پس چرخ همانند رقیق‌کننده گلیسرول افزایش می‌دهد. این واقعیت نشان می‌دهد که ویتامین سی پراکسیداسیون چربی‌های غشا را در طی ذخیره‌سازی مهار نمی‌کند و بنابراین تأثیرات محافظتی بر غشا اسپرم دارد (۷).

در مطالعه انجام‌شده توسط نویسندگان، ویتامین سی موجب بهبود تحرک اسپرم و میزان زنده مانی آن در قوچ سنگسری در شرایط ذخیره‌سازی منجمد شده است. البته، بالاترین میزان در گروه ۰/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر در میان گروههای درمانی ویتامین سی مشاهده‌شده است.

در مطالعات گذشته، ویتامین سی اثرات متغیری بر مشخصات منی داشته است. مطالعه انجام‌شده بر روی گاو نر نشان داد که، اضافه کردن ویتامین سی به رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ سیتراته، موجب افزایش تحرک اسپرم ذوب‌شده می‌شود. ولی در همین مطالعه اشاره‌شده است که، میزان زنده مانی و تحرک اسپرم ذوب شده بدنبال اضافه کردن ویتامین سی به رقیق‌کننده زرده تخم مرغ-تریس تغییری نداشته است (۶). ازآنجاکه لیپید پراکسیداسیون چربیها ((LPO(Lipid peroxidation) بعنوان یکی از نتایج هجوم ROS به غشاهای زیستی مطرح است و اضافه کردن ویتامین سی به اسپرم گاو تا دوز زیر ۱۰۰۰ میکرومولار سبب کاهش معنی‌دار LPO شده است، این‌طور میتوان استنباط کرد که ویتامین سی می‌تواند نقش محافظت‌کننده‌ای مناسبی از اسپرم در برابر آسیب‌های سلولی داشته باشد (۲). بنابراین یکی از دلایل نتایج متفاوت به‌دست‌آمده از اضافه کردن ویتامین سی به رقیق‌کننده‌ها در گونه‌ها و نژادهای مختلف، استفاده از رقیق‌کننده‌های متفاوت در مطالعات گوناگون است. همچنین محققین عراقی نشان دادند که ویتامین سی اضافه‌شده به حلال زرده تخم مرغ-تریس نه‌تنها افزایش زنده مانی اسپرم، که افزایش تحرک اسپرم قوچ آواسی را باعث خواهد شد (۸). نتایجی مشابه نتایج محققین عراقی از منی گونه‌های دیگر مانند انسان (۲۱) قوچ (۲۴، ۲۵) و بوفالو (۳۹) بدست آمده است. در مطالعه‌ی دیگری که بر روی اسپرم ذوب شده قوچ انجام‌شده، تأثیر مناسبی از اضافه کردن دهیدرواسکوربیک اسید (ویتامین سی اکسیدشده) به رقیق‌کننده بدست نیامده است. علت این امر این است که دهیدرواسکوربیک اسید باید برای مؤثر بودن، در سیتوپلاسم سلول به ویتامین سی تبدیل شود، ولی اسپرم بدلیل دارا بودن میزان کم سیتوپلاسم، توانایی محدودی در این تبدیل داشته، بنابراین دوز ۱ میلی مول دهیدرواسکوربیک اسید تأثیر مناسبی ندارد. نکته دیگری که در این مطالعه به آن اشاره‌شده، ظرفیت محدود توانایی اسپرم در استفاده از ویتامین سی است (۲۸). این ظرفیت در گونه‌های مختلف و همچنین در نژادهای مختلف یک‌گونه میتواند متفاوت باشد و بنابراین دوزهای مختلف ویتامین سی تأثیرگذاری متفاوت و البته گونه‌ها و نژادهای مختلف نیز تأثیرپذیری متفاوتی را خواهند داشت. در رت تجویز خوراکی ویتامین سی اثر معنی‌داری بر میزان تحرک اسپرم در میان گروههای درمانی ویتامین سی و کنترل نداشته است. بهرحال، غلظت اسپرم و سطح پلاسمایی تستسترون افزایش معنی‌داری در گروههای درمانی ویتامین سی در مقایسه با گروه کنترل داشته است (۴۱). همچنین مکمل ویتامین سی در رقیق‌کننده‌ها تغییری را در تحرک اسپرم و میزان اسپرم مرده در منی قوچ ایجاد نکرده است (۴۰). در مطالعه دیگر در انسان اضافه کردن ویتامین سی (۰/۹ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) به محلول رقیق‌کننده نتوانسته است اثر معنی‌داری بر تحرک اسپرم ایجاد کند (۲۲). در مطالعه دیگر، اضافه کردن ویتامین سی با غلظت ۵۰ یا ۱۰۰ میلی مول در رقیق‌کننده منی قوچ، درصد اسپرمهای متحرک را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داده است (۳۶). بطور مشابهی، اوریخ و همکارانش (۱۹۹۷) گزارش کرده‌اند که ویتامین سی با غلظت ۰/۹ گرم/ لیتر در منی

www.SID.ir

Archive of SID

رقیق‌شده نریان کاهش درصد اسپرم متحرک را باعث شده است (۷).

در کنار دلایل ذکرشده شرایط آب و هوایی که قوچ در آن نگهداری می‌شود نیز می‌تواند دلیل نتایج متفاوت ما باشد. زیرا نژاد سنگسری در شرایط گرم آب و هوایی در طی اوایل فصل تولیدمثلی‌اش نگهداری می‌شود و این شرایط می‌تواند برای قوچ تنش‌زا باشد. بنابراین، ویتامین سی می‌تواند بعنوان یک ماده بسیار مفید برای افزایش مشخصات منی و بدنبال آن باروری منی منجمد استفاده شود.

سالامون و ماکسول (۱۹۹۵) نشان دادند که شوک سرما پس از سرمایش منی تا دمای اتاق بسیار سریع آغاز می‌شود (۳۵)، اگرچه برای منی قوچ دمای زیر ۱۵ درجه سانتی‌گراد بسیار حیاتی است (۱۶). گلیسرول، علی‌رغم ارزش محافظتی که در برابر سرما دارد، برای اسپرم ازنظر متابولیک سمی است، و برای تمامیت غشا اسپرم مضر است، که این اثر به غلظت و دمایی که به اسپرم اضافه می‌شود بستگی دارد (۱۶،۱۱).

پونت بریاند وهمکارانش (۱۹۸۹) گزارش کردند که اضافه کردن گلیسرول به منی رقیق‌شده اثرات تعیین‌کننده و مهمی بر تمامیت آکروزومی و تحرک اسپرم دارد (۳۴). در مطالعه دیگر ۶/۴ ٪ گلیسرول توانسته است برای رقیق‌سازی منی قوچ مفید باشد (۱۹). همچنین زمانیکه گلیسرول به رقیق‌کننده منی قوچ اضافه‌شده است، بالاترین درصد اسپرم متحرک در غلظت ۵٪ مشاهده‌شده است (۴۰). عبدالحکیم و همکارانش (۱۹۹۱) پیشنهاد کرده‌اند که ممکن است انجماد منی قوچ در نبود گلیسرول با تحرک پس از ذوب خوبی همراه باشد (۳). از طرفی در مطالعه دیگر، اضافه کردن غلظت‌های ۲ و ۴ درصد گلیسرول به رقیق‌کننده، موجب افزایش باروری شده است (۱۱). تحقیق انجام‌شده در سال ۲۰۱۳ نیز نتایجی تقریباً مشابه نتایج قدیمی‌تر در مورد درصد گلیسرول اضافه‌شده به رقیق‌کننده در قوچ را نشان داده، طوری که بهترین اثر بر اسپرم ذوب‌شده در میزان ۵٪ گلیسرول مشاهده‌شده است (۳۲). در مطالعه حاضر نیز اضافه کردن گلیسرول با غلظت ۵٪ موجب افزایش میزان زنده مانی و تحرک اسپرم شده است. در مطالعات اخیر بدلیل اثرات مستقیم آسیب سلولی ناشی از گلیسرول، سعی بر یافتن جایگزینی مناسب برای این ماده شده است. بطور مثال موستاکاس و همکارانش در سال ۲۰۱۱، درصدد جایگزینی گلیسیرول با دیمتیل فورمامید (Dimethilformamid) در قوچ شدند. این ماده، ماده‌ای آلی دارای خواص محافظتی اسپرم در برابر سرما است. نتایج این مطالعه همچنان نشان داد که گلیسرول ۵٪ بهترین ماده محافظت‌کننده اسپرم در برابر سرما در قوچ است (۳۰).

گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌های دارای اثرات محافظتی در برابر سرما به رقیق‌کننده‌ها ممکن است بصورت نسبی غلظت گلیسرول مورد استفاده را به ۳/۵، ۲/۵ و یا حتی ۲ درصد کاهش دهد (۲۷). همچنین افزودن ویتامین سی به رقیق‌کننده‌ها اثرات مهم گلیسرول بر مشخصات منی قوچ رقیق‌شده را افزایش نداده است (۴۰). در مقابل این نتیجه اخذ شده، ما نشان دادیم که اضافه کردن ویتامین سی به گلیسرول می‌تواند بر میزان زنده مانی و تحرک اسپرم مؤثر بوده و آن را بهبود بخشد.

درمجموع در نژاد سنگسری، استفاده از گلیسرول و ویتامین سی در رقیق‌کننده منی اثرات مثبتی بر مشخصات منی پس از ذوب داشته، و بهترین نتایج زمانی حاصل می‌شود که ترکیبی از گلیسرول با غلظت ۵٪ و ویتامین سی با دوز ۰/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر به رقیق‌کننده اضافه شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱- درویش نیا، ح.، شمس لاهیجانی، م.، آخوندی، م.م.، مبارکی، م.، و صادقی، م.ر.، ۱۳۸۷. اثرات انجماد به روش شیشه‌ای شدن بر تحرک، میزان قابلیت بقاء و واکنش آکروزومی خودبخودی اسپرم انسان، مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۱، شماره ۴، صفحات ۶۱۸-۶۲۹.

۲- عربی، م.، ۱۳۸۴. تأثیر غلظتهای مختلف از اسکوربات بر پارامترهای اسپرمی در گاو، مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۱۸، شماره ۳، صفحات ۱۹۱-۲۰۰.

3- Abdelhakeam, A.A., Graham, E.F., Vazquez, I.A., and Chaloner, K.M., 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Development of an extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. Cryobiology. 28, PP: 43-49.

4- 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, PP: 77-90.

5- Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L., and Storey, B.T., 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. Journal of Andrology. 8, PP: 338-348.

6- Asadpour, R., Jafari, R., and Tayefi-nasrabadi, H., 2011. Influence of Added Vitamin C and Vitamin E on Frozen-Thawed Bovine Sperm Cryopreserved in Citrate and Tris-Based Extenders. Veterinary Research Forum. 2, PP: 37-44.

7- Aurich, J.E., Schanherr, U., Hoppe, H., and Aurich, C., 1997. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. Theriogenology. 48, PP: 185-192.

8- Azawi, O.I., and Hussein, E.K., 2013. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 ˚C. Veterinary Research Forum. 4, PP: 157-160.

9- Bilodeau, J.F.O., Blanchette, S., Cormier, N., and Sirard, M.A., 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. Theriogenology. 57, PP: 1105-1122.

10- Chitra, K.C., Latchoumycandane, C.V., Mathur, P.P., 1999. Chronic effect of endosulfan on the testicular functions of rat. DNA. 1, PP: 1.35.

11- Colas, G., 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. Journal of reproduction and fertility. 42, PP: 277-285.

12- de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., and Gagnon, C., 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. Reviews of reproduction. 2, PP: 48-54.

13- El-Missiry, M.A., 1999. Enhanced testicular antioxidant system by ascorbic acid in alloxan diabetic rats. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 124, PP: 233-237.

14- Fahy, G.M., 1986. The relevance of cryoprotectant â€œtoxicityâ€ to cryobiology. Cryobiology. 23, PP: 1-13.

15- Fiser, P.S., Ainsworth, L., and Langford, G.A., 1981. Effect of osmolality of skim-milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. Cryobiology. 18, PP: 399-403.

16- Fiser, P.S., and Fairfull, R.W., 1986. Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. Theriogenology. 25, PP: 473-484.

17- Fiser, P.S., and Fairfull, R.W., 1989. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. Cryobiology. 26, PP: 64-69.

18- Fraga, C.G., Motchnik, P.A., Shigenaga, M.K., Helbock, H.J., Jacob, R.A., and Ames, B.N., 1991. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. Proceedings of the National Academy of Sciences. 88, PP: 11003-11006.

19- Gil, J., Lundeheim, N., Saderquist, L., and Rodraguez-Martanez, H., 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol

www.SID.ir

Archive of SID

on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology. 59, PP: 1241-1255.

20- Griveau, J.F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J.P., and Le Lannou, D., 1995. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. Journal of reproduction and fertility. 103, PP: 17-26.

21- Hughes, C.M., Lewis, S.E., and McKelvey-Martin, V.J., 1998. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. Human Reproduction. 13, PP: 1240-1247.

22- Kheradmand, A., Babaei, H., and Abshenas, J., 2006. Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen. Iranian Journal of Veterinary Research. 7, PP: 40-45.

23- Lewis, S.E.M., Sterling, E.S.L., Young, I.S., and Thompson, W., 1997. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fertility and sterility. 67, PP: 142-147.

24- Maia, M.S., Bicudo, S.D., and Azevedo, H.C., 2009. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. Small Ruminant Research. 85, PP: 85-90.

25- Maia, M.S., Bicudo, S.D., and Sicherle, C.C., 2010. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with anti-oxidants. Small Ruminant Research. 122, PP: 118-123.

26- Maxwell, W.M., and Salamon, S., 1993. Liquid storage of ram semen: a review. Reproduction, fertility and development. 5, PP: 613-638.

27- Milovanov, V.K., Varnavskaja, V.A., and Shajdullin, I.N., 1985. Medium for deep freezing of semen, Zhivotnovodstvo, 39-41.

28- Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Alvarez, M., Anel, L., de Paz, P., Garde, J.J., and Martínez-Pastor, F., 2012. Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted to 37 C up to four hours.Reproduction in domestic animals. 47, PP: 907-914.

29- Molinia, F.C., Evans, G., and Maxwell, W.M.C., 1994. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. Theriogenology. 42, PP: 849-858.

30- Moustacas, V.S., Cruz, B.C., Varago, F.C., Miranda, D.A., Lage, P.G., Henry, M., 2011. Extenders containing dimethylformamide associated or not with glycerol are ineffective for ovine sperm cryopreservation. Reproduction in domestic animals. 46(5), PP: 924-925.

31- Nair, S.J., Brar, A.S., Ahuja, C.S., Sangha, S.P.S., and Chaudhary, K.C., 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, PP: 21-29.

32- Najafi, A., Zhandi, M., Towhidi, A., Sharafi, M., Sharif, A.A., Motlagh, M.K., and Martinez-Pastor, F., 2013. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. Cryobiology. 66(3), PP: 275-282.

33- O'Flaherty, C., Beconi, M., and Beorlegui, N., 1997. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozenathawed bull spermatozoa. Andrologia. 29, PP: 269-275.

34- Pontbriand, D., Howard, J.G., Schiewe, M.C., Stuart, L.D., and Wildt, D.E., 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. Cryobiology. 26, PP: 341-354.

35- Salamon, S., and Maxwell, W.M.C., 1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. Animal Reproduction Science. 38, PP: 1-36.

36- Sanchez-Partida, L.G., Setchell, B.P., and Maxwell, W.M., 1997. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. Reproduction, fertility, and development. 9, 689 p.

37- Schmehl, M.K., Vazquez, I.A., and Graham, E.F., 1986. The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to TEST-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. Cryobiology. 23, PP: 512-517.

38- Sharma, R.K., and Agarwal, A., 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology. 48, PP: 835-850.

39- Singh, B., Chand, D., and Singh, P., 1996. Effect of vitamin C addition in the diluent on the quality of deep frozen Murrah buffalo bull (*Bubalus bubalis*) semen. International Journal of Animal Science. 11, PP:131-132.

40- Sonmez, M., and Demirci, E., 2004. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen

www.SID.ir

Archive of SID

diluted with extenders containing different proportions of glycerol. Turkish Journal of Animal Science. 28, PP: 893-899.

41- Sönmez, M., Türk, G., and Yüce, A., 2005. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. Theriogenology. 63(7), PP: 2063-2072.

42- Tosic, J., 1947. Mechanism of hydrogen peroxide formation by spermatozoa and the role of amino-acids in sperm motility. Nature. 159, PP: 544.

43- Wang, A.W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D.J., and Loughlin, K.R., 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. Urology. 49, PP: 921-925.

44- Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science. 60, PP: 481-492.

The effect of Vitamin C and Glycerol on Post-Thaw Spermatological Characteristics of Sangsari Ram Semen

Narenji Sani R.

Clinical Sciences Dept., Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, I.R. of Iran

Abstract

Sangsari sheep is one of the most important meat producer sheep breed in center of Iran. Therefore, it is necessary to protect this breed via frozen semen. On the other hand, the reason of low fertility due to semen freezing is lipidperoxidase formation in the presence of oxygen radicals. So, this study was conducted to investigate the effects of vitamin C and glycerol on spermatological characteristics in Sangsari ram semen. Five Sangsari rams were used. Semen of each ram was collected by elecrtoejaculator one every three days and pooled after spermatological characteristics of the collected semen samples were determined. Pooled and diluted semen was cooled to + 4° Cover 2 h. Cooled semen was divided into 15 groups. Each of semen groups was diluted at 1:1 ratio with one of the extender groups containing different proportions of glycerol (0%, 1%, 3%, 5%, and 7%) and vitamin C (0, 0.15, 0.3 mg/ml). After freezing the semen was thawed. This study shows that vitamin C and glycerol affect sperm Characteristics significantly. In combinative treatment groups, 0.3 mg/ml vitamin C plus 5% glycerol has the highest sperm motility and live spermatozoa rate. The highest live spermatozoa rate simple groups is in 0.3 mg/ml vitamin C treatment group. In conclusion, the best combination for semen dilution in Sangsari ram is that of 0.3 mg/ml vitamin C and 5% glycerol.

Key words: Glycerol, Freezing, Sangsari Ram, Semen, Vitamin C

www.SID.ir