اثر غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک بر انجمادپذیری اسپرم بز کردی

سیدمحمدجواد علوی[۱]، حمید کهرام[۲]، سعید زین‌الدینی[۲] و حمیدرضا نائیجیان[۳*]

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۵

چکیده

در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک (۰، ۲/۵، ۴/۵، ۶/۵ و ۸/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بر فرآیند انجماد و یخ‌گشایی اسپرم بز کردی بررسی شد. نمونه‌های منی توسط واژن مصنوعی از ۴ رأس بز نر بالغ، هفته‌ای ۲ بار جمع‌آوری شد. نمونه‌های منی رقیق شده در معرض بخار ازت منجمد و در تانک حاوی ازت مایع ذخیره شد و سپس یخ‌گشایی پایوت‌های حاوی اسپرم در آب گرم ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. تحرک کل و تحرک پیشرونده‌ی اسپرم با کمک سامانه‌ی آنالیز رایانه‌ای اسپرم (CASA) اندازه‌گیری شد. سلامت غشا، درصد اسپرم‌های زنده و مورفولوژی اسپرم‌ها و غلظت مالون‌دی‌آلدهاید بعد از فرآیند یخ‌گشایی اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که رقیق‌کننده‌ی اسپرم بز حاوی ۴/۵ و ۶/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسید آسکوربیک در مقایسه‌ی با گروه شاهد موجب بهبود در میزان تحرک ($p<۰/۰۱$)، تحرک پیشرونده ($p<۰/۰۵$) و درصد اسپرم‌های زنده شد ($p<۰/۰۱$). سطوح مختلف اسید آسکوربیک اثر معنی‌داری روی سلامت غشا، مورفولوژی و مالون‌دی‌آلدهاید اسپرم‌ها نداشتند ($p>۰/۰۵$). مطابق با نتایج این پژوهش افزودن سطوح ۴/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسید آسکوربیک به رقیق‌کننده‌های انجماد اسپرم بز کردی باعث بهبود معنی‌دار فراسنجه‌های اسپرم از جمله تحرک و درصد اسپرم‌های زنده می‌شود.

کلمات کلیدی: اسید آسکوربیک، رقیق کننده، اسپرم منجمد، بز کردی

مقدمه

انجماد منی پستانداران، تحولی اساسی در نگهداری منی و حفاظت از انجماد سلول اسپرم به وجود آورده و راهی برای حفظ پروتوپلاسم سلول جنسی می‌باشد که می‌تواند با حفظ DNA گونه‌ها، در دامپروری، آبزی‌پروری و حفظ تنوع زیستی کاربرد زیادی داشته باشد و بانک‌های ذخیره‌ی اسپرم می‌توانند همراه با دیگر فن‌آوری‌های تولیدمثلی، در بهبود نژادها و حفاظت گونه‌های وحشی و بومی درحال انقراض، نقش مهمی داشته باشند. هم‌چنین با انجماد اسپرم، امکان قرنطینه کردن آن، انتقال به فاصله‌های خیلی دور، کنترل بیماری‌ها و حفظ بانک‌های ژنتیکی ممکن می‌گردد (Maxwell and Salamon 1993) . با استفاده از انجماد اسپرم‌ها و تکنیک‌های تولیدمثلی، بسیاری از مشکلات باروری حیوانات آزمایشگاهی، دامی و انسانی قابل حل می‌باشد (Leboeuf et al. 2000). به طور کلی، کیفیت اسپرم یخ‌گشایی شده از روی شاخص‌های مهمی مانند تحرک (Purdi 2006)، درصد اسپرم‌های زنده و سلامت آکروزوم آن‌ها ارزیابی می‌شود. در زمان انجماد سلول‌های اسپرم، عوامل متعددی مانند پلاسمای منی، ترکیب شیمیایی رقیق‌کننده، نوع و غلظت حفاظت‌کننده-های انجمادی، دمای نگهداری، میزان سردسازی، دوره‌ی متعادل‌سازی، روش انجماد و یخ‌گشایی، گروه‌های واکنش اکسیژنی (ROS) و تعادل بین این عوامل می‌تواند بر کیفیت اسپرم‌های منجمد مؤثر باشد (Leboeuf et al. 2000). طی حفاظت انجمادی، اسپرم در معرض شوک سرمایی و فشار

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع‌طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

[۲] استادیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

[۳*] باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران E-mail: hamid_naijian@ut.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

اسمزی قرار می‌گیرد و در نتیجه میزان اکسیداسیون غشا به واسطه‌ی درصد بیش‌تر واکنش‌های اکسیداتیو افزایش می‌یابد که این امر نهایتاً زنده ماندن و عمر اسپرم را کاهش می‌دهد. سلول‌های اسپرم دارای مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشند و نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع در غشای اسپرم نشخوارکنندگان کوچک نسبت به دیگر گونه‌ها بالاتر است که همین امر غشای آن‌ها را به آسیب‌های پراکسیداتیو در حضور ROS مستعد می‌سازد. اسید آسکوربیک به عنوان اولین خط دفاعی آنتی‌اکسیدانی در خون و پلاسمای مایع اسپرمی مطرح بوده و موجب مهار روند اکسیداسیون لیپوپروتئین-ها می‌شود. در حدود ۶۵ درصد از توان آنتی‌اکسیدانی پلاسمای مایع اسپرمی افراد بارور مربوط به این ویتامین است (Donnelly et al. 1999)؛ زیرا غلظت آن در پلاسمای مایع اسپرمی حدود ۱۰ برابر پلاسمای خون است (Hu et al. 2010). طی تحقیقی که در سال ۱۹۷۷ انجام شد مشخص شد که حضور ROS در پلاسمای مایع اسپرمی موجب کاهش معنی‌دار غلظت اسید آسکوربیک می‌گردد (Leboeuf et al. 2000). اسید آسکوربیک با کاهش آسیب سلولی از طریق جذب ROS می‌تواند باعث عملکرد بهینه‌ی اسپرم در رقیق‌کننده شود. هم‌چنین اسید آسکوربیک از فعالیت رادیکال‌های پروکسیل جلوگیری می‌کند که با این کار از آسیب DNA اسپرم ممانعت به عمل می‌آورد (Hu et al. 2010). هدف از این پژوهش بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی سطوح مختلف اسید آسکوربیک (۰، ۲/۵، ۴/۵، ۶/۵ و ۸/۵ میلی‌گرم در میلی-لیتر) در فرآیند نگهداری اسپرم به صورت منجمد و تأثیر آن بر پارامترهای مربوط به منی بز کردی می‌باشد.

مواد و روش کار

در این تحقیق از منی ۴ رأس بز نژاد کردی، ۴-۳ سال و متوسط وزن۵۰-۶۵ کیلوگرم در ایستگاه پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (واقع در جنوب غربی کرج) استفاده شد. جمع‌آوری منی بزهای آموزش دیده به صورت هفته‌ای ۲ بار و در فصل تولید مثلی (اواخر شهریور تا اواسط دی ماه) صورت گرفت. نمونه‌های منی به وسیله‌ی مهبل مصنوعی از بزهای مورد آزمایش جمع‌آوری و در داخل فلاسک آب گرم ۳۷ درجه قرار داده شد و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و بررسی‌های اولیه انجام گردید. میانگین حجم انزال‌ها ۲- ۰/۷۵ میلی‌لیتر، میزان غلظت به طور متوسط $۲/۵\times۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک بیش‌تر از ۷۰ درصد و تعداد اسپرم غیرطبیعی کم‌تر از ۱۰ درصد، در هر انزال به عنوان اسپرم طبیعی محاسبه گردید. از نمونه‌های منی هر دام به یک مقدار مساوی در یک لوله‌ی آزمایش مجزا ریخته شد و با توجه به احتمال اثرات متقابل بین نمونه‌ها، نمونه‌های منی با هم مخلوط شد و این نمونه‌های مخلوط شده نیز از نظر رنگ و تحرک تقریبی ارزیابی مجدد گردید تا از سلامت نمونه برای انجماد اطمینان حاصل شود. رقیق-کننده، یک محیط بر پایه‌ی تریس بود. محیط پایه‌ی مورد استفاده شامل تریس (۳۰/۷ گرم/لیتر)، اسید سیتریک (۱۶/۴ گرم/لیتر)، فروکتوز (۱۲/۶ گرم/لیتر)، زرده تخم‌مرغ (۱۵ درصد)، گلیسرول (۵ درصد، V/V) و جنتامایسین (۰/۶ گرم/لیتر) بود. کلیه‌ی مواد مصرفی این آزمایش از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شدند. اسمولاریتی محیط پایه ۴۲۵ میلی‌اسمول و pH آن ۶/۸ تنظیم شد. تیمارهای آزمایشی حاوی ۴ سطح (۰، ۲/۵، ۴/۵، ۶/۵ و ۸/۵ میلی-گرم در میلی‌لیتر) اسید آسکوربیک بوده‌اند. رقیق‌کننده بدون اسید آسکوربیک به عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت (Bucak et al. 2009).

انجماد

رقیق‌سازی منی به نسبت ۱ به ۱۰ صورت گرفته است؛ یعنی ۱ سی‌سی اسپرم و ۱۰ سی‌سی رقیق‌کننده و در داخل هر پایوت هم حدوداً ۴۰ میلیون اسپرم از لحاظ حجمی کشیده می‌شود. برای انجماد ابتدا نمونه‌های آزمایشی در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری بسته‌بندی شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس

از طی دوره‌ی تعادل، پایوت‌ها در فاصله‌ی ۴ سانتی‌متری از سطح ازت مایع به مدت ۱۵ دقیقه در معرض بخار ازت مایع منجمد و سپس در ازت مایع غوطه‌ور و برای نگهداری به تانک ازت منتقل شدند (Bucak et al. 2007).

یخ‌گشایی منی

برای ذوب منی، پس از خارج کردن پایوت‌های حاوی منی از ازت، پایوت‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه در داخل آب گرم ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده و سپس پایوت‌ها به داخل لوله‌های اپندورف تخلیه شدند (Ijaz et al. 2009).

ارزیابی اسپرم‌ها پس از ذوب شدن

تحرک

اولین فراسنجه‌ی مورد ارزیابی در این تحقیق بررسی تحرک اسپرم پس از ذوب شدن بود. به این منظور ۳ پایوت از هر گروه تیماری با روشی که در بالا توضیح داده شد ذوب شد و به داخل لوله‌های اپیندورف انتقال داده شدند؛ سپس با استفاده از سمپلر متغیر و با برداشتن ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام و گذاشتن یک لامل تمیز روی آن، لام مورد نظر با استفاده از سیستم آنالیز اسپرم کامپیوتری (CASA) ثبت گردید. میکروسکوپ CASA مورد استفاده از شرکت سامسونگ و کشور کره جنوبی می‌باشد. در این آزمایش پارامترهای ارزیابی تحرک مانند درصد کل اسپرم‌های متحرک و درصد اسپرم‌های پیش‌رونده محاسبه گردید (Bucak et al. 2010).

سلامت غشا

در این مطالعه برای بررسی سلامت غشای اسپرم‌ها از محلول هیپواسموتیک استفاده شد. در این آزمایش از محیط با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی‌اسمولار استفاده گردید. فشار اسمزی طبیعی برای اسپرم‌های بز ۴۲۵ میلی‌اسمولار در لیتر است. واکنش اسپرم‌ها به محیط هیپواسمول به صورت تورم دم می‌باشد. در این حالت اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالمی دارند به محلول واکنش می‌دهند، ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. در واقع پس از این آزمایش اسپرم‌های با دم گره خورده به عنوان اسپرم‌های زنده و اسپرم‌هایی که دم آن‌ها صاف است به عنوان اسپرم مرده تلقی می‌شوند. در تحقیق حاضر آزمایش تورم هیپواسموتیک مطابق با روش Revell و Mrode در سال ۱۹۹۴ انجام شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسپرم ذوب شده با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هیپواسموتیک دارای فشار اسمزی ۱۰۰ میلی‌اسمولار که حاوی فروکتوز (۹ گرم/لیتر) و سیترات سدیم (۴/۹ گرم/لیتر) بود مخلوط گردید سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه‌ی حداقل ۳ قطره از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. بررسی میکروسکوپی با استفاده از یک صفحه‌ی گرم در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ صورت گرفت. در هر گروه تیماری حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای غشای یک‌پارچه محاسبه شد (Holt 2000, Purdi 2006).

رنگ‌آمیزی حیاتی

برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین- نیگروزین استفاده گردید. مواد تشکیل دهنده‌ی این محیط شامل رنگ ائوزین (۱۶/۷ گرم/لیتر)، رنگ نیگروزین (۱۰۰ گرم/لیتر) و سیترات سدیم (۲۹ گرم/لیتر) می‌باشد. اساس این رنگ‌آمیزی بدین صورت است که رنگ ائوزین به داخل اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند، در حالی که اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی، ۲۰µl از نمونه‌ی اسپرم برداشته شد و روی لام قرار گرفت و ۲۰µl از رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین به آن اضافه گردید. سپس با سر سمپلر به آرامی نمونه را هم زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ۳۰ ثانیه ۲۰µl از نمونه برداشته و در گوشه‌ی

لام دیگری گذاشته شد و با یک لام دیگر روی آن به آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن، لام زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ قرار داده شد و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کم رنگ به خود گرفته یا تنها بخشی از گردن آن‌ها رنگ گرفته بود نیز به عنوان اسپرم مرده در نظر گرفته شد (Evans and Maxwell 1987).

مورفولوژی

برای ارزیابی اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی ۱ سی‌سی محلول هانکوک که شامل فرمالین ۳۷٪ (۶۲/۵ میلی‌لیتر)، محلول سالین (۱۵۰ میلی‌لیتر)، محلول بافر هانکوک (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دو بار تقطیر (۵۰۰ میلی‌لیتر) می‌باشد، افزوده شد و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار داده شد و توسط یک لامل پوشانده شد و با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوا زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه شد. میانگین سه مشاهده به عنوان یک داده واحد در نظر گرفته شده است (Schafer and Holzmann 2000).

اندازه‌گیری سطح مالون‌دی‌آلدهاید

برای اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهاید که نشان‌دهنده‌ی لیپیدپراکسیداسیون در نمونه‌های اسپرم است از آزمایش اسید تیوباربیتوریک طبق روش یوشیکا و همکاران استفاده شد (Esterbauer and Cheeseman 1990). این آزمایش در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه تهران انجام شد. مراحل این آزمایش به این شرح است:

مرحله ۱: تهیه محلول‌ها

الف) محلول ۰/۶۷ درصد (وزنی/حجمی) اسید تیوباربیتوریک

مقدار ۰/۱۳۴ گرم اسید تیوباربیتویک اسید در ۲۰ سی‌سی آب دوبار تقطیر برای مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد حل شد.

ب) محلول ۱۰ درصد تری‌کلرواستیک اسید

مقدار ۳ گرم TCA در ۳۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد.

ج) محلول‌های BHT و EDTA

مقدار ۰/۰۳۷ گرم EDTA در ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد.

مقدار ۰/۲ گرم BHT در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول حل شد.

مرحله ۲: یک میلی‌لیتر از هر نمونه‌ی منی با یک میلی‌لیتر EDTA، یک میلی‌لیتر BHT و ۲ میلی‌لیتر TCA با هم مخلوط شده و به داخل فالکون ریخته شدند.

مرحله ۳: فالکون‌ها در ۱۲۰۰×g برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

مرحله ۴: پس از سانتریفیوژ شدن، یک میلی‌لیتر از محلول بالای فالکون‌ها با یک میلی‌لیتر TBA در میکروتیوب، آمیخته شدند.

مرحله ۵: فالکون‌ها برای مدت ۲۰ دقیقه در Hot Plate ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند.

مرحله ۶: نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند و سپس جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر (با اسپکتروفتومتر) اندازه‌گیری شد.

تحلیل آماری

این مطالعه ۵ مرتبه تکرار شد. داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی و بر اساس مدل‌های آماری زیر به کمک رویه Proc GLM نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند و میانگین‌ها به روش دانکن مقایسه شدند.

$$y_{ijk}= \mu + a_i + e_{ij}$$

Y: خصوصیات کمی و کیفی اسپرم μ:میانگین جامعه α i: اثر سطوح مختلف اسید آسکوربیک eij: اثر باقیمانده

نتایج

ویژگی‌های اسپرم در جدول ۱ نشان داده شده است، رقیق‌کننده‌ی حاوی سطوح مختلف اسید آسکوربیک نسبت به شاهد باعث تغییر صفات تحرک، تحرک پیشرونده و درصد اسپرم‌های زنده پس از انجماد و یخ‌گشایی می‌شود. در بین غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک سطوح ۴/۵ و ۶/۵ میلی‌گرم باعث افزایش معنی‌دار در میزان تحرک (p<۰/۰۱)، درصد اسپرم‌های پیشرونده (p<۰/۰۵) و اسپرم‌های زنده در مقایسه با گروه شاهد و سایر غلظت‌های اسید آسکوربیک شده است (p<۰/۰۱). هم‌چنین نتایج حاصل از آنالیز داده‌های آزمایش یکپارچگی غشاء و مورفولوژی نشان می‌دهد که هیچ اختلاف معنی‌داری در بین هیچ یک از غلظت‌های اسید آسکوربیک مشاهده نشده است (p>۰/۰۵).

جدول ۱: اثر اسید آسکوربیک (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بر ویژگی‌های کیفی منی بز کردی پس از انجماد- یخ‌گشایی

صفات اسپرم (درصد)	شاهد (۰)	۲/۵	۴/۵	۶/۵	۸/۵	سطح معنی‌داری	SEM
تحرک	۴۴/۶۰^{b}	۴۷/۴۰^{b}	۵۴/۲۰^{a}	۵۲/۲۰^{a}	۴۶/۴۰^{b}	۰/۰۱	۱/۲۳
پیشرونده	۲۳/۲۰^{b}	۲۴/۲۰^{b}	۳۲/۴۰^{a}	۲۷/۰۰^{ab}	۲۳/۸۰^{b}	۰/۰۵	۲/۱۸
اسپرم زنده	۵۰/۶۰^{c}	۵۲/۸۰^{c}	۶۱/۶۰^{a}	۵۸/۴۰^{b}	۵۳/۶۰^{c}	۰/۰۱	۱/۰۱
سلامت غشاء	۴۳/۸۰	۴۴/۴۰	۴۶/۴۰	۴۵/۸۰	۴۴/۶۰	۰/۲۷	۰/۹۱
اسپرم ناهنجار	۲۲/۴۰	۲۱/۸۰	۲۰/۴۰	۱۹/۴۰	۲۰/۲۰	۰/۴۱	۱/۲۰

حروف بالانویس غیرمشابه نشان دهنده‌ی تفاوت میانگین سطوح (با سطح احتمال ۱ و ۵ درصد) در هر ردیف می‌باشد.

نتایج حاصل از لیپیدپراکسیداسیون تیمارهای آزمایشی در جدول ۲ نمایش داده شده است. همان طور که نشان داده شده است سطوح مختلف اسید آسکوربیک تأثیر معنی‌داری بر کاهش میزان لیپیدپراکسیداسیون نداشته است، ولی در مقایسه با شاهد توانسته به میزان کمی لیپیدپراکسیداسیون را کاهش دهد (p>۰/۰۵).

جدول ۲: اثر اسید آسکوربیک (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بر میزان لیپیدپراکسیداسیون اسپرم منجمد بز کردی پس از یخ‌گشایی

صفت (نانومول / میلی‌لیتر)	شاهد	۲/۵	۴/۵	۶/۵	۸/۵	سطح معنی‌داری	SEM
مالون‌دی‌آلدهاید	۱/۸۴	۱/۷۶	۱/۶۲	۱/۶۵	۱/۸۲	۰/۲۴	۰/۰۷

نتایج حاصل آنالیز کامپیوتری (CASA) مرتبط با تحرک در جدول ۳ نشان داده شده است. در بین ویژگی‌های CASA اختلاف معنی‌داری در بین سطوح مختلف اسید آسکوربیک مشاهده نشد (p<۰/۰۵).

جدول ۳: مقایسه‌ی ویژگی‌های حرکتی مربوط به CASA در بین سطوح آزمایشی اسید آسکوربیک (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

صفات اسپرم	شاهد (۰)	۲/۵	۴/۵	۶/۵	۸/۵	سطح معنی داری	SEM
سرعت در مسیر میانگین	۸۲/۳۴	۸۵/۲۲	۹۰/۱۰	۸۵/۲۴	۸۴/۰۲	۰/۶۹	۳/۶۵
سرعت در مسیر مستقیم	۶۶/۹۲	۶۹/۶۰	۷۵/۷۸	۶۸/۷۸	۶۸/۱۸	۰/۵۶	۳/۹۸
جنبایی عرضی سر	۵/۲۰	۵/۲۴	۴/۹۲	۵/۱۲	۵/۳۲	۰/۷۰	۰/۲۰
خطی بودن جنبایی	۵۶/۰۰	۵۷/۸۰	۶۲/۶۰	۵۸/۴۰	۵۶/۰۰	۰/۴۹	۲/۸۸

بحث

تحرک، درصد اسپرم زنده و سلامت آکروزوم اسپرم، عوامل تعیین کننده‌ی در کیفیت اسپرم پس از ذوب می‌باشند (Holt et al. 2000). تنش‌های ناشی از فرآیند ذوب می‌توانند باعث آسیب‌های متعددی در ساختار اسپرم شوند که در نتیجه‌ی آن غشای پلاسمایی، سیتوپلاسم و نیز ساختار ژنومی اسپرم‌ها به شدت آسیب می‌بیند و در نهایت ممکن است باعث کاهش سلامت غشای پلاسمایی و آکروزومی، تحرک، باروری و تعداد اسپرم‌های زنده شود (Leboeuf et al. 2000). اسید آسکوربیک در مطالعات مختلفی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان که سازوکارهای آن هنوز شناخته نشده است، بررسی شده است و نشان داده شده است که می‌تواند مانع از پرکسیداسیون لیپیدهای غشایی گردد. در تحقیق حاضر مشاهده گردید که سطوح ۴/۵ و ۶/۵ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در رقیق‌کننده‌های انجماد بز می‌تواند به طور معنی‌داری باعث بهبود کیفیت اسپرم بز پس از فرایند انجماد-ذوب گردد. در خصوص با اثرات حفاظتی اسید آسکوربیک بر اسپرم در حین فرایند انجماد-ذوب منابع مختلفی در دسترس می‌باشد. تخریب غشای پلاسمایی اسپرم یکی از دلایل کاهش باروری و جنبایی سلول‌های اسپرم در طول فرایند حفاظت انجمادی می‌باشد. هم‌چنین حفاظت انجمادی منجر به تغییرات DNA، سیتواسکلت اسپرم، مهار اتصال اسپرم به تخمک و تخریب آکسونم اسپرم شود که منجر به کاهش تحرک آن می‌شود. اسید آسکوربیک به عنوان اولین خط دفاعی آنتی‌اکسیدانی در خون و پلاسمای مایع اسپرمی مطرح است و موجب مهار روند اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها می‌شود (Pursel and Graham 1967). اسید آسکوربیک با کاهش آسیب سلولی از طریق جذب ROS می‌تواند باعث عملکرد بهینه‌ی اسپرم در رقیق‌کننده شود. هم‌چنین اسید آسکوربیک از فعالیت رادیکال‌های پروکسیل جلوگیری می‌کند که با این کار از آسیب DNA اسپرم می‌شود. سمیت پایین و حلالیت خوب اسید آسکوربیک در آب موجب شده است تا به عنوان آنتی‌اکسیدان استفاده شود (Neill et al. 1987). در این بررسی نشان داده شد که سطوح ۴/۵ و ۶/۵ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در رقیق‌کننده‌های انجماد بز می‌تواند به طور معنی‌داری باعث بهبود کیفیت اسپرم بز بعد از فرایند انجماد-ذوب گردد. نتایج این آزمایش با گزارش Johnson و همکاران در سال ۲۰۰۰ مطابقت دارد که در یک آزمایش با هدف بررسی اثر سطوح مختلف اسید آسکوربیک روی انجماد اسپرم گاو نشان دادند که میزان تحرک پیشرونده در سطوح ۴/۵ میلی‌گرم نسبت به سایر سطوح بالاتر بوده است. هم‌چنین نتایج این آزمایش با نتایج آزمایش بکونی و همکاران (Beconi et al. 1993)، Perez و همکاران در سال ۱۹۹۶ و Mirzoyan و همکاران در سال ۲۰۰۶ مطابقت دارد. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که افزودن اسید آسکوربیک به رقیق کننده باعث کاهش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود. در مطالعه‌ی حاضر بالاترین غلظت اسید آسکوربیک به طور معنی‌داری پارامترهای جنبایی و جنبایی پیشرونده را کاهش داد، که بر این اساس استنباط می‌شود که افزودن بیش از اندازه‌ی اسید آسکوربیک همانند دیگر آنتی-اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده باعث تغییر خصوصیات غشای پلاسما شود که امکان لیپیدپراکسیداسیون را فراهم می‌کند که در سیالیت غشا اثر می‌گذارد و باعث تولید رادیکال-های آزاد می‌شود (Naijian et al. 2013). تأثیرات سودمند اسید آسکوربیک را می‌توان به این واقعیت نسبت داد که یک آنتی‌اکسیدان بسیار مؤثر در کاهش رادیکال-های آزادی است که به وسیله‌ی فرآیندهای متابولیسمی تولید می‌شود. در بررسی حاضر سطوح مختلف اسید آسکوربیک به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد باعث افزایش زنده‌مانی اسپرم شده است، ولی با افزودن سطح ۸/۵ میلی‌گرم زنده‌مانی کاهش یافت که نشان دهنده این است که آنتی اکسیدان هم تا حدی می‌تواند برای اسپرم

مفید باشد و اگر از مقداری بیش‌تر شود خواص مضر خواهد داشت. این نتایج ممکن است بر اساس این واقعیت باشد که اسید آسکوربیک دفاع مؤثری علیه رادیکال پروکسیل است و می‌تواند از آسیب اکسیداتیو به DNA اسپرم جلوگیری کند و توانایی اسپرم بز را به شوک سرمایی تنظیم و سرانجام بقای انجمادی اسپرم بز را افزایش دهد.

نتیجه‌گیری کلی

افزودن اسید آسکوربیک در سطح ۴/۵ میلی‌گرم در رقیق‌کننده بر پایه‌ی تریس باعث بهبود معنی‌دار کیفیت اسپرم بز کردی بعد از فرایند ذوب شدن می‌شود.

منابع

Beconi, M.T.; Francia, C.R.; Mora, N.G. and Affranchino, M.A. (1993). Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. Theriogenology, 40: 841–851.

Bucak, M.N.; Atessahin, A.; Varıslı, O.; Yuce, A.; Tekin, N. and Akcay, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. Theriogenology, 67: 1060–1067.

Bucak, M.N.; Sarıözkan, S.; Tuncer, P.B.; Sakin, F.; Atessahin, A.; Kulaksız, R. et al. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircusancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. Small Ruminant Research, 89: 24-30.

Bucak, M.N.; Tuncer, P.B.; Sarıözkan, S.; Ulutas, P.A.; Çoyan, K.; Baspınar, N. et al. (2009). Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thawmicroscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. Research in Veterinary Science, 87: 468–472.

Donnelly, E.T.; McClure, N. and Lewis, S.E.M. (1999). Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. Fertility and Sterility, 72: 484-495.

Esterbauer, H. and Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in Enzymology, 186: 407-421.

Evans, G. and Maxwell, W.M.C. (1987). Handling and examination semen. In:Maxwell WMC, editor. Salamon's artificial insemination ofsheep and goat. Sydney: Butterworths, pp: 93–106.

Holt, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science, 62: 3-22.

Hu, J.H.; Tian, W.Q.; Zhao, X.L.; Zan, L.S.; Wang, H.; Li, Q.W. et al. (2010). The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. Animal Reproduction Science, 121: 72- 79.

Ijaz, A.; Hussain, A.; Aleem, M.; Yousaf, M.S. and Rehman, H. (2009). Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-ravi buffalo. Theriogenology, 71:1326-1329.

Johnson, L.A.; Weitze, K.F.; Fiser, P. and Maxwell, W.M. (2000). Storage of boar semen. Animal Reproduction Science, 62: 143–172.

Leboeuf, B.; Restall, B. and Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. Animal Reproduction Science, 62: 113-141.

Maxwell, W.M. and Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: a review. Reproduction and Fertility Development, 5: 613–638.

Mirzoyan, A.V.; Nebesikhina, N.A.; Voynova, N.V. and Chistyakov, V.A. (2006). Preliminary results on ascorbic acid and lysine suppression of clasto-genic effect of deep-frozen sperm of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*). Journal of Refrigation. 29: 374-378.

Naijian, H.R.; Kohram, H.; Zare, H. and Sharafi, M. and Bucak, M.N. (2013). Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process. Cryobiology, 66: 151–155.

Neill, J.M. and Olds-Clarke, P. (1987). A computer-assisted assay for mouse sperm hyperacti-vation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. Gamete Research, 18: 121-140.

Perez, L.J.; Valcarcel, A.; Heras, M.A.; Moses, D.F. and Baldassarre, H. (1996). In vitro capacitation andinduction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. Theriogenology, 45: 1037–46.

Purdi, P.H. (2006). A review on goat cryopreservation. Small Ruminant Research. 63, 215-225.

Pursel, V.G. and Graham, E.F. (1967). Phospholipids of bovine spermatozoa and seminal plasma. Journal of Reproduction and Fertility, 14: 203–211.

Revell, S.G. and Mrode, R.A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science, 36: 77–86.

Schafer, S. and Holzmann, A. (2000). The use of transmigration and spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. Animal Reproduction Science, 59: 201–211.

The effects of different concentrations of ascorbic acid on freezability of Kordi goat spermatozoa

Alavi, S.M.J.[1]; Kohram, H.[2]; Zeinoaldini, S.[2] and Naijian, H.R.[3]

Received: 25.04.2013 Accepted: 24.02.2014

Abstract

This study was designed to investigate the effects of different concentrations of ascorbic acid (0, 2.5, 4.5, 6.5 and 8.5 mg/ml) on freezing of the Kordi goat spermatozoa. Semen samples were collected by an artificial vagina, twice a week from four pubertal goat. The extender containing semen was frozen in liquid nitrogen and then was stored until using for assessment. Semen was thawed at 37°C and then motility and progressive motility were assessed by CASA. membrane integrity, viability and morphology of sperms were assessed and malondialdehiyde (MDA) concentration was measured. The results of this experiment showed that extender containing 4.5 and 6.5 mg ascorbic acid significantly improved motility ($P<0.01$), progressive motility ($P<0.05$) and viability compare to control treatment ($P<0.01$). Membrane integrity, morphology and malondialdehiyde were not affected significantly by the different level of ascorbic acid ($P>0.05$). It can be concluded that adding 4.5 mg/ml ascorbic acid in to goat extender is suitable for preservation of sperm and its fertility.

Key words: Ascorbic acid, Extender, Frozen sperm, Kordi goat

1- MSc Graduated in Animal Sciences, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3- Young Researchers Club and Elites, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Corresponding Author: Naijian, H.R., E-mail: hamid_naijian@ut.ac.ir