دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف ویتامین E و سلنیوم در رقیق‌کننده تریس بر کیفیت اسپرم قوچ عربی

پروانه محمدی[۱]، صالح طباطبائی وکیلی[۲]، مرتضی مموئی[۳]، جمال فیاضی[۳] و مهدی زارعی[۴]

۱ و ۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
۲- استادیار، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، (نویسنده مسوول: s_tabatabaei58@yahoo.com)
۴- دانشیار، دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۸

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین E و سلنیوم در رقیق‌کننده تریس بر خصوصیات اسپرم قوچ نژاد عربی نوشته شده است. اسپرم‌گیری از هشت رأس قوچ عربی صورت گرفت و منی آن‌ها با هم مخلوط شدند. منی مخلوط به ۹ قسمت تقسیم و پس از رقیق‌سازی از راه تریس، سطوح متفاوت سلنیوم و ویتامین E را دریافت نمودند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریال ۴×۳×۳ انجام شد. تیمارها شامل سطوح ویتامین E (صفر، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، سلنیوم (صفر، ۲ و ۴ میکرو گرم در میلی‌لیتر) و زمان‌های نگهداری منی (صفر، ۲، ۴ و ۸ ساعت) به صورت مایع تحت دمای یخچال دیده شد. اثر ویتامین E، سلنیوم و زمان بر کیفیت اسپرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بررسی اثرات متقابل نشان داد که بیشترین تحرک پیش‌رونده اسپرم مربوط به زمان صفر شاهد و نیز سطح ۲ سلنیوم بدون ویتامین E بوده و کم‌ترین تحرک اسپرم نیز در تیمار ۲ سلنیوم به اضافه ۶۰ ویتامین E در زمان ۸ مشاهده شد. در زمان ۸، تیمار۶۰ ویتامین E بدون سلنیوم میزان تحرک اسپرم بیشتری در مقایسه با شاهد بدون این ترکیبات در این زمان داشت (P<۰/۰۵). بیش‌ترین درصد اسپرم‌های زنده متعلق به تیمارهای سطوح ۲ و ۴ سلنیوم بدون ویتامین E در زمان صفر بود. کم‌ترین درصد اسپرم‌های زنده نیز در تیمار ۴ سلنیوم و ۶۰ ویتامین E در زمان ۸ مشاهده شد (P<۰/۰۵). کمترین درصد ناهنجاری‌های اسپرم در تیمار ۶۰ ویتامین E بدون سلنیوم در زمان صفر به دست آمد. بیش‌ترین درصد ناهنجاری‌های اسپرم در زمان ۸ و در تیمارهای شاهد و نیز سطح ۲ سلنیوم به اضافه ۶۰ ویتامین E به نظر رسید (P<۰/۰۵). بنابراین، برای نگهداری منی قوچ عربی در شرایط مایع، استفاده از ویتامین E و سلنیوم به تنهایی و نه به صورت ترکیب با هم در رقیق‌کننده تریس توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: خصوصیات اسپرم، سلنیوم، قوچ عربی، نگهداری مایع، ویتامین E

مقدمه

امروزه با توجه به صنعتی شدن دامپروری در اکثر نقاط دنیا، نیاز به تلقیح مصنوعی دام‌ها و نگهداری صحیح منی دام‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، به دلیل این‌که در ذخیره‌سازی اسپرم گاهی با کاهش باروری مواجه می‌شویم، می‌توان با بهبود روش‌های حفظ اسپرم در برای نیل به این اهداف تأثیرگذاری ایجاد کرد (۲۶). یافته‌های برینینجر و همکاران (۱۲) نشان داد که نگهداری منی باعث کاهش فعالیت مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در اسپرم می‌شود. همچنین، نگهداری اسپرم در دمای پایین تولید انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر (ROS) را افزایش می‌دهد که اثرات مخربی بر ساختار سلول اسپرم برجای می‌گذارند (۳۵). آسیب‌های ساختاری و غیرساختاری غشاء، نقص‌های مورفولوژیک، غیرطبیعی بودن آکروزوم و دیگر تغییرات نامطلوب اسپرم در طی کاهش دما می‌توانند از عوامل عمده پایین بودن باروری اسپرم‌های نگهداری شده در دمای پایین باشند (۶). میزان توانایی آنتی‌اکسیدان‌های اسپرم در مقایسه با دیگر سلول‌ها پایین‌تر است و این سلول‌ها نسبت به فشارهای اکسیداتیو آسیب‌پذیرتر هستند (۳۱). بنابراین در این شرایط، استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم مؤثر به نظر آید (۳۵). آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با کاهش سرعت اکسیداسیون، باعث حفظ سلول از آسیب‌های شدید اکسیده‌شدن می‌شوند. این ترکیبات ممکن است به طور طبیعی در مواد وجود داشته یا به صورت مصنوعی سنتز و به آنها اضافه گردند. مکانیسم اثر این ترکیبات بدین صورت است که با دادن یک اتم هیدروژن به رادیکال آزاد تشکیل شده، از گسترش واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند. کارایی و درجه تأثیر یک آنتی‌اکسیدان به سهولت جدا شدن این اتم هیدروژن از آن مربوط می‌شود (۳۲). از جمله ترکیبات موجود در منی که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی هستند می‌توان به ویتامین E و سلنیوم اشاره کرد (۲۹). ویتامین E مهم‌ترین ترکیب آنتی‌اکسیدانی موجود در اسپرم است که برای مقابله با انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر در غشاء ضروری بوده و در حفظ تحرک اسپرم نقش دارد (۳۵،۲۷،۱۶). ویتامین E به علت حلال بودن در چربی می‌تواند از غشاء پلاسمایی اسپرم عبور نماید و اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد را سرکوب کند (۴). سلنیوم نیز یک ماده آنتی‌اکسیدانی شناخته شده است که وجود آن

برای عملکرد طبیعی بیضه و انجام فرآیند اسپرماتوژنز ضروری محسوب می‌شود. این ماده کوفاکتور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در پی دارد و لذا انتظار می‌رود که در افزایش باروری مؤثر باشد (۲۴). در میان اندام‌های تولیدمثلی، بیضه دارای بالاترین غلظت سلنیوم است که مقدار آن حتی از کبد نیز بیش‌تر است. غلظت سلنیوم نشان‌دهنده نقش محافظتی این عنصر کمیاب و آنزیم‌های مرتبط با آن در طی اسپرماتوژنز است (۹). عمل بیولوژیکی سلنیوم در پستانداران از طریق ترکیبات فعال زیستی شامل آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و سایر سلنوپروتین‌های سرم و بافت بیان می‌شود (۱۸). سرعت میتوز و مراحل مختلف میوز در لوله منی‌ساز، سلول‌های زاینده را در معرض اثر آسیبی موضعی رادیکال‌های آزاد قرار می‌دهد. نیازهای بیضه به سلنیوم در زمان بلوغ هم‌زمان با اسپرماتوژنز افزایش می‌یابد و کاهش غلظت سلنیوم ممکن است اسپرماتوزوآ را نسبت به رادیکال‌های آزاد اکسیژن آسیب‌پذیرتر می‌سازد (۲۸،۱۴). لذا، هدف از تحقیق حاضر با توجه به اهمیت این آنتی‌اکسیدان‌ها در جلوگیری از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد بر اسپرم‌ها، بررسی تأثیر افزودن سطوح مختلف ویتامین E و سلنیوم به منی بر خصوصیات کیفی اسپرم قوچ عربی در زمان‌های مختلف نگهداری منی تحت دمای یخچال خواهد بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در ایستگاه دامپروری و آزمایشگاه دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان واقع در ۳۶ کیلومتری شمال شرقی اهواز انجام شد. برای این منظور، تعداد هشت راس قوچ بالغ نژاد عربی با سنین ۳-۲ سال و متوسط وزن ۶۰ کیلوگرم و تحت تغذیه یکسان بر اساس توصیه انجمن ملی تحقیقات آمریکا (۱۹۸۵) به کار رفتند. اسپرم‌گیری به روش تحریک الکتریکی با الکترواجاکولاتور به طور هفتگی و به مدت هشت هفته در طی ماه‌های مهر تا آذر ۱۳۹۲ انجام گرفت که با فصل تولید مثلی گوسفند عربی هم‌زمان بود. نمونه‌های منی جمع‌آوری شده از قوچ‌ها با هم مخلوط شده و سپس در رقیق‌کننده تریس حاوی زرده تخم‌مرغ (جدول ۱) به نسبت ده به یک (ده قسمت محلول رقیق‌کننده و یک قسمت منی) رقیق شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت فاکتوریال ۴×۳×۳ با هشت تکرار برای هر تیمار انجام گرفت.

جدول ۱- فرمول رقیق‌کننده تریس حاوی زرده تخم‌مرغ برای نگهداری منی قوچ عربی در شرایط مایع (۲۶)

اجزای رقیق‌کننده	مقدار
تریس (هیدروکسی متیل آمینومتان) (گرم)	۳/۶۳۴
فروکتوز (گرم)	۰/۵
اسید سیتریک (منوهیدرات) (گرم)	۱/۹۹
زرده تخم‌مرغ (میلی‌لیتر)	۱۴
آب مقطر (میلی‌لیتر)	۱۰۰

تیمارها مشمول سطوح مختلف ویتامین E (صفر، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، سلنیوم (صفر، ۲ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) و زمان‌های مختلف نگهداری (صفر، ۲، ۴ و ۸ ساعت) در یخچال بود. نحوه تیماربندی به روشی به نظر رسید که قبلاً در قوچ آتابای انجام شده بود (۲۵) روند کار به این ترتیب بود که در هر بار نمونه‌گیری، منی مخلوط پس از رقیق‌سازی به ۹ قسمت برای افزودن سطوح ویتامین E و سلنیوم تقسیم شدند و در زمان‌های مختلف نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی فراسنجه‌های کیفی اسپرم قرار گرفتند. به منظور تعیین درصد تحرک اسپرماتوزوییدها در زمان‌های مختلف، یک قطره کوچک از نمونه منی رقیق شده روی یک لام تمیز گرم شده قرار داده شد، سپس روی آن یک لامل گذاشته شد تا نمونه به طور یکنواخت در زیر سطح لامل پخش شود. در مرحله بعد با استفاده از بزرگ‌نمایی ۴۰× میکروسکوپ نوری و با بررسی چند ناحیه از لام، درصد اسپرم‌های با تحرک پیش‌رونده تعیین شدند. برای ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده و نیز ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در زمان‌های مختلف مورد مطالعه از محلول رنگ‌آمیزی ئوزین و نگروزین استفاده شد. برای رنگ آمیزی ابتدا یک قطره از منی رقیق شده در یکی از دو انتهای لام تمیز و گرم قرار داده و سپس یک قطره از رنگ روی منی رقیق شده ریخته شد. بعد از مدت یک دقیقه، از طریق لبه لام دیگری گسترش نازکی از آن تهیه شد و سپس لام در مجاورت هوای آزاد خشک گردید. اسپرم‌های زنده به دلیل داشتن غشاهای سالم رنگی را به خود جذب نکرده و از این طریق از اسپرم‌های مرده قابل تشخیص بودند. میزان زنده‌مانی و ناهنجاری‌های اسپرماتوزوییدها در بزرگ نمایی ۱۰۰× میکروسکوپ نوری و در چند میدان با استفاده از روغن ایمرسیون تعیین گردید. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ استفاده شد. مدل آماری پژوهش حاضر به صورت زیر بود:

$$Y_{ijk}= \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\delta)_{ik} + (\beta\delta)_{jk} + (\alpha\beta\delta)_{ijk} + e_{ijk}$$

در این فرمول، Y_{ijk} مقدار هر صفت، μ میانگین صفت مورد نظر در جامعه مورد بررسی، α_i اثر ویتامین E، β_j اثر سلنیوم، δ_k اثر زمان، $(\alpha\beta)_{ij}$ اثر متقابل ویتامین E و سلنیوم، $(\alpha\delta)_{ik}$ اثر متقابل ویتامین E و زمان، $(\beta\delta)_{jk}$ اثر متقابل سلنیوم و زمان، $(\alpha\beta\delta)_{ijk}$ اثر متقابل ویتامین E، سلنیوم و زمان، e_{ijk} خطای آزمایش می‌باشد.

نتایج و بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که اثرات اصلی ویتامین E، سلنیوم و زمان‌های مختلف نگهداری منی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرماتوزوییدها معنی‌دار بودند (P<۰/۰۵). در خصوص اثر اصلی سلنیوم، بیشترین درصد تحرک پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم‌ها مربوط به سطح صفر و کم‌ترین آن در سطح چهار میکروگرم در میلی‌لیتر این عنصر مشاهده شد. بیش‌ترین و کم‌ترین درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم نیز به ترتیب در سطح دو میکروگرم در میلی‌لیتر سلنیوم و گروه شاهد یافت شد (P<۰/۰۵). در مورد اثر اصلی ویتامین E نیز بیش‌ترین درصد تحرک پیشرونده و زنده‌مانی اسپرم‌ها مرتبط با سطح صفر و کم‌ترین آن مربوط به سطوح ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر این ویتامین بود. هم‌چنین، درصد اسپرم‌های ناهنجار در سطوح ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E بیش‌تر از شاهد دیده شد (P<۰/۰۵). در خصوص اثر اصلی زمان نیز با افزایش مدت نگهداری منی، میزان تحرک پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم‌ها کاهش و درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم افزایش یافتند (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

اثرات متقابل سه طرفه سلنیوم، ویتامین E و زمان بر درصد تحرک پیشرونده، زنده‌مانی و ناهنجاری‌های اسپرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). با در نظر گرفتن کلیه زمان‌های مورد پژوهش، تیمارهای شاهد (بدون ویتامین E و سلنیوم) و سطح دو میکروگرم در میلی‌لیتر سلنیوم بدون ویتامین E در زمان صفر دارای پیشترین درصد اسپرم‌های با تحرک پیشرونده بودند. کمترین درصد تحرک پیشرفته اسپرم نیز متعلق به تیمار حاوی دو میکروگرم در میلی‌لیتر سلنیوم به اضافه ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E پس از هشت ساعت از نگهداری منی مشاهده گردید. تیمار ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E بدون سلنیوم در زمان هشت ساعت دارای درصد اسپرم‌های با تحرک پیشرونده بالاتری در مقایسه با شاهد بدون این ترکیبات در این زمان بود (P<۰/۰۵). بیشترین درصد اسپرم‌های زنده در تیمارهای حاوی سطوح دو و چهار سلنیوم بدون ویتامین E در زمان صفر حاصل شد. کم‌ترین درصد اسپرم‌های زنده نیز مربوط به تیمار حاوی سطوح چهار سلنیوم و ۶۰ ویتامین E در زمان هشت (P<۰/۰۵) و کم‌ترین درصد ناهنجاری‌های اسپرم متعلق یه تیمار سطح ۶۰ ویتامین E بدون سلنیوم در زمان صفر بود. بیش‌ترین درصد ناهنجاری‌های اسپرم در تیمارهای شاهد و نیز سطح دو سلنیوم یه اضافه ۶۰ ویتامین E در زمان هشت ساعت مشاهده شد (P<۰/۰۵) (جدول ۳).

برهم‌کنش‌های پیچیده‌ای بین رادیکال‌های آزاد اکسیژن و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی مایع منی وجود دارد که شناخت نقش و تأثیر دقیق این آنتی‌اکسیدان‌ها در عمل‌کرد اسپرم را با مشکل مواجه می‌سازد. یکی از عوامل مهم در کاهش تحرک اسپرماتوزوییدها، خسارت‌های ساختاری ناشی از فشارهای اکسیداتیو بر یک‌پارچگی غشاء است که به افزایش نفوذپذیری آن و کاهش توانایی تنظیم سطوح یونی در داخل سلول منجر می‌شود که مجموعه این شرایط برای تحرک اسپرم زیان‌آور می‌باشند (۸). دلیل اصلی حساسیت اسپرم پستاندارانی هم‌چون گاو، گوسفند و پرندگانی مانند خروس و بوقلمون نسبت به آسیب‌های ایجاد شده از راه پراکسیداسیون لیپید، وجود مقدار زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در غشاء است (۱۷).

جدول ۲- مقایسه اثرات اصلی سطوح ویتامین E، سلنیوم و مدت ذخیره منی بر کیفیت اسپرم (درصد) قوچ عربی

منابع متغیر	مقادیر	تحرک پیشرونده اسپرم	زنده مانی اسپرم	ناهنجاری اسپرم
	صفر	۶۸/۴۵±۱/۱۷^{a}	۷۶/۸۲±۰/۷۳^{a}	۷/۷۷±۰/۳۷^{c}
سلنیوم	۲	۶۱/۴۱±۱/۳۶^{b}	۷۰/۸۳±۱/۰۶^{b}	۹/۸۰±۰/۳۹^{a}
(میکروگرم بر کیلوگرم)	۴	۵۶/۸۹±۱/۴۸^{c}	۶۸/۴۱±۱/۱۹^{c}	۸/۲۹±۰/۲۴^{b}
	صفر	۷۰/۲۵±۱/۳۲^{a}	۷۹/۰۸±۰/۷۱^{a}	۷/۶۸±۰/۳۷^{b}
ویتامین E	۳۰	۵۸/۸۳±۱/۲۳^{b}	۶۸/۴۶±۰/۹۲^{b}	۸/۸۹±۰/۲۷^{a}
(میکروگرم بر کیلوگرم)	۶۰	۵۷/۶۷±۱/۳۸^{b}	۶۸/۵۲±۱/۱۵^{b}	۹/۳۰±۰/۳۷^{a}
	صفر	۷۴/۰۹±۱/۸۵^{a}	۸۰/۱۴±۰/۷۹^{a}	۷/۱۴±۰/۲۹^{d}
	۲	۶۷/۸۵ ±۱/۱۳^{b}	۷۴/۴۶±۰/۹۵^{b}	۸/۰۹±۰/۳۲^{c}
مدت ذخیره (ساعت)	۴	۶۲/۷۴±۱/۲۳^{c}	۶۹/۲۵±۱/۰۹^{c}	۸/۹۳±۰/۳۹^{b}
	۸	۵۷/۱۸±۱/۲۶^{d}	۶۴/۲۴±۱/۲۱^{d}	۱۰/۳۱±۰/۴۸^{a}

در هر ستون میانگین‌های با حروف نامشابه دارای اختلاف آماری معنی‌داری می‌باشند (P<۰/۰۵). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام و نتایج به صورت میانگین± خطای معیار ارائه شده‌اند

جدول ۳- مقایسه اثرات متقابل سطوح ویتامین E، سلنیوم و مدت ذخیره منی بر کیفیت اسپرم قوچ عربی

تیمارها	درصد اسپرم‌های با تحرک پیشرونده	درصد اسپرم‌های زنده	درصد اسپرم‌های ناهنجار
$S_0E_0T_0$	۸۳/۶۳±۱/۱۰^{a}	۸۵/۳۸±۰/۷۱^{bc}	۹/۵۰±۰/۳۳^{r}
$S_0E_0T_1$	۷۴/۸۸±۱/۰۸^{de}	۷۸/۰۰±۰/۹۱^{tghı}	۱۱/۲۵±۰/۴۵^{cd}
$S_0E_0T_2$	۷۰/۰۰±۱/۰۷^{tgh}	۷۲/۳۸±۰/۹۱^{lm}	۱۳/۱۳±۰/۳۹^{b}
$S_0E_0T_3$	۶۱/۱۳±۰/۶۴^{lm}	۶۲/۸۸±۰/۵۸^{p}	۱۵/۵۰±۰/۴۲^{a}
$S_0E_1T_0$	۷۹/۲۵±۱/۰۹^{b}	۸۳/۶۳±۰/۴۲^{cd}	۵/۰۰±۰/۰۰^{m}
$S_0E_1T_1$	۷۰/۸۸±۱/۲۶^{tg}	۷۷/۱۳±۱/۳۹^{tghı}	۶/۰۰±۰/۰۰^{kı}
$S_0E_1T_2$	۶۷/۰۰±۱/۷۸^{gnıj}	۷۱/۳۸±۱/۶۳^{mn}	۶/۱۳±۰/۱۳^{κ}
$S_0E_1T_3$	۶۳/۱۳±۱/۳۷^{jkı}	۶۸/۶۳±۱/۳۱^{no}	۷/۰۰±۰/۰۰^{J}
$S_0E_2T_0$	۸۰/۰۰±۰/۷۱^{b}	۸۴/۳۸±۰/۸۹^{bcd}	۴/۰۰±۰/۰۰^{p}
$S_0E_2T_1$	۷۵/۱۳±۰/۶۹^{cde}	۸۲/۱۳±۰/۶۷^{de}	۴/۸۸±۰/۱۳^{mn}
$S_0E_2T_2$	۷۰/۰۰±۰/۸۵^{tgh}	۷۹/۳۸±۰/۵۹^{tg}	۵/۰۰±۰/۰۰^{m}
$S_0E_2T_3$	۶۷/۳۸±۰/۷۳^{gnı}	۷۶/۶۳±۰/۵۹^{gnı}	۵/۸۸±۰/۱۳^{kı}
$S_1E_0T_0$	۸۳/۷۵±۱/۳۱^{a}	۸۸/۸۷±۰/۹۱^{a}	۴/۵۰±۰/۱۹^{o}
$S_1E_0T_1$	۷۸/۶۳±۱/۰۲^{bc}	۸۳/۶۳±۰/۵۶^{cd}	۵/۰۰±۰/۰۰^{m}
$S_1E_0T_2$	۷۴/۱۳±۰/۸۳^{de}	۷۹/۵۰±۰/۵۷^{et}	۵/۶۳±۰/۱۸^{l}
$S_1E_0T_3$	۶۹/۱۳±۰/۸۵^{tgnı}	۷۶/۱۳±۰/۷۴^{nıj}	۶/۱۳±۰/۱۳^{κ}
$S_1E_1T_0$	۶۷/۸۸±۲/۱۹^{gnı}	۷۵/۱۳±۱/۱۶^{ıjkı}	۹/۳۸±۰/۲۶^{tgh}
$S_1E_1T_1$	۶۰/۷۵±۱/۷۲^{lmn}	۶۸/۳۸±۱/۷۹^{no}	۱۰/۳۸±۰/۲۶^{e}
$S_1E_1T_2$	۵۵/۱۳±۲/۷۲^{opq}	۶۲/۳۸±۲/۲۵^{pq}	۱۱/۶۳±۰/۵۲^{c}
$S_1E_1T_3$	۴۷/۶۳±۱/۷۰^{rs}	۵۵/۰۰±۱/۵۱^{r}	۱۴/۱۳±۰/۸۵^{b}
$S_1E_2T_0$	۶۶/۳۸±۲/۰۲^{nıj}	۷۲/۲۵±۱/۶۹^{lm}	۱۰/۰۰±۱/۸۹^{er}
$S_1E_2T_1$	۶۱/۸۸±۲/۰۸^{kım}	۶۷/۳۸±۱/۵۶^{o}	۱۱/۵۰±۰/۲۷ ^{c}
$S_1E_2T_2$	۵۷/۵۰±۲/۱۵^{nop}	۶۳/۰۰±۱/۶۱^{p}	۱۳/۲۵±۰/۳۱^{b}
$S_1E_2T_3$	۵۱/۵۰±۱/۴۶^{qr}	۵۹/۳۸±۱/۱۹^{q}	۱۶/۱۳±۰/۴۴^{a}
$S_2E_0T_0$	۸۱/۶۳±۱/۲۵^{ab}	۸۶/۲۵±۰/۵۳^{ab}	۴/۵۰±۰/۱۹^{no}
$S_2E_0T_1$	۷۶/۳۸±۰/۷۱^{cd}	۸۲/۷۵±۰/۴۱^{d}	۵/۱۳±۰/۱۳^{m}
$S_2E_0T_2$	۷۲/۰۰±۰/۵۹^{et}	۷۸/۸۸±۰/۵۲^{tgh}	۵/۶۳±۰/۱۸^{l}
$S_2E_0T_3$	۶۷/۶۳±۰/۲۶^{gnı}	۷۵/۳۸±۰/۵۶^{ıjκ}	۶/۲۵±۰/۱۶^{κ}
$S_2E_1T_0$	۶۵/۸۸±۱/۶۵^{ıjk}	۷۳/۶۳±۱/۱۰^{jkım}	۸/۱۳±۰/۱۳^{ı}
$S_2E_1T_1$	۶۰/۶۳±۱/۰۸^{lmn}	۶۸/۰۰±۱/۰۰^{o}	۸/۷۵±۰/۱۶^{hı}
$S_2E_1T_2$	۵۴/۳۸±۱/۱۹^{pq}	۶۲/۲۵±۰/۹۴^{pq}	۹/۵۰±۰/۱۹^{tg}
$S_2E_1T_3$	۴۷/۵۰±۱/۴۴^{rs}	۵۶/۰۰±۱/۴۰^{r}	۱۰/۶۳±۰/۲۶^{ae}
$S_2E_2T_0$	۵۸/۵۰±۲/۹۵^{mno}	۷۲/۷۵±۰/۹۴^{kım}	۹/۲۵±۰/۱۶^{gh}
$S_2E_2T_1$	۵۱/۵۰±۱/۴۵^{qr}	۶۲/۷۵±۰/۹۹^{p}	۱۰/۰۰±۰/۱۹^{e}
$S_2E_2T_2$	۴۴/۵۰±۱/۰۴st	۵۴/۱۳±۰/۴۸^{r}	۱۰/۵۰±۰/۱۹^{ae}
$S_2E_2T_3$	۳۹/۶۳±۰/۴۹^{u}	۴۸/۱۳±۰/۵۲^{s}	۱۱/۲۵±۰/۱۶^{ca}

در هر ستون میانگین‌های با حروف نامشابه دارای اختلاف آماری معنی‌داری می‌باشند (P<۰/۰۵). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام و نتایج بصورت میانگین ± خطای معیار ارائه شده‌اند. S_0، S_1 و S_2 به ترتیب بیانگر سطوح صفر، ۲ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر سلنیوم، E_0، E_1 و E_2 به ترتیب بیانگر سطوح صفر، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E و T_0، T_1، T_2 و T_3 به ترتیب بیانگر زمان‌های مختلف نگهداری منی شامل صفر، ۲، ۴ و ۸ ساعت می‌باشد.

بیلدیو و همکاران (۱۰) گزارش نمودند که پراکسید هیدروژن نیز باعث اختلال در روند فسفریلاسیون اکسیداتیو در اسپرم می‌شود که این امر در مورد زرده تخم‌مرغ پرندگان نیز صدق می‌کند. دلیل دیگر برای پایین بودن خصوصیات آنتی‌اکسیدانی زرده تخم‌مرغ، وجود آهن و فلزات واسطه‌ای آن است که تأثیر پراکسید هیدروژن را افزایش می‌دهند. اگرچه مواد آنتی‌اکسیدانی در منی وجود دارند، اما به دلیل مقدار کم آنها و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی منی در طی نگهداری، استفاده از این ترکیبات می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم مؤثر باشد (۳۰). سارلوس و همکاران (۲۷) گزارش کردند که استفاده از ویتامین E در منی قوچ موجب بهبود خصوصیات اسپرم از جمله تحرک و زنده‌مانی شد. هم‌چنین، پریزادیان و همکاران (۲۵) دریافتند که استفاده از ویتامین E باعث افزایش معنی‌دار تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ آتابای در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس در شرایط نگهداری به صورت مایع در دمای پنج درجه سانتی‌گراد گردید که بیشترین درصد تحرک و زنده‌مانی مربوط به رقیق‌کننده تریس حاوی ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E مشاهده شد. نتایج تحقیقات دانگو و دانگو (۱۶) نیز نشان‌دهنده بهبود خصوصیات اسپرم در رقیق‌کننده‌های حاوی ویتامین E بود. یکی از فرضیات موجود در زمینه کاهش تحرک اسپرم در طی نگهداری سرمایی، تغییرات به عمل آمده در میتوکندری به واسطه اکسیژن‌های فعال می‌باشد (۱۲). هم‌چنین در طی نگهداری سرمایی

میزان زنده‌مانی نمونه‌های اسپرم کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تأثیر رادیکال‌های آزاد بر ساختار غشاء باشد (۷). ویتامین E به دلیل حلال بودن در چربی می‌تواند در پلاسمای غشاء نفوذ کند و باعث کاهش خسارات ناشی از رادیکال‌های آزاد بر ساختار اسپرم شود (۱۶). سلنیوم جزء ساختاری آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بوده و از این طریق در عملکرد اسپرم اثرگذار است. کمبود این عنصر در موش صحرایی، به افزایش ناهنجاری دم اسپرم و کاهش تحرک آن‌ها منجر می‌شود. این اختلالات می‌تواند در رابطه با افزایش شکنندگی کپسول میتوکندری اسپرم باشد (۵). در پژوهشی از سوی براون و بورک (۱۳) مشخص شد که سلنیوم جزء ضروری برای اسپرماتوژنز می‌باشد. اثرات مثبت تجویز سلنیوم بر خصوصیات اسپرم شامل غلظت، میزان زنده‌مانی، تحرک و مورفولوژی اسپرم مردان نشان داده شد (۱). در پژوهش حاضر بررسی اثرات متقابل فاکتورها نشان داد که با نگهداری نمونه‌های منی در شرایط مایع به مدت ۸ ساعت، درصد اسپرم‌های با تحرک پیشرونده در تیمارهای ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ویتامین E بدون سلنیوم، ۲ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر سلنیوم بدون ویتامین E به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بدون این ترکیبات در همین زمان بود. همچنین پس از ۸ ساعت از نگهداری منی به حالت مایع، درصد اسپرم‌های زنده در تیمارهای ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E بدون سلنیوم و سطوح دو و چهار میکروگرم در میلی‌لیتر سلنیوم بدون ویتامین E بیش‌تر از تیمار شاهد بدون این ترکیبات در همین زمان به نظر رسید. در اغلب زمان‌های مورد مطالعه، تیمارهای حاوی سطوح ویتامین E و سلنیوم دارای درصد ناهنجاری‌های اسپرم کم‌تری در مقایسه با شاهد بودند. در پژوهش بلسبویس و همکاران (۱۱)، افزودن ویتامین E به منی خروس تأثیر معنی‌داری بر میزان اسپرم‌های متحرک نداشت. پریزادیان کاوان و همکاران (۲۵) نشان دادند که افزودن ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E به رقیق‌کننده تریس در قوچ آتابای، افزایش درصد اسپرم‌های متحرک و زنده را به دنبال داشت. در قوچ نژاد لری- بختیاری، ویتامین E تاثیر معنی‌داری در بهبود تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌های نگهداری شده در شرایط مایع را داشت (۲۱). در مقابل، یافته‌های بال و همکاران (۷) نشان داد که ویتامین E تاثیر معنی‌داری بر حفظ تحرک اسپرم نریان در طی نگهداری منی تحت شرایط سرما نداشت. با وجود این، آگرو و همکاران (۳) اظهار داشتند که اضافه‌کردن ویتامین E به منی نریان باعث بهبود تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها در طی ذخیره‌سازی آن‌ها شده است. سلنیوم در روند اسپرم‌سازی نقش دارد. کمبود سلنیوم در موش‌ها به کاهش تولید اسپرم، تحرک آن‌ها و افزایش اسپرم‌های ناهنجار منجر شد (۳۴،۳۳). در تحقیق خرازی و همکاران (۲۰)، غلظت سلنیوم پلاسمای منی انسان هیچ گونه ارتباط معنی‌داری با فراسنجه‌های کیفی اسپرم‌ها نداشت. در مقابل، نوک فولر و همکاران (۲۲) اظهار کردند که ارتباط مثبت قابل توجهی بین مقدار سلنیوم پلاسمای منی انسان با تعداد اسپرم و مورفولوژی طبیعی آن‌ها وجود دارد. سلنیوم از طریق کاهش مالون دی‌آلدئید (MDA) که محصول نهایی لیپیدپراکسیداسیون است، موجب ارتقای فراسنجه‌های کیفی اسپرم می‌شود (۲۳،۱۹). هم‌چنین، این عنصر ممکن است از طریق نقش آنتی‌اکسیدانی خود، از DNA اسپرم در برابر آسیب اکسیداتیو حفاظت کرده و موجب بهبود حرکت اسپرم و بقای آن شود (۲۰). کم‌بود سلنیوم به آسیب قطعه میانی اسپرم و کاهش تحرک آن و نیز افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژیکی به خصوص در ناحیه سر اسپرم منجر می‌شود (۲). به دلیل خاصیت هم‌افزایی ویتامین E با سلنیوم، مفید بودن ترکیب آنها به صورت آنتی‌اکسیدانی مشخص شده است (۱۵). با این وجود، پژوهش حاضر در قوچ عربی نشان داد که در زمان‌های مختلف نگهداری منی به حالت مایع، افزودن سطوح ویتامین E و سلنیوم به صورت ترکیبی به کاهش کیفیت اسپرم‌ها در مقایسه با استفاده آنها به صورت مجزا منجر شد.

به طور کلی، در پژوهش حاضر بررسی اثرات متقابل ویتامین E، سلنیوم و زمان بر کیفیت اسپرماتوزوییدهای قوچ عربی نشان داد، افزودن این آنتی‌اکسیدان‌ها به منی بصورت جداگانه افزایش درصد اسپرم‌های با حرکت پیشرونده، زنده و طبیعی را در حین نگهداری منی تا ۸ ساعت به حالت مایع در پی دارند، این درحالی است که در تیمارهایی که ویتامین E و سلنیوم باهم استفاده شده بودند، کاهش کیفیت منی مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان به سبب فراهم ساختن امکان انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Agarwal, A., K.P. Nallella, S.R. Allamaneni and T.M. Said. 2004. Role of antioxidant in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reproductive Biomedicine Online, 8: 616-27.
2. Agarwal, A. and L.H. Sekhon. 2010. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. Human Fertility, 13: 217-225.
3. Aguero, A., M.H. Miragaya, N.G. Mora, M.G. Chaves, D.M. Neild and M.T. Beconi. 1995. Effect of vitamin E addition on equine sperm preservation. Comun Biologia, 13: 343-356.
4. Aitken, R.J. and J.S. Clarkson. 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of spermatozoa preparation techniques. Journal of Andrology, 9: 367-376.
5. Arthur, J.R. 1994. New metabolic roles for selenium. Proceeding of Nutrition Society, 53: 615-624.

6. Baily, J.F., J.F. Bilodeau and N. Cormier. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals. Andrology, 21: 1-7.
7. 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.
8. Baumber, J., B.A. Ball, C.G. Gravance, V. Medina and M.C.G. Davies. 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.
9. Behne, D., H. Weiler and A. Kyriakopoulos. 1996. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. Journal of Reproduction and Fertility, 106: 291-297.
10. Bilodeau, J.F., S. Blanchette, N. Cormier and M.A. Sirad. 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: 1105-1122.
11. Blesbois, E., I. Grasseau and J.C. Blum. 1993. Effects of vitamin-E on fowl semen storage at 4 C. Theriogenology, 39: 771-779.
12. Breininger, 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.
13. Brown, D.G. and R.F. Burk.1973. Selenium retention in tissues and sperm of rats fed a torula yeast diet. Journal of Nutrition, 102: 102-108.
14. Burk, R.F., K.E. Hill and A.K. Motley. 2003. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. Journal of Nutrition, 133: 78-151.
15. Burton, G.W. and M.G. Traber. 1990. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. Annual Review of Nutrition, 10: 357-382.
16. Donoghue, A.M. and D.J. Donoghue. 1997. Effects of water and lipid soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity and motility during liquid storage. Theriogenology, 55: 144-150.
17. Funahashi, H. and T. Sano. 2005. Selected antioxidants improve the function of extender boar semen stored at 10 degree C. Theriogenology, 63: 1605-1616.
18. Hill, K.E., Y. Xia, B. Akesson, M.F. Boeglin and R.F. Burk. 1996. Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium deficient and selenium supplemented Chinese subjects. Journal of Nutrition, 126: 138-45.
19. Huang, Y.L., W.C. Tseng, S.Y. Cheng and T.H. Lin. 2000. Trace elements and lipid peroxidation in human seminal plasma. Trace Elelement Research, 76: 207-15.
20. Kharazi, H., A. Veysi Raigani, B. Etesami, M. Khazae, A. Kiani, E. Rafiee Alavi and S.S. Shahrokhi. 2011. Comparison of anti-oxidant enzymes activity and levels of zinc and selenium in sperm and seminal plasma between fertile and idiopathic infertile men. Journal of Kermanshah University of Medical Sciences, 14: 316-327 (In Persian).
21. 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 Research, Shiraz University, 7: 40-45.
22. Noack-Fuller, G., C. Beer and H. Seiber. 1993. Cadmium, lead, selenium, and zinc in semen of occupationally unexposed men. Andrologia, 25: 7-12.
23. Oldereid, N.B., Y. Thomassen and K. Purvis. 1998. Selenium in human male reproductive organs. Human Reproduction, 13: 2172-2176.
24. Olson, G.E., V.P. Winfrey, K.E. Hill and R.F. Burk. 2004. Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-dificient rats. Reproduction, 127: 335-42.
25. Parizadian Kavan, B., Y. Jafari Ahangari and S. Zerehdaran. 2008. The effects of various levels of vitamins E and C in milk and tris extenders on characteristics of Atabay ram semen in liquid condition. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 15: 123-131 (In Persian).
26. Salamon, S. and W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science, 62: 77-111.
27. 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.
28. Shamberger, R.J. 1983. Biological interactions of selenium with other substances. In: Frieden E (editor). Biochemistry of selenium. New York: Plenum Press. 125-166.
29. Smith, R., D. Vantman, J. Ponce, J. Escobar and E. Lissi. 1996. Total antioxidant capacity of human sperm. Human Reproduction, 11: 1655-1660.
30. Sonmez, M. and E. Demirci. 2004. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. Turkish Journal of Animal Science, 28: 893-899.
31. 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.
32. Upreti, G.C., K. Jensen, J.E. Oliver, D.M. Duganzich and R. Munday. 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in chemically defined diluent containing antioxidants. Animal Reproduction Science, 48: 269-278.
33. Wallace, E., H.I. Calvin and G.W. Cooper. 1983. Progressive effects observed in mouse sperm during course of three generations of selenium deficiency. Gamete Research, 4: 377-387.
34. Wu, S.H., J.E. Oldfield, L.R. Shull and P.R. Cheeke. 1979. Specific effect of selenium deficiency on rat sperm. Biology of Reproduction, 20: 793-798.
35. Yousef, M.I., G.A. Abdollad 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.

Evaluation of the Effect of Different Concentrations of Vitamin E and Selenium in Tris Extender on Sperm Quality of Arabic Ram

Parvaneh Mohammadi[1], Saleh Tabatabaei Vakili[2], Morteza Mamouei[3], Jamal Fayazi[3] and Mehdi Zarei[4]

1 and 3- Graduated M.Sc. and Associate Professor, Ramin Agriculture and Natural Resource University
2- Assistant Professor, Ramin Agriculture and Natural Resource University
(Corresponding author: s_tabatabaei58@yahoo.com)
4- Associate Professor, Shahid Chamran University
Received: May 12, 2014 Accepted: January 18, 2015

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of levels of different vitamin E and selenium in tris extender on spermatozoa characteristics of Arabic ram. Semen collection was performed from 8 Arabic rams and mixed together. The mixed semen was divided in to 9 parts and after dilution with tris, different levels of selenium and vitamin E were added. This experiment was carried out in 3×3×4 factorial arrangement with the use of completely randomized design. Treatments were included the levels of vitamin E (0, 30 and 60 µg/ml), selenium (0, 2 and 4 µg/ml) and storage periods of semen (0, 2, 4 and 8 hours) in liquid condition under refrigerator temperature. The effects of vitamin E, selenium and storage time on spermatozoa quality were significant ($P<0.05$). Interaction effects of treatments showed that the highest progressive spermatozoa motility were in control and 2 µg/ml of selenium without vitamin E treatment. The lowest spermatozoa motility was in 2 µg/ml selenium plus 60 µg/ml vitamin E in time 8. In time 8, treatment with 60 µg/ml of vitamin E without selenium had the higher spermatozoa motility than control group in this time ($P<0.05$). The highest spermatozoa viability was in treatments containing 2 and 4 µg/ml of selenium without vitamin E in the time zero. The lowest viability of the spermatozoa was observed in time 8 of 4 µg/ml selenium plus 60 µg/ml vitamin E treatment ($P<0.05$). The lowest spermatozoa defects were in time zero of 60 µg/ml vitamin E without selenium treatment. The highest spermatozoa defects were in time 8 of control and 2 µg/ml of selenium plus 60 µg/ml of vitamin E treatments ($P<0.05$). Therefore, it is recommended the use of vitamin E and selenium antioxidants alone and not together in tris extender for storage of semen in Arabic ram.

Keywords: Arabic ram, Liquid storage, Selenium, Semen characteristics, Vitamin E