دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

اثر سطوح مختلف ویتامین C و عنصر روی بر خصوصیات کیفی اسپرم قوچ عربی

لادن خرم‌زاده[۱]، مرتضی مموئی[۲]، صالح طباطبائی وکیلی[۳]، جمال فیاضی[۳] و مهدی زارعی[٤]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
۲- استاد گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، (نویسنده مسوول: tabatabaei@ramin.ac.ir)
۳- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
۴- استاد گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۶
صفحه: ۹۲ تا ۹۹

چکیده

در طول دوره ذخیره‌سازی منی، آسیب‌های ناشی از اکسیداسیون یکی از علل مهم کاهش تحرک و قدرت باروری اسپرم‌ها می‌باشد. بنابراین تصور می‌شود آنتی‌اکسیدان‌هایی مثل روی و ویتامین c موجود در پلاسمای منی به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه و با جلوگیری از اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن بتوانند تأثیر مهمی در زمینه کاهش پراکسیداسیون لیپید اسپرم داشته باشند. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین c و عنصر روی در رقیق‌کننده تریس بر خصوصیات اسپرم قوچ عربی در شرایط مایع به صورت فاکتوریل ٤×۳×۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. تیمارها شامل سطوح مختلف ویتامین C (صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، عنصر روی (صفر، ۹۰ و ۱۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و زمان‌های مختلف نگهداری منی رقیق شده (صفر، ۲، ٤ و ۸ ساعت) در ۵ درجه‌سانتی‌گراد بودند. اسپرم‌گیری از ۸ رأس قوچ عربی ۳-۲ ساله بطور هفتگی در فصل تولیدمثلی به عمل آمده و بلافاصله منی آن‌ها مخلوط شدند. نمونه منی مخلوط پس از رقیق‌سازی با تریس به ۹ قسمت تقسیم شده و سطوح مختلف ویتامین c و عنصر روی را دریافت کردند. خصوصیات اسپرم شامل درصد تحرک پیشرونده، زنده‌مانی و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در زمان‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تأثیر ویتامین C، عنصر روی و مدت نگهداری منی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و ناهنجاری اسپرم‌ها معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). همچنین مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن نشان داد که بیشترین درصد تحرک و زنده‌مانی و کمترین ناهنجاری اسپرم‌ها مربوط به سطوح صفر ویتامین c و عنصر روی بود (p<۰/۰۵). بنابراین ویتامین c و عنصر روی در شرایط نگهداری اسپرم قوچ عربی به حالت مایع موجب بهبود تحرک، زنده‌مانی و ناهنجاری اسپرم نشدند.

واژه‌های کلیدی: روی، قوچ عربی، کیفیت منی، ویتامین C

مقدمه

غشای اسپرم قوچ نسبت به دیگر گونه‌های پستانداران دارای نسبت بالاتری از اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد. این امر باعث شده است که اسپرم قوچ در مقایسه با سایر گونه‌ها نسبت به تنش‌های حرارتی ناشی از فرآیند انجماد–ذوب حساسیت بالاتری از خود نشان دهد (۸). اسپرم گونه‌های مختلف، انواع رادیکال‌های اکسیژنی واکنش‌دهنده[1] را تولید می‌کنند که از آنها می‌توان آنیون سوپراکساید، هیدروژن پرواکسید و نیتریک اکساید را نام برد. تولید مقادیر اندک و کنترل شده این رادیکال‌ها برای انجام فرآیندهایی مانند ظرفیت‌دار شدن اسپرم، واکنش آکروزومی و پیوند اسپرم به زونا‌پلوسیدا در پستانداران، اهمیت دارد. اما اگر تولید رادیکال‌های اکسیژنی واکنش‌دهنده بیشتر از توان آنتی‌اکسیدانی اسپرم برای خنثی کردن اثر آن‌ها باشد، اسپرم دچار نوعی تنش اکسیداتیو می‌شود که از ویژگی‌های آن، آسیب پراکسیدی به غشای اسپرم و آسیب فیزیکی به DNA است (۲). در شرایط طبیعی به منظور جمع‌آوری و سپس خنثی‌سازی رادیکال‌های اکسیژنی در داخل و خارج سلول، آنتی‌اکسیدان‌ها وارد عمل می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با کاهش سرعت اکسیداسیون، باعث حفظ سلول از آسیب‌های شدید اکسیده شدن می‌شوند. این ترکیبات ممکن است به طور طبیعی در مواد وجود داشته باشند و یا بطور مصنوعی سنتز و به آنها اضافه گردند. مکانیسم اثر این ترکیبات به این صورت است که با دادن یک اتم هیدروژن به رادیکال آزاد تشکیل شده، از گسترش واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند. کارایی و درجه تأثیر یک آنتی‌اکسیدان به سهولت جدا شدن این اتم هیدروژن از آن مربوط می‌شود (۲۳). در پلاسمای منی سه سیستم عمده آنزیمی بنام گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز وجود دارد (۱۵) علاوه بر آن، مولکول‌های غیرآنزیمی آنتی‌اکسیدان از جمله ویتامین‌های E و C، عنصر روی، پیروات، گلوتاتیون، کاروتنوئیدها، کارنیتین، کوآنزیم Q در مایع منی وجود دارند (۱۰). حفظ کیفیت اسپرم قوچ بیشتر مبتنی بر تغییر و جایگزین نمودن رقیق‌کننده‌ها و همچنین اضافه کردن ترکیبات ویژه می‌باشد (۲۴). مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان موجود در مایع منی، ویتامین C می‌باشد (۲۲). ویتامین C به عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در کاهش اثرات مخرب انواع رادیکال‌های آزاد بر سلول‌ها موثر باشد (۲۹). روی یک عنصر کمیاب و ضروری است. برای فعالیت بیش از ۲۰۰ آنزیم لازم می‌باشد و نقش مهم و ضروری در سازمان‌های پلیمری از جمله ماکرومولکول‌ها و سنتز پروتئین و تقسیم سلولی دارد. روی نقش مهمی در عملکرد پروستات، بیضه و اپیدیدیم دارد. روی در روند اسپرماتوژنز و کنترل تحریک اسپرم و تثبیت غشاء آن نقش ایفا می‌کند. این عنصر با فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود دارای اعمال محافظتی می‌باشد. تصور می‌شود روی جزو اصلی فعالیت ضدباکتریایی در منی باشد (۱۳). عنصر روی در

1- Reactive oxygen species (ROS)

تثبیت غشای پلاسمایی اسپرماتوزوئیدها نقش فعالی دارد (۱۹). با این وجود، مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی محدود بوده و احتمال استرس‌های اکسیداتیو در اسپروماتوزوئیدها و درنتیجه کاهش باروری آنها در طی ذخیره منی می‌رود. بنابراین ضروری است که برای جبران کمبود سپر دفاعی، آنتی‌اکسیدان‌های خارجی به منی افزوده شوند (۱۱). لذا با توجه به نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در عملکرد اسپرم، مطالعه حاضر به منظور بررسی تأثیر افزودن سطوح مختلف ویتامین C و عنصر روی به منی قوچ عربی بر خصوصیات کیفی اسپرم در طی زمان‌های مختلف ذخیره منی در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در ایستگاه دامپروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در شهر ملاثانی در ۳۶ کیلومتری شمال شرقی اهواز انجام شد. برای انجام این تحقیق از ۸ رأس قوچ ۲ تا ۳ ساله نژاد عربی با وزن تقریبی ۵۵ کیلوگرم و با تغذیه‌ی همانند و مطابق با احتیاجات غذایی این دام استفاده شد. اسپرم‌گیری به روش تحریک الکتریکی با الکترواجاکولاتور بطور هفتگی و به مدت ۸ هفته در پاییز که مصادف با فصل تولید مثلی گوسفند عربی بود، انجام گرفت. نمونه‌های منی جمع‌آوری شده از قوچها با هم مخلوط شده و سپس در رقیق‌کننده تریس حاوی زرده تخم‌مرغ (جدول ۱) به نسبت ۱۰ به ۱ (ده قسمت محلول رقیق‌کننده و یک قسمت منی) رقیق گردید. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و به صورت فاکتوریال ۴×۳×۳ انجام شد. تیمارها شامل سطوح مختلف ویتامین C (صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، عنصر روی (صفر، ۹۰ و ۱۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و زمان‌های مختلف نگهداری (صفر، ۲، ۴ و ۸ ساعت) در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بود. عنصر روی به صورت سولفات روی با درصد خلوص ۹۹ درصد از شرکت مرک تهیه گردید. روند کار به این ترتیب بود که در هر بار نمونه‌گیری، منی مخلوط پس از رقیق‌سازی به ۹ قسمت جهت افزودن سطوح ویتامین C و عنصر روی تقسیم شدند و در زمان‌های مختلف نگهداری در دمای فوق مورد ارزیابی فراسنجه‌های کیفی اسپرم قرار گرفتند. به منظور تعیین درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها در زمان‌های مختلف، یک قطره کوچک از نمونه منی رقیق شده بر روی یک لام تمیز گرم شده قرار داده شد، سپس برروی 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 گردید. جهت ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده و نیز ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در زمان‌های مختلف مورد مطالعه از محلول رنگ آمیزی ائوزین و نگروزین استفاده شد. برای رنگ آمیزی ابتدا یک قطره از منی رقیق شده در یکی از دو انتهای لام تمیز و گرم شده قرار داده شد و سپس یک قطره از رنگ بر روی منی رقیق شده ریخته شد. بعد از مدت یک دقیقه، توسط 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 اسپرم های مرده قابل تشخیص بودند. میزان زنده‌مانی و ناهنجاری‌های اسپرماتوزوئیدها در بزرگ نمایی ۱۰۰× میکروسکوپ نوری و در چند میدان با استفاده از روغن ایمرسیون تعیین گردید (۱۴). جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، از آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ استفاده شد.

نتایج و بحث

اثرات اصلی سطوح مختلف عنصر روی، ویتامین C و زمان‌های نگهداری منی بر خصوصیات کیفی اسپرم‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که تأثیر سطوح عنصر روی، ویتامین C و زمان‌های نگهداری منی بر درصد تحرک پیشرونده، زنده‌مانی و میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم‌ها معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). بیشترین درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم و نیز کمترین درصد ناهنجاری‌های اسپرم در زمان صفر و سطوح صفر عنصر روی و ویتامین C مشاهده شد. با افزایش مدت زمان نگهداری منی، فراسنجه‌های کیفی منی کاهش یافت ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱- فرمول رقیق‌کننده تریس حاوی زرده تخم مرغ جهت نگهداری منی قوچ عربی در شرایط مایع (سالامون و ماکسول، ۲۰۰۰)
Table 1. Tris extender formula containing egg yolk to protect the ram semen under liquid condition

اجزای رقیق‌کننده	مقدار اجزاء
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

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات اصلی سطوح مختلف روی، ویتامین C و مدت نگهداری منی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم‌ها (درصد) در قوچ عربی
Table 2. Comparison the main effects of different levels of zinc, vitamin C and semen storage period on sperm quality parameters (%) in Arabi ram

		تحرک پیشرونده	زنده مانی	ناهنجاری
	صفر	۶۹/۸۰^{a} ±۰/۷۹	۷۷/۲۳^{a}±۰/۷۵	۶/۷۸^{c}±۰/۲۷
روی	۹۰	۵۷/۲۳^{b}±۱/۳۸	۷۵/۲۰^{b}±۰/۸۷	۹/۴۷^{b}±۰/۳۹
(میکروگرم در میلی‌لیتر)	۱۸۰	۵۶/۰۸^{b}±۱/۳۷	۷۱/۸۶^{c}±۰/۹۰	۱۱/۲۹^{a}±۰/۴۴
	صفر	۷۲/۱۴^{a}±۰/۸۰	۸۰/۰۰^{a} ±۰/۷۲	۷/۰۲^{c}±۰/۲۷
ویتامین C	۱۵۰	۵۳/۱۶^{c}±۱/۳۰	۷۲/۴۹^{b}±۰/۸۹	۱۰/۸۶^{a}±۰/۴۵
(میکروگرم در میلی‌لیتر)	۳۰۰	۵۷/۸۱^{b}±۱/۱۱	۷۱/۸۰^{b}±۰/۷۴	۹/۶۶^{b}±۰/۴۱
	صفر	۶۸/۱۲^{a}±۱/۴۹	۸۲/۴۰^{a}±۰/۶۷	۶/۸۲^{d}±۰/۳۱
زمان	۲	۶۳/۳۰^{b}±۱/۴۴	۷۷/۳۷^{b}±۰/۶۹	۸/۱۴^{c}±۰/۳۸
(ساعت)	۴	۵۹/۲۴^{c}±۱/۴۳	۷۲/۳۰^{c}±۰/۷۷	۹/۸۷^{b}±۰/۴۴
	۸	۵۳/۴۹^{d}±۱/۴۴	۶۶/۹۷^{d}±۰/۸۴	۱۱/۸۹^{a}±۰/۵۵

میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون دارای اختلاف آماری معنی‌داری می‌باشند (p<۰/۰۵).

مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف عنصر روی، ویتامین C و زمان‌های نگهداری منی بر خصوصیات کیفی اسپرم‌ها در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که اثرات متقابل سطوح مختلف روی، ویتامین C و مدت نگهداری منی بر درصد تحرک پیشرونده، زنده‌مانی و نیز میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم‌ها معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف روی، ویتامین C (میکروگرم در میلی لیتر) و مدت نگهداری منی (ساعت) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم‌ها (درصد) در قوچ عربی

Table 3. Comparison the interaction effects of different levels of zinc, vitamin C (µg/ml) and semen storage period (h) on sperm quality parameters (%) in Arabi ram

روی	ویتامین C	زمان	تحرک	زنده مانی	ناهنجاری
	صفر	صفر	۸۰/۲۵±۲/۱۵	۸۶/۲۵±۱/۳۷	۴/۳۷±۰/۴۲
		۲	۷۳/۶۲±۲/۷۲	۸۲/۳۷±۱/۵۱	۵/۲۵±۰/۴۵
		۴	۶۹/۵۰±۲/۳۴	۷۶/۷۵±۲/۳۰	۶/۶۲±۰/۷۸
		۸	۶۲/۲۵±۲/۲۹	۷۰/۳۷±۳/۰۳	۹/۶۲±۱/۹۱
صفر	۱۵۰	صفر	۷۵/۷۵±۱/۹۵	۸۵/۳۷±۰/۴۲	۵/۳۷±۰/۴۲
		۲	۷۱/۰۰±۲/۰۷	۷۸/۷۵±۱/۵۵	۶/۳۷±۰/۳۲
		۴	۶۶/۲۵±۲/۱۸	۷۴/۷۵±۱/۴۱	۸/۲۵±۰/۸۲
		۸	۶۰/۶۲±۲/۱۵	۶۸/۱۲±۱/۷۷	۹/۶۲±۰/۹۸
	۳۰۰	صفر	۷۵/۱۲±۱/۳۴	۸۱/۵۰±۱/۰۸	۵/۱۲±۰/۲۹
		۲	۷۱/۷۵±۰/۸۶	۷۸/۷۵±۱/۱۶	۵/۶۲±۰/۳۷
		۴	۶۸/۳۷±۰/۸۲	۷۳/۵۰±۱/۹۶	۶/۷۵±۰/۳۶
		۸	۶۳/۱۲±۱/۰۹	۷۰/۲۵±۱/۴۴	۸/۳۷±۰/۴۲
	صفر	صفر	۸۱/۵۰±۲/۲۶	۸۷/۳۷±۰/۵۹	۵/۵۰±۰/۲۷
		۲	۷۶/۰۰±۲/۳۱	۸۳/۰۰±۱/۷۲	۶/۳۷±۰/۱۸
		۴	۷۱/۳۷±۱/۸۹	۷۹/۱۲±۱/۵۶	۷/۳۷±۰/۴۲
		۸	۶۵/۰۰±۱/۸۱	۷۶/۲۵±۰/۹۹	۸/۱۲±۰/۵۵
۹۰	۱۵۰	صفر	۵۳/۷۵±۰/۹۰	۸۳/۵۰±۱/۲۴	۸/۳۷±۱/۰۷
		۲	۴۹/۸۷±۰/۵۵	۷۶/۷۵±۰/۹۲	۹/۷۵±۱/۱۶
		۴	۴۵/۰۰±۰/۸۷	۷۱/۸۷±۱/۶۲	۱۲/۲۵±۱/۵۱
		۸	۳۸/۷۵±۰/۸۰	۶۴/۵۰±۱/۴۴	۱۳/۵۰±۱/۷۷
	۳۰۰	صفر	۵۷/۲۵±۱/۱۳	۷۹/۱۲±۰/۷۴	۷/۱۲±۰/۵۵
		۲	۵۳/۳۷±۱/۰۷	۷۲/۸۷±۱/۴۴	۹/۰۰±۰/۹۸
		۴	۵۰/۳۷±۱/۲۴	۶۶/۶۲±۱/۸۸	۱۱/۲۵±۰/۷۰
		۸	۴۴/۵۰±۲/۳۷	۶۱/۳۷±۱/۹۳	۱۵/۰۰±۱/۲۲
	صفر	صفر	۷۸/۵۰±۱/۰۵	۸۸/۰۰±۰/۴۲	۵/۷۵±۰/۵۳
		۲	۷۳/۱۲±۰/۷۹	۸۲/۱۲±۱/۲۹	۷/۶۲±۰/۷۸
		۴	۶۹/۷۵±۰/۴۵	۷۶/۸۷±۱/۰۸	۸/۵۰±۰/۷۵
		۸	۶۴/۸۷±۰/۴۸	۷۱/۵۰±۱/۳۷	۹/۱۲±۰/۸۹
۱۸۰	۱۵۰	صفر	۵۱/۶۲±۱/۳۹	۷۳/۵۰±۲/۵۲	۱۰/۷۵±۰/۳۶
		۲	۴۶/۳۷±۰/۵۹	۶۹/۸۷±۱/۳۱	۱۳/۱۲±۰/۸۹
		۴	۴۱/۷۵±۰/۸۲	۶۵/۵۰±۱/۱۲	۱۵/۶۲±۱/۰۸
		۸	۳۷/۱۲±۰/۸۹	۵۷/۳۷±۱/۲۱	۱۷/۳۷±۰/۸۴
	۳۰۰	صفر	۵۹/۳۷±۳/۱۹	۷۷/۰۰±۰/۸۰	۹/۰۰±۱/۱۲
		۲	۵۴/۶۲±۲/۵۱	۷۱/۸۷±۰/۹۷	۱۰/۱۲±۱/۲۴
		۴	۵۰/۷۵±۲/۰۸	۶۵/۷۵±۱/۰۶	۱۲/۲۵±۰/۹۲
		۸	۴۵/۱۲±۲/۷۷	۶۳/۰۰±۰/۷۳	۱۶/۲۵±۱/۱۴

در هر ستون، اختلاف آماری معنی‌داری بین میانگین‌ها وجود ندارد ($p>۰/۰۵$).

غشای اسپرم به علت دارا بودن مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع بویژه اسید چرب دارای ۶ پیوند دو گانه، مستعد پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد (۴). از آنجائیکه غشای اسپرم قوچ نسبت به دیگر گونه‌های پستانداران دارای نسبت بالاتری از اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد، لذا در مقایسه با سایر گونه‌ها نسبت به تنش‌های حرارتی حساسیت بالاتری از خود نشان می‌دهد (۸). تقریبا تمام سلول‌ها دارای مواد و آنزیم‌هایی هستند که می‌توانند اثرات سمی انواع اکسیژن‌های واکنش پذیر را خنثی کنند. اما میزان توانایی آنتی‌اکسیدان‌های اسپرم در مقایسه با دیگر سلول‌ها پایین‌تر است و این سلول‌ها نسبت به فشارهای اکسیداتیو آسیب‌پذیرتر هستند (۲۷). به همین دلیل با وجود اینکه آنتی‌اکسیدان‌هایی چون ویتامین C و عنصر روی در منی وجود دارند، اما به دلیل مقادیر کم آن‌ها و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی منی در طی نگهداری در شرایط سرمایی، استفاده از این ترکیبات می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم مؤثر باشد (۲۶). بنابراین ما در این مطالعه از دو نوع آنتی‌اکسیدان یکی ویتامین C که باعث کاهش پراکسیداسیون خارج سلولی می‌گردد اما اثرات کمی بر غشا سلول یا داخل سلول دارد (۵) و دیگری عنصر روی که غشاء و کروماتین اسپرم را پایدار ساخته و از تجزیه آن‌ها جلوگیری می‌نماید (۱۶)، استفاده نمودیم. در تحقیق حاضر، سطوح بکار رفته ویتامین C و روی باعث بهبود تحرک، زنده‌مانی و میزان ناهنجاری اسپرم نشدند و حتی منجر به کاهش این فراسنجه‌های کیفی اسپرم‌ها در مقایسه با شاهد شدند. سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به سطح ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آن درصد تحرک اسپرم‌ها را کمتر کاهش داده و ناهنجاری اسپرم‌ها را کمتر افزایش داده است. بال و همکاران (۷) نیز در اسب با افزودن ویتامین C به مایع منی و ذخیره آن به مدت ۹۶ ساعت، تأثیر معنی‌داری بر میزان تحرک اسپرم مشاهده نکردند. آریچ و همکاران (۶) نیز نتایج مشابهی در رابطه با عدم تأثیر ویتامین C بر بهبود کیفیت اسپرم اسب بدست آوردند. سانچز پارتید و همکاران (۲۴) با مکمل نمودن ویتامین C به مایع منی قوچ اثر مثبتی در کیفیت اسپرم در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نکردند و حتی نتیجه گرفتند که مقادیر بیش از ۵۰ میکرومولار این ویتامین در مایع منی باعث کاهش خصوصیات کیفی اسپرم در مقایسه با گروه شاهد شد. در مطالعه دیگر، اضافه نمودن ویتامین C به منی قوچ و ذخیره‌سازی آن در ۵ درجه سانتی‌گراد، تأثیر معنی‌داری بر کیفیت اسپرم‌ها نداشت (۱۷). در مقابل، آرشامی و همکاران (۵) گزارش کردند که افزودن ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین C به منی گاو از تخریب سلول‌های اسپرم حداقل برای مدت ۲۴ ساعت در محیط آزمایشگاهی جلوگیری کرده و سبب بهبود کیفیت اسپرم گردید. این نتیجه با یافته‌های ما مغایرت دارد. همچنین بر خلاف مطالعه حاضر، اضافه نمودن سطوح ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر ویتامین C در رقیق‌کننده تریس منجر به بهبود تحرک اسپرم قوچ آتابای شد (۲۳) ولی اثر مثبتی بر زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده تریس نداشت. با توجه به نتایج این آزمایش و مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت که ویتامین C اگرچه آنتی‌اکسیدانی محلول در آب است، با این حال مکمل نمودن آن در مایع منی قوچ عربی نتوانست اثر محافظتی بر اسپرم داشته باشد. شاید یکی از دلایل این امر خاصیت اسیدی این ویتامین و کاهش pH مایع منی بعد از مکمل نمودن آن باشد (۲۰). غلظت بالایی از روی در مایع منی وجود دارد و نقش مهمی در از بین بردن آنیون سوپراکسید تولید شده در اسپرماتوزوئیدهای معیوب انزال شده دارد. همچنین روی نقش مهمی در تولید اسپرم، زنده‌مانی آن، پیشگیری از تخریب اسپرم و نیز ثبات غشاء اسپرم دارد (۱۹). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عنصر روی افزوده شده به منی در سطوح مذکور اثر بهبودی در میزان تحرک، زنده‌مانی و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم نداشت و با افزایش سطح روی، تحرک پیش رونده و زنده‌مانی اسپرم‌ها کاهش و ناهنجاری‌های اسپرم افزایش یافته است. نتایج حاصل از این مطالعه با یافته‌های برخی از محققین موافق و با برخی از گزارشات مغایرت دارد. طبق پژوهش نتر و همکاران (۲۱)، بین میزان روی پلاسمای منی و غلظت اسپرم، ارتباط قابل توجهی وجود داشت. غلظت روی مایع منی با تحرک اسپرم انسان ارتباط دارد (۲۸). همبستگی مثبت معنی‌داری بین غلظت روی پلاسمای منی و درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم در خروس گزارش شده است (۱). چیا و همکاران (۱۲) نیز بین غلظت روی پلاسمای منی و تحرک و زنده‌مانی اسپرم انسان همبستگی مثبتی یافتند. در گاومیش رودخانه‌ای بین مقدار کل روی پلاسمای منی و میزان کاتالاز پلاسما، تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها و زنده‌مانی آن‌ها همبستگی مثبتی گزارش شده است (۳). این نتایج برخلاف یافته‌های مطالعه حاضر می‌باشد. در مقابل، بلسبویس و ماگر (۹) نشان دادند که هیچ همبستگی بین مقدار روی پلاسمای منی و درصد تحرک پیش رونده اسپرم طیور وجود ندارد. غلظت روی پلاسمای منی در انسان هیچ‌گونه رابطه‌ای با پارامترهای منی نداشت معلوم شده است که پلاسمای منی به علت داشتن مقادیر بالای روی، نقش شبه آنتی‌اکسیدانی در مواجه با مقادیر زیاد آنیون‌های سوپراکسید تولید شده توسط اسپرم‌های غیرطبیعی و گلبول‌های سفید دارد (۱۶). با این وجود، غلظت بالای Zn موجب کاهش جذب اکسیژن توسط اسپرم شده و تأثیر منفی در حرکت و مورفولوژی اسپرم دارد (۱۸). بنابراین، هرنوع کاربرد آنتی‌اکسیدانت‌ها در این زمینه، باید با دقت انجام شود. زیرا مهار کامل تولید ROS موجب عدم ظرفیت‌دار شدن اسپرم شده و از این رو، لقاح اووسیت چه برون‌تنی و چه درون‌تنی انجام نخواهد شد. در مطالعه حاضر، مقایسه میانگین اثرات اصلی تیمارهای آزمایشی نشان داد که با افزایش مدت نگهداری منی، فراسنجه‌های کیفی اسپرم‌ها بطور معنی‌داری کاهش یافتند. شهبازی و همکاران (۲۵) در قوچ تالشی گزارش کردند که با افزایش مدت نگهداری منی تا ۷۲ ساعت، کاهش معنی‌داری در قدرت زنده‌مانی اسپرم‌ها نسبت به زمان شروع ذخیره‌سازی مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). همچنین، پریزادیان کاوان و همکاران (۲۳) در قوچ آتابای نشان دادند که اثر زمان‌های مختلف نگهداری منی بر کاهش درصد اسپرم‌های متحرک و زنده در شرایط مایع معنی‌دار بودند.

جعفری آهنگری (۱۴)، حداکثر زمان نگهداری اسپرم قوچ را تحت شرایط مایع ۱۲ ساعت اعلام کرد. بطور کلی نتایج مطالعه حاضر در خصوص افزودن سطوح ۹۰ و ۱۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عنصر روی و ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین C به منی رقیق شده قوچ عربی باعث بهبود خصوصیات کیفی اسپرم‌ها طی ذخیره منی حداکثر برای ۸ ساعت نشدند. در این راستا، با افزایش مدت نگهداری منی ویژگی‌های کیفی اسپرم‌ها کاهش یافتند.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به سبب فراهم ساختن امکانات تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Aghaei, A., S. Tabatabaei and M. Nazari. 2010. The correlation between mineral concetration of seminal plasma and spermatozoa motility in rooster. Journal of Animal and Veterinary Advances, 9(10): 1476-1478.
2. Aitken, R.J., G.N. de Iuliis, J.M. Finnie, A. Hedges and R.I. McLachlan. 2010. Analysis of the relationships between oxidative stresses, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. Human Reproduction, 25: 2415-2426.
3. Alavi-shoushtari, S.M., M.H. Asri Rezai, Kh. Ansari and A. Khaki. 2009. Effects of the seminal plasma zinc content and catalase activity on the semen quality of water buffalo (Bubalus bubalis) bulls. Pakistan Journal of Biological Sciences, 12(2): 134-139.
4. Alvarez, J.G., J.C. Touchstone, L. Blasco and B.T. Storey. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. Journal of Andrology, 8(5): 338-48.
5. Arshami, J., H. Esmailzadeh, M. Nasiri Mahallati and M. Hashemi Attar. 1385. Evaluation the in vitro effects of vitamin E and vitamin C on spermatozoa characteristics. Iranian Journal of Medical Sciences, 9(2): 75-82. (In Persian)
6. Aurich, J.E., U. Schonherr, H. Hoppe and C. Aurich. 1997. Effects of antioxidants on and membrane integrity of chilled stored stallion semen. Theriogenology, 48: 185-192.
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 5ºC. Theriogenology, 56: 577-589.
8. Baumber, J., B.A. Ball, C.G. Gravance, V. Medina and M. Davies-Morel. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. Journal of Andrology, 21: 895.
9. Blesbois, E. and I. Mauger. 1989. Zinc content of fowl seminal plasma and its effects on spermatozoa after storage at 4 degrees C. British Poultry Science, 30: 677-685.
10. Bonnes Taourel. D., M.C. Guerin and J. Torreilles. 1992. Is malodialdhyde a valuable indicator of lipid peroxidation. Biochemical Pharmacology, 44(5): 985-988.
11. Bruemmer, J.E., R.C. Coy, E.L. Squires and J.K. Graham. 2002. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. Journal of Animal Science, 80: 250-267.
12. Chia, S.E., C.N. Ong, L.H. Chau, L.M. Ho and S.K. Tay. 2000. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. Journal of Andrology, 21: 53-57.
13. Gavella, M. and V. Lipovac. 1998. In vitro effect of zinc on oxidative changes in human semen. Andrologia, 30: 317-323.
14. Jafari Ahangari, Y. 1996. An investigation on the effect of various buffers (Tris, Citrate and Skimmed milk) on ram semen motility and survival characteristics in liquid storage. Final report of Research Plan. Animal Science Research Institute, 37 pp.
15. Kankofer, M., G. Kolm, J. Aurich and C. Aurich. 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degree C. Theriogenology. 63: 1354-1365.
16. Kharazi, H., A, Vaisi 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. Kermanshah Behbood J. 14(4): 316-327 (In Persian).
17. 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, 7: 40-45.
18. Kvist, U., S. Kjellberg and L. Bjorndahl. 1988. The role of zinc in sperm chromatin stability in fertile men. Scandinavian Journal of Urology and Nephrology, 22(1): 1-6.
19. Lewis-Jones, D.I., I.A. Aird, M.M. Biljan and C.R. Kingsland. 1996. Effects of sperm activity on zinc and fructose concentration in seminal plasma. Human Reproduction, 11: 2465-2467.

20. Mustafa, S. and D. Esref. 2004. The effect of Ascorbic Acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol .Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 28: 893-899.
21. Netter, A., R. Hartoma and K. Nahail. 1981. Effects of zinc administration on plasma testosterone and dihydro testosterone and sperm count. Archives of Andrology, 7(1): 69-73.
22. Niki, E. 1991. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals American Journal of Clinical Nutrition, 54: 1119-1124.
23. 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(5): 123-131 (In Persian).
24. Sanchez-Partida, L.G., B.P. Setchell and W.M. Maxwell. 1997. Epididymal compounds and antioxidants in. diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. Reproduction, Fertility and Development, 9: 689-696.
25. Shahbazi, M., A. Mohit and M. Mohammadi. 2011. Effect of different levels of vitamins E and C on quality of diluted sperm of Taleshi ram during storage at 5°C. Journal of Veterinary Research, 66(2): 161-164 (In Persian).
26. 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 Sciences, 28: 893-899.
27. Sreejith, J.N., A.S. Braar, C.S. Ahuja, S.P.S. Sangha and K.C. Chaudhary. 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 Sciene, 96: 21-29.
28. Stankovic, H. and D. Mikac-Devic. 1976. Zinc and copper in human semen. Clinica chemica Acta, 70(1): 123-126.
29. Yousef, M.I., G.A. Abdollad and K.I. Kamel. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin Esupplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. Animal Reproduction Science, 76: 99-111.

Effect of Different Levels of Vitamin C and Zinc on Sperm Quality Characteristics of Arabi Ram

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

1- Graduated M.Sc. Student of Animal Physiology, Khuzestan Agricultural and Natural Resources University
2- Professor, Department of Animal Science, Khuzestan Agricultural and Natural Resources University
3- Associate Professors, Department of Animal Science, Khuzestan Agricultural and Natural Resources University
(Corresponding author: tabatabaei@ramin.ac.ir)
4- Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran Uiversity of Ahwaz
Received: May 11, 2014 Accepted: July 27, 2016

Abstract

During the semen storage, oxidative damage is one of the major causes of reduced motility and fertility of spermatozoa. Therefore, antioxidants such as zinc and vitamin C in seminal plasma may be have the important effects on reduce the lipid peroxidation of spermatozoa by prevent the destroy effect of ROS. The aim of this study was to evaluate the effect of different levels of vitamin C and zinc in tris extender on spermatozoa characteristics of Arabi ram in liquid condition by 3×3×4 factorial arrangement with the use of completely randomized design. Treatments were included the levels of vitamin C (0, 150 and 300 µg/ml), zinc (0, 90 and 180 µg/ml) and storage periods of diluted semen (0, 2, 4 and 8 hours) in refrigerator temperature. Semen was collected weekly from 8 Arabic rams with 2-3 years old in breeding season and mixed together. The mixed semen was divided in to 9 parts and after dilution with tris, vitamin C and zinc levels were added. Spermatozoa characteristics include the progressive motility, viability and morphological defect rates were evaluated in various times of semen storage period. The effects of vitamin C, zinc and storage periods of semen on spermatozoa progressive motility, viability and morphological defect rates were significant ($P<0.05$). Also, comparison the means by Duncan test revealed that the highest motility and viability rates and lowest morphological defect rates were observed in zero levels of vitamin C and zinc ($P<0.05$). Therefore, vitamin C and zinc have no improved effects on motility, viability and morphological defect rates of spermatozoa in liquid storage condition of Arabian ram.

Keywords: Arabi ram, Semen quality, Vitamin C, Zinc