

بررسی تأثیر افزودن ویتامین ای (آلفا توکوفرول) به رقیق کننده بر کیفیت اسپرم منجمد سگ

سید محسن جعفری^۱، مهرداد مهتری^۲، پژمان میرشکرای^{۳*}

۱. دانشجوی دستیاری تخصصی مامایی و بیماری های تولید مثل دام، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.

۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.

پذیرش: ۱۳ بهمن ماه ۱۴۰۲

دریافت: ۱ شهریور ماه ۱۴۰۲

چکیده

انجماد اسپرم فرایندی پیچیده است که اشکال مختلفی از آسیب های سلولی را با خود به همراه دارد. چنین آسیب هایی ممکن است در اسپرم ذوب شده مورد استفاده برای تلقیح مصنوعی باعث کاهش تحرک و باروری شود. در این پژوهش پانزده نمونه منی از پنج قلاده سگ نر جمع آوری و هر نمونه جداگانه به سه قسمت (کنترل، دارای ۰/۲ میلی مولار ویتامین E و دارای ۰/۴ میلی مولار ویتامین E) تقسیم شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش معنی دار در تحرک اسپرم های روبه جلو با سرعت بالا اتفاق افتاده است ($P \leq 0/05$). در این پژوهش افزایش معنی دار در تحرک اسپرم های روبه جلو با سرعت بالا و همچنین مقادیر VAP، VSL، VCL و BCF در گروه های ۰/۲ و ۰/۴ نسبت به گروه کنترل، تنها در گروه مقاوم در برابر شوک سرمایی رخ داده است ($P \leq 0/05$). در آزمون ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم در گروه ۰/۴ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی دار وجود داشت ($P \leq 0/05$). این مطالعه نشان داد که استفاده از ویتامین E با غلظت های ۰/۲ و ۰/۴ میلی مولار در ترکیب رقیق کننده اسپرم منجمد سگ مفید واقع می شود. همچنین در این پژوهش مشخص شد تنها اسپرم های مقاوم در برابر شوک سرمایی (نسبت به اسپرم های حساس به این پدیده) از اثرات مثبت ویتامین E برخوردار می شوند و می توان فرض کرد که این موضوع به دلیل مقادیر بالاتری از اسید های چرب غیراشباع در معرض پراکسیداسیون در این گروه از اسپرم ها باشد.

واژه های کلیدی: انجماد اسپرم سگ، ویتامین E، تحرک اسپرم، شوک سرمایی، اسید های چرب غیراشباع

مقدمه

(۴۲). این آسیب ها تحت عنوان شوک سرمایی (Coldshock) بیان می شوند و شامل مواردی چون؛ آسیب های وارده بر غشاهای سلولی، تشکیل کریستال های یخ درون سلولی و تغییرات شدید اسموتیک است (۲۵، ۳۱). چنین آسیب هایی ممکن است در اسپرم ذوب شده مورد استفاده برای تلقیح مصنوعی باعث کاهش تحرک و باروری شود (۳۳). باتوجه به موارد مذکور، به طور کلی اسپرم سگ در برابر انجماد از مقاومت پایینی برخوردار است و نمی تواند تحرک روبه جلوی خود را برای مدت طولانی در حد طبیعی حفظ کند (۱۹، ۲۷). تا کنون رقیق کننده های مختلفی برای انجماد منی سگ مورد استفاده قرار گرفته است. رقیق کننده های حاوی

امروزه تلقیح مصنوعی در سگ هایی که به علل مختلف با جفت گیری طبیعی آبستن نمی شوند مورد توجه قرار گرفته است. همچنین در مواردی تلقیح مصنوعی (دور بودن سگ نر از سگ ماده و یا استفاده از بانک اسپرم سگ های ارزشمند) با اسپرم منجمد بر منی تازه برتری پیدا کرده که همین موضوع باعث شده است تحقیقات در زمینه روش های بهینه تر انجماد اسپرم سگ گسترش یابد. اولین آزمایش موفق انجماد منی سگ توسط Rowson در سال ۱۹۵۴ انجام گرفت (۴۴).

انجماد اسپرم فرایندی پیچیده است که اشکال مختلفی از آسیب های سلولی را با خود به همراه دارد



اضافه شدن ویتامین E به رقیق‌کننده‌های اسپرم از طریق کاهش گونه‌های فعال اکسیژنی، سبب کاهش روند از دست رفتن تحرک اسپرم‌ها بعد از فرایند انجماد شود (۳) و با همین فرض پژوهش‌هایی در مورد استفاده از این آنتی‌اکسیدان در انجماد اسپرم گونه‌های جانوری مختلف (گاو، خوک و انسان (۱، ۴۱، ۵۲، ۵۴)) انجام شده است. در مورد انجماد اسپرم سگ تاکنون ویتامین E در جیره غذایی سگ‌ها (۴۳) استفاده و اثر آن بر کیفیت اسپرم مورد بررسی قرار گرفته است.

در مطالعه حاضر علاوه بر بررسی اثر ویتامین E بر شاخص‌های مختلف کیفیت اسپرم منجمد سگ (تحرک، سرعت، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای سلولی و پراکسیداسیون لیپیدی) به مقایسه غلظت‌های کمتر و بیشتر ویتامین E (آلفاتوکوفرول) در ترکیب رقیق‌کننده و همچنین ارتباط بین حساسیت اسپرم‌ها به شوک سرمایی و میزان اثرگذاری این آنتی‌اکسیدان پرداخته شده است.

مواد و روش کار

پانزده نمونه منی از پنج قلابه سگ نر نژاد مخلوط با کیف پلاستیکی و دست‌ورزی (digital manipulation) جمع‌آوری شد. نمونه‌های دارای شرایط ورود به پژوهش (فاقد خون و ادرار و دارای رنگ و حجم طبیعی، غلظت بیشتر از $10^6 \times 200$ sperm/ml، تحرک کلی بیشتر از ۷۰٪ و مورفولوژی غیرطبیعی کمتر از ۳۰٪) برای انجام مراحل بعدی کار انتخاب شدند.

ترکیب رقیق‌کننده گروه کنترل بر اساس مطالعه Bencharif و همکاران (۸)، ساخته شد. رقیق‌کننده‌های گروه‌های ۱/۲ و ۰/۴ با اضافه شدن مقادیر به ترتیب ۰/۲ میلی‌مولار و ۰/۴ میلی‌مولار آلفاتوکوفرول (Sigma Chemical Co®) به فرمول رقیق‌کننده گروه کنترل، به دست آمد. همچنین طی فرایند انجماد، گلیسرول با نسبت حجمی ۵٪ در دمای 4°C به ترکیب هر کدام از رقیق‌کننده‌ها اضافه شده است. ترکیب رقیق‌کننده‌ها در جدول ۱ آمده است.

TRIS نسبت به سایرین بیشتر استفاده شده‌اند (۶، ۱۸، ۲۲، ۲۶، ۴۶، ۴۷). همان‌طور که می‌دانیم تنفس اسپرم و فعالیت‌های متابولیکی آن، باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژنی (همانند آنیون سوپر اکسید، رادیکال هیدروکسید و هیدروژن پراکسید) می‌شوند (۲۲، ۴۵، ۴۶). در اسپرم سطوح اندکی از گونه‌های فعال اکسیژنی برای مواردی چون دفاع در برابر عفونت‌ها، ظرفیت پذیری (capacitation)، افزایش فعالیت (hyperactivation)، واکنش آکروزومی (reaction acrosome) و یا برخی از اتفاقاتی که در جریان لقاح، بین اسپرم و تخمک می‌افتند لازم‌اند (۵، ۴۵). باین‌حال تجمع بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژنی، به هر علت، در محیط اسپرم از طریق پراکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم منجر به تخریب یکپارچگی غشاهای سلولی و کاهش تحرک اسپرم‌ها می‌شود (۱، ۹، ۳۰). پراکسیداسیون لیپیدی ممکن است با از بین بردن یکپارچگی غشای سلولی و افزایش نفوذپذیری باعث غیرفعال شدن شماری از آنزیم‌ها، آسیب به ساختار DNA و مرگ سلولی شود (۱۴، ۲۴، ۵۵). به طور طبیعی مایع منی دارای انواع مختلفی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی اندوژن است که اسپرم‌ها را از اثرات سوء رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند (۱۳، ۲۰، ۳۵، ۳۷). اما باین‌وجود گفته می‌شود که اسپرم‌ها از نظر دارابودن سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانی فقیرند (۴۹). از طرفی رقیق کردن منی برای مقاصد نگهداری اسپرم نیز تا حدودی ظرفیت طبیعی آنتی‌اکسیدانی منی را از بین می‌برد. روی‌هم‌رفته امروزه اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها (آنزیمی یا غیرآنزیمی) به جیره غذایی و یا رقیق‌کننده‌ها (همچون گلوکوتائین پروکسیداز، سوپراکسیددسموتاز، سیستئین، آلفاتوکوفرول و ...) به یکی از حوزه‌های مهم تحقیقاتی بدل شده است (۴، ۱۱، ۱۲، ۱۵، ۲۳، ۳۶، ۳۸، ۵۴). ویتامین E احتمالاً اثرگذارترین آنتی‌اکسیدان در برابر فرایند پراکسیداسیون لیپیدی در غشای سلولی است (۳۲)، همچنین آنتی‌اکسیدانی است که در منی انسان شناسایی شده است (۴۸) و در غشاهای پلاسمایی اسپرم (۵۱) دارای اثرات محافظتی در برابر پراکسیداسیون لیپیدی بوده و گفته می‌شود موجب بهبود تحرک اسپرم‌ها می‌شود (۱۰، ۲۹). بنابراین می‌توان انتظار داشت



جدول ۱- ترکیب رقیق‌کننده های کنترل و ذوب

رقیق‌کننده ذوب	رقیق‌کننده مرحله دوم*	رقیق‌کننده مرحله اول*	
۳/۰۲۶	۳/۰۲۶	۳/۰۲۶	تریس (gr)
۱/۷	۱/۷	۱/۷	سیترات (gr)
۱/۲۵	۱/۲۵	۱/۲۵	فروکتوز (gr)
.	۲۰	۲۰	زرده تخم مرغ (ml)
.	۱۰	.	گلیسرول (ml)
.	.	.	آلفا توکوفرول (mM)
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	آب مقطر (ml)

*رقیق‌کننده مرحله اول: مورد استفاده در مرحله قبل از انجماد. رقیق‌کننده مرحله دوم: مورد استفاده در مرحله انجماد

ارتفاع ۴ سانتی‌متری از سطح ازت مایع) قرار گرفتند تا منجمد شوند و کرایوپریال‌های منجمد در تانک حاوی ازت فرورده شده و تا زمان ذوب در همان شرایط نگهداری شدند.

کرایوپریال‌های منجمد برای ذوب به مدت حدود ۱۰ ثانیه در حمام آب با دمای 56°C قرار گرفته و به‌منظور کاهش اثرات توکسیک گلیسرول در دمای 37°C ، رقیق‌کننده ذوب (جدول شماره ۱) به نسبت ۱ : ۱ به محتویات هر کرایوپریال اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه نگهداری نمونه‌ها در دمای 37°C ، آنالیز نهایی بر روی هر نمونه انجام و شاخص‌های مختلف کیفیت اسپرم ذوب شده (تحرک، سرعت، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای سلولی و پراکسیداسیون لیپیدی) مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز کامپیوتری هر نمونه (Computer-assisted spermatozoa analysis) قبل و بعد از انجماد به‌وسیله نرم‌افزار HF ۱۰/۰۸ (شرکت هوشمند فناوری) انجام شد. به دنبال ذوب هر نمونه، مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه بر روی لام از پیش گرم شده (37°C) قرار داده شده مورد آنالیز قرار گرفت. شاخص تحرک (Motility) که بیانگر درصد اسپرم‌های متحرک نمونه است توسط نرم‌افزار چهار گروه A (متحرک روبه‌جلو با سرعت بالا)، B (متحرک روبه‌جلو با سرعت پایین)، C (متحرک بدون حرکت روبه‌جلو) و D (غیر متحرک) دسته‌بندی می‌شد. علاوه بر آن، شاخص‌های VCL (Curvilinear velocity)، VSL (Straight line velocity)، VAP

پس از جمع‌آوری نمونه‌های اسپرم، هر نمونه درون لوله‌های استریل به‌صورت جداگانه به سه قسمت تقسیم می‌شد. برای انجماد، رقیق‌کننده‌های مربوط به هر گروه (کنترل، ۰/۲، ۰/۴) در دو مرحله اضافه می‌شدند. رقیق‌کننده‌های مرحله اول هر گروه پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها (۶ دقیقه و با شتاب 700 g) و دورریختن مایع رویی در دمای 35°C به نمونه‌های اسپرم هر لوله اضافه شد. مقدار رقیق‌کننده طوری انتخاب شد که غلظت اسپرم هر نمونه در نهایت $100 \times 10^6 \text{ sperm/ml}$ باشد. سپس لوله‌ها به‌صورت ایستا در آب 25°C در دمای -20°C قرار داده شدند تا بعد از حدود ۵۰ دقیقه اسپرم‌ها به‌آرامی به دمای 4°C برسند. همچنین در این مرحله میزان $10 \mu\text{l}$ از هر نمونه جداسازی و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای 37°C برای ارزیابی تحرک اسپرم‌ها توسط CASA آنالیز شدند و بر اساس درصد اسپرم‌های دارای تحرک روبه‌جلو به دو گروه مقاوم در برابر شوک سرمایی (تحرک بالای ۷۰٪) و حساس در برابر شوک سرمایی (تحرک زیر ۷۰٪) دسته‌بندی شدند.

سپس رقیق‌کننده‌های مرحله دوم هر گروه با دمای 4°C و دارای ۱۰٪ گلیسرول، به نسبت حجمی ۱ : ۱ به هر لوله اضافه شدند تا نسبت حجمی گلیسرول در کل نمونه به ۵٪ برسد. پس از آن نمونه‌ها به کرایوپریال‌های هم‌دما منتقل و بعد از ۳۰ دقیقه قرارگیری در دمای 4°C ، برای انجماد آماده شدند. در نهایت کرایوپریال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای -110°C (به‌صورت افقی در





انجام تست های آماری تکمیلی برای مقایسه بین گروه ها از روش Duncan استفاده شده است.

نتایج

میانگین تحرک کلی اسپرمها بعد از ذوب در گروه کنترل، ۶۰/۸٪، در گروه ۰/۲، ۶۳/۷٪ و در گروه ۰/۴، ۶۲/۲٪، اندازه گیری شد. میانگین تحرک اسپرمهای روبه جلو با سرعت بالا بعد از ذوب در گروه کنترل ۲۲/۱٪، در گروه ۰/۲، ۲۷/۱٪ و در گروه ۰/۴، ۲۷/۹٪، بدست آمد و نشان دهنده افزایش معنی دار در تحرک اسپرمهای روبه جلو با سرعت بالا بود ($P \leq 0.05$). سایر نتایج مربوط به درصد تحرک اسپرمها در جدول ۲ دیده می شود.

میانگین VCL در اسپرمهای بعد از ذوب گروه کنترل $42/6 \mu\text{m/s}$ ، گروه ۰/۲ $46 \mu\text{m/s}$ و گروه ۰/۴ $46/9 \mu\text{m/s}$ ، محاسبه شد. میانگین VSL در اسپرمهای بعد از ذوب گروه کنترل $16/6 \mu\text{m/s}$ ، گروه ۰/۲ $18/6 \mu\text{m/s}$ و گروه ۰/۴ $19/6 \mu\text{m/s}$ ، اندازه گیری شد. میانگین VAP در اسپرمهای بعد از ذوب گروه کنترل $23/3 \mu\text{m/s}$ ، گروه ۰/۲ $25/7 \mu\text{m/s}$ و گروه ۰/۴ $26/6 \mu\text{m/s}$ ، اندازه گیری شد. میانگین ALH در اسپرمهای بعد از ذوب گروه کنترل $23/3 \mu\text{m}$ ، گروه ۰/۲ $25/7 \mu\text{m}$ و گروه ۰/۴ $26/6 \mu\text{m}$ ، محاسبه شد. میانگین BCF در اسپرمهای بعد از ذوب گروه کنترل، ۴ Hz، گروه ۰/۲، ۵ Hz، و گروه ۰/۴، ۴/۸ Hz، به دست آمد. طبق نتایج مذکور، افزایش معنی دار در مقادیر VCL، VSL، VAP، ALH و BCF در گروه های دارای ۰/۲ و ۰/۴ نسبت به گروه کنترل رخ داده است ($P \leq 0.05$). سایر نتایج به دست آمده در این ارتباط در جدول ۲ آمده اند.

همچنین اندازه گیری های آماری نشان داد که افزایش معنی دار در تحرک اسپرمهای روبه جلو با سرعت بالا و همچنین مقادیر VCL، VSL، VAP و BCF در گروه های ۰/۲ و ۰/۴ نسبت به گروه کنترل تنها در گروه مقاوم رخ داده است ($P \leq 0.05$) (جدول ۳).

بعد از آزمون HOS ۵۱/۵٪ از اسپرمهای ذوب شده گروه کنترل، ۵۶/۱٪ از اسپرمهای ذوب شده گروه ۰/۲ و ۶۱/۶٪ از اسپرمهای ذوب شده گروه ۰/۴، دارای غشای یکپارچه بودند و اسپرم های گروه ۰/۴ نسبت به گروه کنترل به صورت معنی دار از یکپارچگی بالاتری در غشای

(Average path velocity) ALH، (of lateral head displacement) MAD، BCF، (Beat crossed frequency) و Wobble نیز که در ارتباط با سرعت و نحوه حرکت اسپرمها هستند مورد اندازه گیری و مقایسه قرار گرفتند.

از آزمایش HOST (Hypoosmotic swelling) جهت ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم ذوب شده گروه های مورد مطالعه، بعد از فرایند انجماد استفاده شده است. برای این کار در یک میکروتیوب اسپرم ذوب شده با محلول هایپو اسموتیک از پیش ساخته شده (۷۵ میلی مولار فروکتوز، ۲۵ میلی مولار سدیم تری سترات، ۱۰ سی سی آب مقطر) به نسبت حجمی ۱۰ به ۹۰ مخلوط شد. بعد از ۶۰ دقیقه نگهداری در دمای 37°C مقدار ۱۵ میکرولیتر از این ترکیب را توسط میکروسکوپ نوری فازکنتراست (Carl Zeiss - Axiolab) بررسی و اسپرمهای دارای دم تغییر شکل یافته به عنوان اسپرمهای دارای غشای یکپارچه در نظر گرفته شد.

درصد اسپرمهای زنده (Viability) در گروه های مورد مطالعه، بعد از انجماد با روش رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین محاسبه و مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای آزمون MDA از کیت تجاری مخصوص این آزمون (شرکت کالازیست) استفاده شد. این آزمون بر پایه واکنش دو مولکول تیو باربیتاریک اسید (TBA) و یک مولکول مالون دی آلدئید (MDA) طراحی شده است. MDA یک محصول جانبی پروکسیداسیون لیپیدی است که بعد از اتصال با TBA در دمای بالا و pH پایین تولید رنگ صورتی می کند که می توان آن را با اسپکتروفوتومتری اندازه گیری کرد و به عنوان شاخصی از میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم مورد استفاده قرار داد. برای سنجش توان آنتی اکسیدانی منی از کیت های تجاری TAC (شرکت کالازیست)، استفاده شد. در این روش از اندازه گیری میزان اکسیداسیون آهن به عنوان شاخصی از توان آنتی اکسیدانی منی ذوب شده بهره برده شد.

در نهایت برای انجام تست های آماری داده های پارامتریک این پژوهش از روش One Way Repeated Measure ANOVA استفاده شد. همچنین جهت

خود برخوردار بودند ($P \leq 0.05$). همچنین در این پژوهش اختلاف معنی دار بین گروه‌ها از نظر درصد اسپرم‌های زنده بعد ذوب، مشاهده نشد و داده‌های آماری به دست آمده از آزمون‌های MDA و TAC نیز اختلاف معنی داری بین گروه‌های مورد مطالعه نشان ندادند. نتایج مربوط این آزمون‌ها در جدول ۲ آمده‌اند.

جدول ۲- نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های اسپرم منجمد سگ در گروه‌های کنترل، ۰/۲ و ۰/۴

گروه ۰/۴	گروه ۰/۲	گروه کنترل	فراسنجه‌های مورد بررسی
۲۷/۱۰ ± ۹/۵ ^b	۲۷/۱۰ ± ۱/۴ ^b	۲۲/۸ ± ۱ ^a	درصد اسپرم‌های متحرک A
۲۲/۷ ± ۷/۶	۲۵/۹ ± ۱/۸	۲۶/۶ ± ۱/۸	درصد اسپرم‌های متحرک B
۱۱/۵ ± ۶/۹	۱۱/۷ ± ۵/۶	۱۲/۶ ± ۶/۵	درصد اسپرم‌های متحرک C
۶۲/۱۳ ± ۲/۸	۶۳/۱۳ ± ۷/۷	۶۰/۱۱ ± ۸/۱	درصد کلی اسپرم‌های متحرک
۴۶/۱۰ ± ۹/۳ ^b	۸ ± ۴۶/۹ ^b	۴۲/۱۰ ± ۶/۲ ^a	VCL (μm/s)
۱۹/۶ ± ۶ ^b	۱۸/۵ ± ۶/۸ ^b	۱۶/۵ ± ۶/۱ ^a	VSL (μm/s)
۲۶/۷ ± ۶/۱ ^b	۲۵/۵ ± ۷/۹ ^b	۲۳/۶ ± ۳/۱ ^a	VAP (μm/s)
۲۶/۰ ± ۶/۵ ^b	۲۵/۰ ± ۷/۵ ^b	۲۳/۰ ± ۳/۶ ^a	ALH (μm)
۴/۱ ± ۸/۵ ^b	۱ ± ۵/۴ ^b	۱ ± ۴/۵ ^a	BCF (Hz)
۲۵/۶ ± ۲/۸	۲۵/۷ ± ۳/۶	۲۲/۶ ± ۶/۷	MAD (degree)
۵/۱ ± ۶ ± ۸/۱	۷ ± ۵۲/۶	۵۰/۳ ± ۹/۸	Wobble
۶۱/۱۳ ± ۶ ^b	۵۶/۱۳ ± ۱/۸ ^{a,b}	۵۱/۱۵ ± ۵/۹ ^a	آزمون HOS (%)
۷۲/۸ ± ۷/۴	۷۲/۱۰ ± ۵/۸	۷۲/۷ ± ۶/۸	درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها (%)
۳۰/۲۱ ± ۱/۶	۵۸/۳۲ ± ۸	۲۳/۱۴ ± ۵/۲	آزمون MDA (nM/mgr protein)
۲۸۷/۸۹ ± ۷/۵	۲۰۳/۶۴ ± ۹	۱۹۱/۷۶ ± ۳/۲	آزمون TAC (mM/mgr protein)

^{a,b} حروف نامشابه نشانه وجود اختلاف معنی دار در بین گروه‌ها است ($P \leq 0.05$)

جدول ۳- میانگین تحرک روبه جلو با سرعت بالا (A) و میانگین مقادیر VCL، VSL، VAP، BCF در گروه‌های کنترل، ۰/۲ و ۰/۴ در اسپرم‌های منجمد گروه‌های مقاوم و حساس در برابر شوک سرمایی

گروه ۰/۴	گروه ۰/۲	گروه کنترل	مقاوم در برابر شوک سرمایی	حساس در برابر شوک سرمایی
۳۴/۱۱ ± ۲/۱ ^b	۲۹/۱۴ ± ۳ ^b	۲۳/۸ ± ۹/۸ ^a	درصد اسپرم‌های متحرک A	
۲۳/۸ ± ۷/۲	۲۵/۷ ± ۷/۹	۲۰/۷ ± ۸/۷	حساس در برابر شوک سرمایی	
۵۶/۶ ± ۷/۷ ^b	۵۴/۶ ± ۰/۳ ^b	۵۰/۸ ± ۹/۸ ^a	VCL (μm/s)	
۴۰/۶ ± ۳/۱	۴۰/۵ ± ۶/۸	۳۷/۶ ± ۱/۸	حساس در برابر شوک سرمایی	
۲۳/۶ ± ۷/۱ ^b	۲۱/۶ ± ۷/۸ ^b	۱۹/۶ ± ۴/۰ ^a	VSL (μm/s)	
۱۶/۴ ± ۳/۳	۱۶/۴ ± ۶/۲	۱۴/۳ ± ۷/۶	حساس در برابر شوک سرمایی	
۳۲/۶ ± ۵/۲ ^b	۳۰/۶ ± ۰/۲ ^b	۲۷/۶ ± ۴/۵ ^a	VAP (μm/s)	
۲۲/۴ ± ۶/۴	۲۲/۳ ± ۹/۸	۲۰/۴ ± ۶/۳	حساس در برابر شوک سرمایی	
۶/۱ ± ۱/۲ ^b	۵/۱ ± ۹/۳ ^b	۴/۱ ± ۸/۵ ^a	BCF (Hz)	
۴/۱ ± ۰/۰	۴/۱ ± ۳/۰	۳/۱ ± ۵/۲	حساس در برابر شوک سرمایی	

^{a,b} حروف نامشابه نشانه وجود اختلاف معنی دار در بین گروه‌ها است ($P \leq 0.05$)

بحث

انجماد اسپرم می‌تواند از طریق بالا بردن غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژنی، سرعت پراکسیداسیون لیپیدی در سطح غشای اسپرم را افزایش دهد (۸). رخداد پراکسیداسیون لیپیدی خصوصاً از طریق آسیب به غشای سلولی و کاهش سیالیت غشایی، مهم‌ترین علت ناباروری اسپرم‌ها قلمداد می‌شود (۷). عنوان شده که حضور گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) با تخریب غشای پلاسمایی و میتوکندریایی و همچنین شکست DNA موجب کاهش تحرک اسپرم‌ها خواهد شد (۲، ۸، ۱۷، ۲۱، ۳۹، ۵۰). برای فائق آمدن بر اثرات آسیب‌رسان استرس اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدان‌ها از طریق افزوده شدن به جیره غذایی و یا مستقیماً به محیط‌های سلولی مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۷، ۳۴، ۳۸). پژوهش‌های انجام شده بر روی انجماد اسپرم گاو، خوک و انسان (۱۶، ۳۸، ۴۱) مشخص کرده‌اند که وارد کردن ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در ترکیب رقیق‌کننده‌های مورد آزمایش، سبب بهبود معنی‌دار در تحرک کلی و روبه‌جلوی اسپرم‌های ذوب شده است. در مطالعه حاضر افزودن ویتامین E به ترکیب رقیق‌کننده با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌مول همچون مطالعات مذکور افزایش تحرک کلی و روبه‌جلو در گروه‌های حاوی آنتی‌اکسیدان ایجاد کرده‌است. باین‌وجود افزایش معنی‌دار، تنها در تحرک روبه‌جلو و سرعت بالا دیده می‌شود.

وجود هرچه بیشتر اسیدهای چرب غیراشباع بلندزنجیر (PUFA) باعث افزایش سیالیت غشای پلاسمایی می‌گردد و این به دلیل وجود تعداد زیاد باندهای دوگانه در این مولکول‌هاست. خصوصیات فیزیکی این چینی، ممکن است باعث مقاومت بیشتر غشاهای سلولی در برابر آسیب‌های ناشی از تشکیل کریستال‌های یخی گردند (۴۰). بر همین اساس تفاوت‌ها در ترکیب لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم‌ها در بین گونه‌های مختلف می‌تواند یک عامل مهم در قابلیت‌های متفاوت انجماد پذیری اسپرم‌ها بین گونه‌ها باشد (۴۰). از این‌رو می‌توان انتظار داشت تفاوت‌ها در ترکیب لیپیدی و درصد PUFA های موجود در غشای پلاسمایی اسپرم‌ها بین افراد یک‌گونه و حتی بین اسپرم‌های مربوط به یک فرد در دوره‌های زمانی مختلف نیز می‌تواند در توان

انجماد پذیری اسپرم‌ها نقش مهمی ایفا نماید. در مطالعه حاضر اسپرم‌ها پس از سرد شدن به دو گروه مقاوم در برابر شوک سرمایی (تحرک بالای ۷۰٪) و حساس در برابر شوک سرمایی (تحرک زیر ۷۰٪) دسته‌بندی شدند. باتوجه‌به مطالب گفته‌شده تفاوت بین کیفیت این دو گروه می‌تواند به دلیل تفاوت در درصد PUFA های موجود در غشای پلاسمایی اسپرم‌های مورد آزمایش باشد و گروه دارای مقادیر بالاتر PUFA در غشای پلاسمایی، مقاومت بهتری از خود در برابر شوک سرمایی نشان داده‌است و بنابراین از کیفیت بالاتری پس از سرد شدن برخوردار است. باین‌حال اندازه‌گیری‌های آماری در این مطالعه نشان می‌دهد افزایش معنی‌دار در تحرک اسپرم‌های روبه‌جلو با سرعت بالا و همچنین مقادیر VCL، VSL، VAP و BCF در گروه‌های حاوی آنتی‌اکسیدان نسبت به گروه کنترل، تنها در گروه مقاوم رخ داده‌است. مطالعات مشخص کرده‌اند که مقادیر بالاتر PUFA در غشای اسپرم، این سلول‌ها را نسبت به رخداد پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب‌های به دنبال آن، حساس‌تر می‌کند (۳). بنابراین می‌توان گفت ویتامین E در محیطی که مقادیر بالاتری از PUFA در معرض پراکسیداسیون وجود داشته‌باشد (گروه مقاوم) نقش مهم‌تری ایفا کرده و علت بهبود معنی‌دار شاخص‌های تحرک و سرعت در گروه مقاوم نسبت به گروه حساس این‌گونه توضیح داده می‌شود.

در چندین مطالعه در مورد انجماد اسپرم خوک و گاو (۳۸، ۴۱، ۵۲) نشان داده شده که وارد کردن آلفاتوکوفرول به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در ترکیب رقیق‌کننده، سبب کاهش معنی‌دار درصد اسپرم‌های مرده ذوب شده پس از انجماد می‌گردد. باین‌حال در یک مطالعه انسانی اضافه شدن ویتامین E به محیط رقیق‌کننده اسپرم پیش از انجماد بر میزان زنده‌مانی اسپرم‌های ذوب شده پس از انجماد تأثیر معنی‌داری نداشت (۵۳). در مطالعه حاضر نیز درصد اسپرم‌های زنده ذوب شده بین گروه‌ها پس از انجماد تفاوت معنی‌دار نشان ندادند.

به دلیل وجود مقادیر زیاد PUFA در غشای اسپرم، این سلول‌ها نسبت به رخداد پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب‌های به دنبال آن، بسیار حساس هستند. ویتامین E می‌تواند از طریق مهار رادیکال‌های آزادی همچون



- pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility*. 2003;79(4):829-43.
- Aitken R, Krausz CG. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 2001;122:497-506.
 - Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of andrology*. 1988; 9(6):367-76.
 - Ajina T, Sallem A, Haouas Z, Mehdi M. Total antioxidant status and lipid peroxidation with and without in vitro zinc supplementation in infertile men. *Andrologia*. 2017; 49(7):e12703.
 - Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular reproduction and development*. 1995; 42(3):334-46.
 - Baran A, Ak K, Ileri I. Freezing of dog semen in pellets and straws with Tris and milk extenders. *Veteriner Fakültesi Dergisi (Istanbul)*. 2000;26(1):251-63.
 - Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2003;24(4):621-8.
 - Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, et al. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*. 2008; 70(9):1478-88.
 - Bilodeau J-F, Blanchette S, Cormier N, Sirard M-A. 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*. 2002; 57(3):1105-22.
 - Bolle P, Evandri MG, Saso L. The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. *Contraception*. 2002; 65(4):313-5.
 - Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small ruminant research*. 2008; 75(2-3):128-34.

پروکسیل و الکوکسیل در سطح غشا در برابر رخداد پراکسیداسیون لیپیدی ممانعت به عمل آورد (۳). از طرفی در یک مطالعه انسانی اضافه شدن ویتامین E به محیط نگهداری گلبول‌های قرمز سبب کاهش فرایند پراکسیداسیون لیپیدی شده است (۲۸). پژوهشی در سال ۲۰۱۷ توسط Rizzo و همکارانش نشان داد که استفاده از روغن ماهی و آلفا توکوفرول در جیره غذایی سگ‌ها، بعد از ۶۰ روز پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلول‌های اسپرم اخذ شده از آن‌ها را به طور معنی‌داری کاهش داده است (۴۳). در مطالعه حاضر اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه از نظر شاخص‌های استرس اکسیداتیو (آزمون‌های MDA و TAC) مشاهده نشد.

برخی مطالعات نشان دادند که ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در حفظ یکپارچگی غشای سلولی نقش مثبت دارد (۱۰، ۳۸، ۵۲). در مطالعه حاضر نیز نشان داده شده که این ویتامین با اضافه شدن به ترکیب رقیق‌کننده سبب افزایش یکپارچگی غشا شده است.

این مطالعه نشان داد استفاده از ویتامین E با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌مولار در ترکیب رقیق‌کننده اسپرم منجمد سگ مفید واقع می‌شود. با این حال باتوجه به نتایج، غلظت بالاتر (۰/۴ میلی‌مولار) پیشنهاد می‌شود. همچنین در این پژوهش مشخص شد تنها اسپرم‌های مقاوم در برابر شوک سرمایی (نسبت به اسپرم‌های حساس به این پدیده) از اثرات مثبت ویتامین E برخوردار می‌شوند و می‌توان فرض کرد که این موضوع به دلیل مقادیر بالاتری از PUFA در معرض پراکسیداسیون در این گروه از اسپرم‌ها باشد. با این حال تحقیقات بیشتر در این مورد توصیه می‌شود.

قدردانی و تشکر

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد که با تأمین بودجه مالی مورد نیاز از این طرح پژوهشی با کد ۵۰۸۵۰ حمایت کرده است، کمال قدردانی می‌شود.

منابع

- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the





- Agarwal A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reproduction*. 2001; 16(9):1922-30.
22. Guerra M, Evans G, Maxwell W. Role of oxidants and antioxidants in andrology: a review. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2004;28(4):187.
23. Hashem EZ, Haddad R, Eslami M. Evaluation of ram semen enrichment with oleic acid on different spermatozoa parameters during low temperature liquid storage. *Small Ruminant Research*. 2017; 150:30-9.
24. Havaux M. Spontaneous and thermoinduced photon emission: new methods to detect and quantify oxidative stress in plants. *Trends in plant science*. 2003; 8(9):409-13.
25. Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Dessole S, Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive biomedicine online*. 2003; 6(2):191-200.
26. Ivanova-Kicheva M, Bobadov N, Somlev B. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminum tubes using three extenders. *Theriogenology*. 1997; 48(8):1343-9.
27. Ivanova-Kicheva M, Subev M, Bobadov N, Dacheva D, Rouseva I. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. *Theriogenology*. 1995; 44(4):563-9.
28. Jain SK. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264(35): 21340-5.
29. John Aitken R, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of reproduction*. 1989;41(1):183-97.
30. Kehinde EO, Mojiminiyi OA, Mahmoud AH, Al-Awadi KA, Al-Hunayan A, Omu AE. The significance of measuring the time course of serum malondialdehyde concentration in patients with torsion of the testis. *The Journal of urology*. 2003; 169(6): 2177-80.
12. Bucak MN, Sariözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksız R, Çevik M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*. 2010;89(1):24-30.
13. Calamera J, Buffone M, Ollero M, Alvarez J, Doncel G. Superoxide dismutase content and fatty acid composition in subsets of human spermatozoa from normozoospermic, asthenozoospermic, and polyzoospermic semen samples. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 2003; 66(4):422-30.
14. Câmara D, Mello-Pinto M, Pinto L, Brasil O, Nunes J, Guerra M. Effects of reduced glutathione and catalase on the kinematics and membrane functionality of sperm during liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*. 2011;100(1):44-9.
15. Chanapiwat P, Kaeoket K, Tummaruk P. Effects of DHA-enriched hen egg yolk and L-cysteine supplementation on quality of cryopreserved boar semen. *Asian journal of andrology*. 2009;11(5):600.
16. Counsel M, Bellinge R, Burton P. Vitality of oligozoospermic semen samples is improved by both swim-up and density gradient centrifugation before cryopreservation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2004; 21:137-42.
17. Ebisch I, Thomas C, Peters W, Braat D, Steegers-Theunissen R. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Human reproduction update*. 2007; 13(2):163-74.
18. England G. Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of reproduction and fertility Supplement*. 1993;47:243-55.
19. England G, Ponzio P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*. 1996; 46(1):165-71.
20. Gavazza MB, Gutiérrez AM, Marmunti ME, Palacios A. Lipid peroxidation assays in canine fresh semen. *Revista Veterinaria*. 2009; 20.
21. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma R, Alvarez J, Thomas Jr A,

41. Peña F, Johannisson A, Wallgren M, Martinez HR. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*. 2004; 12(2):117-24.
42. Purdy P. A review on goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research*. 2006;63(3):215-25.
43. Risso A, Pellegrino FJ, Relling AE, Corrada Y. Effect of long-term fish oil supplementation on semen quality and serum testosterone concentrations in male dogs. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2016;10(2):223.
44. Rowson L. Infertility in cow, sow and bitch. *Irish Veterinary Journal*. 1954;8(10):216-27.
45. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive biology and endocrinology*. 2004;2(1):1-7.
46. Silva A, Cardoso R, Uchoa D, Silva L. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*. 2003; 59(3-4):821-9.
47. Silva A, Cardoso RdCS, Uchoa D, da Silva LM. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *The veterinary journal*. 2002;164(3):244-6.
48. Silva PFN. Physiology of Peroxidation Process in Mammalian Sperm. 2006.
49. Soren S, Singh SV, Singh P. Influence of season on seminal antioxidant enzymes in Karan Friesbulls under tropical climatic conditions. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 2016;40(6):797-802.
50. Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Molecular human reproduction*. 1997;3(3):203-13.
51. Therond P, Auger J, Legrand A, Jouannet P. α -Tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 1996; 2(10):739-44.
52. Towhidi A, Parks J. Effect of n-3 fatty acids and α -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2012; 29:1051-6.
31. Khalili B, Farshad A, Zamiri M, Rashidi A, Fazeli P. Effects of sucrose and trehalose on the freezability of Markhoz goat spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2009;22(12):1614-9.
32. Losano JD, Angrimani DS, Rui BR, Bicudo LC, Dalmazzo A, Silva BC, et al. The addition of docosahexaenoic acid (DHA) and antioxidants (glutathione peroxidase and superoxide dismutase) in extenders to epididymal sperm cryopreservation in bulls. *Zygote*. 2018;26(3):199-206.
33. Matsuoka T, Imai H, Kohno H, Fukui Y. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*. 2006;52(5):675-83.
34. Meryman HT. The interpretation of freezing rates in biological materials. *Cryobiology*. 1966;2(4):165-70.
35. Meucci E, Milardi D, Mordente A, Martorana GE, Giacchi E, De Marinis L, Mancini A. Total antioxidant capacity in patients with varicoceles. *Fertility and Sterility*. 2003;79:1577-83.
36. Mostafa T, Anis T, Imam H, El-Nashar A, Osman I. Seminal reactive oxygen species-antioxidant relationship in fertile males with and without varicocele. *Andrologia*. 2009;41(2):125-9.
37. Mruk DD, Silvestrini B, Mo M-y, Cheng CY. Antioxidant superoxide dismutase-a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*. 2002;65(4):305-11.
38. Nasiri A, Towhidi A, Zeinoaldini S. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. *Andrologia*. 2012;44:550-5.
39. Parinaud J, Le Lannou D, Vieitez G, Griveau J-F, Milhet P, Richoilley G. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit®) following ejaculation. *Human Reproduction*. 1997;12(11):2434-6.
40. Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 1992;29(2):255-66.



- dogs. The Journal of nutrition. 1997; 127(6):1198-205.
55. Žaja IŽ, Samardžija M, Vince S, Slugaović A, Strelec S, Šuran J, et al. Antioxidant protection and lipid peroxidation in testes and different parts of epididymis in boars. Theriogenology. 2016; 86(9):2194-201.
53. Verma A, Kanwar K. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. Asian J Androl. 1999;1(3):151-4.
54. Wander RC, Hall JA, Gradin JL, Du S-H, Jewell DE. The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged





Evaluation of the Effects of Vitamin E (α -Tocopherol) Supplementation in the extender containing egg yolk on the Characteristics of Canine Cryopreserved Semen

Seyed Mohsen Jafari¹; Mehrdad Mohri²; Pezhman Mirshokraei^{2*}

1. DVM, DVSc Student, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.

Accepted: 5 February 2024

Received: 23 August 2023

Summary

Freezing sperm is a complex process that can result in various forms of cell damage. Such damage may reduce motility and fertility of thawed sperm used for artificial insemination. In this study, fifteen semen samples were collected from five mixed-breed male dogs and each sample was divided into three parts (control, 0.2 mmol vitamin E and 0.4 mmol vitamin E) Although there was an observed increase in motility in groups that received antioxidants, this increase was not statistically significant. However, the average motility of high-speed progressive sperm after thawing indicates a significant increase ($P \leq 0.05$) in their motility. The study showed that a significant increase ($P \leq 0.05$) in high-speed progressive sperm motility, VCL, VSL, VAP and BCF values in groups 0.2 and 0.4 compared to the control group. However, this increase was only observed in the cold shock-resistant group. In the test, the evaluation of the integrity of the sperm membrane in Group 0.4 showed a significant increase ($P \leq 0.05$) compared to the control group. The study finds that using vitamin E with concentrations of 0.2 and 0.4 improves the resistance of sperm to shocks compared to sperm that are sensitive to this phenomenon. This positive effect of vitamin E can be attributed to higher levels of unsaturated fatty acids that are susceptible to peroxidation in this group of sperm.

Keywords: cryopreservation of dog sperm, vitamin E, sperm motility, cold shock, unsaturated fatty acids

*Corresponding author: mirshokraei@um.ac.ir

