مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۱۲، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰

بررسی اثر افزودن سطوح مختلف ویتامین A در افزایش کیفیت اسپرم قوچ قزل طی سردسازی، انجماد و یخ‌گشایی

مهدی نظری .Ph.D[۱]، حسین دقیق‌کیا .Ph.D[*۱]، ابوذر نجفی .Ph.D[۲]

۱- دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی، تبریز، ایران
۲- دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، گروه علوم دام وطیور، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: daghighkia@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۳۱

چکیده

هدف: این پژوهش به‌منظوره بررسی اثرات حفاظتی افزودن سطوح مختلف ویتامین A به‌رقیق‌کننده اسپرم قوچ طی نگه‌داری اسپرم تا زمان تعادل و قبل از انجماد در دمای سردسازی و انجماد و یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، نمونه‌های اسپرم از ۴ راس قوچ، به‌وسیله واژن مصنوعی جمع‌آوری شد، پس از ارزیابی اولیه، نمونه‌ها در صورت نرمال بودن باهم مخلوط شده و پس از رقیق‌سازی سطوح ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومول ویتامین A به نمونه‌ها افزوده شده و نمونه‌ها پس از ۲ ساعت سردسازی، منجمد شدند. فرآسنجه‌های تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی و ریخت‌شناسی اسپرم در دو مرحله (قبل از انجماد و بعد از انجماد) و هم‌چنین میزان مالون‌دی‌آلدهید بعد از انجماد و یخ‌گشایی اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج به‌دست آمده نشان داد که افزودن سطوح مختلف ویتامین A به‌محیط رقیق کننده طی سردسازی تاثیر معنی‌داری روی فراسنجه‌های مورد ارزیابی نداشت ($p<۰/۰۵$)، نتایج بعد از انجماد نشان داد افزودن سطح ۱۵ میکرومول باعث افزایش تحرک‌کل (TM)، تحرک پیش‌رونده (PM)، سرعت اسپرم در خط مستقیم (VAP) و سرعت در مسیر مستقیم اسپرم (VSL) شد ($p<۰/۰۵$). در رابطه با سلامت غشا، و زنده‌مانی، سطح ۱۵ میکرومول سبب افزایش معنی‌دار شد و در همین سطح کاهش میزان اسپرم‌هایی با ریخت‌شناسی ناسالم و میزان مالون‌دی‌آلدهید نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: باتوجه به‌نتایج حاصل، افزودن سطوح مختلف ویتامین A، سطح ۱۵ میکرومول توانست بهترین عمل‌کرد را در بهبود فراسنجه‌های مورد ارزیابی داشته باشد و تنش‌های اکسیداتیو را طی انجماد و یخ‌گشایی کاهش بدهد.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدانت، اسپرم قوچ، تنش اکسیداتیو، ویتامین A

مقدمه

انجماد اسپرم و تلقیح مصنوعی یکی از متداول‌ترین روش‌ها برای بهبود پرورش حیوانات اهلی هستند. عمل انجماد حمل‌ونقل اسپرم را امکان‌پذیر ساخته، هزینه پرورش حیوانات را کاهش داده و تنوع ژنتیکی گونه‌ها را افزایش می‌دهد (۱). انجماد منی نقش به‌سزایی در پیشرفت و توسعه تکنیک‌های تولیدمثلی به‌خصوص تلقیح مصنوعی ایفا می‌کند (۲). انجماد می‌تواند منجر به‌کاهش تحرک اسپرم، ازبین‌رفتن یک‌پارچگی غشا و ساختار آکروزوم و هم‌چنین آسیب به DNA اسپرم شود (۳). عمل انجماد موجب تنش سرمایی و اکسیداتیو در غشا اسپرم می‌شود که می‌تواند قدرت باروری اسپرم را کاهش داده، باعث مرگ آن شده و درنهایت باعث کاهش موفقیت تلقیح مصنوعی شود (۴). رادیکال‌های آزاد را می‌توان مهم‌ترین عوامل تنش اکسیداتیو یا تنش شیمیایی طی مرحله انجماد و یخ‌گشایی دانست که به‌دو نوع ROS (Reactive Oxidative Species) و RNS (Reactive Nitrogen Species) تقسیم می‌شوند (۵). اسپرم پستانداران به‌علت غلظت بالای اسید چرب اشباع‌نشده در ساختار غشای لیپیدی به سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی کارآمد برای دفاع در برابر آسیب پراکسیداتیو تولید شده توسط ROS نیاز دارد (۶، ۷). بااین‌حال، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی محافظ در اسپرم در درجه اول منشا سیتوپلاسمی دارند که بیش‌تر در طی مراحل نهایی تمایز کنار گذاشته می‌شوند (۸) و هم‌چنین این سیستم آنتی‌اکسیدانتی توسط پروتکل‌های ذخیره‌سازی تضعیف می‌شود (۹). درنتیجه، سلول‌های اسپرم قادر به‌سنتز مجدد اجزای غشای خود نیستند (۱۰، ۱۱) که منجر به‌آسیب ساختاری و ریخت‌شناسی (۱۰) کاهش زنده‌مانی و اختلال عمل‌کرد بعدی اسپرم می‌شود (۱۲, ۱۳). در سال‌های اخیر محققین تلاش زیادی در رابطه با حذف رادیکال‌های آزاد از محیط انجماد و یخ‌گشایی کردند؛ آن‌ها به‌این نتیجه رسیده‌اند که افزودن انواع آنتی‌اکسیدانت‌ها به محیط انجماد و یخ‌گشایی اسپرم می‌توان سبب بهبود فراسنجه‌های حرکتی، میزان باروری و کاهش آسیب‌های وارده بر اسپرم شود (۱۴). انواع مختلفی از عوامل آنتی‌اکسیدانتی وجود دارد که می‌تواند بدون از بین بردن کامل ROS، در هنگام وقایع اکسیداتیو برای بهبود کیفیت اسپرم مورد استفاده قرار گیرد، زیرا مکانیسم‌های اکسیداتیو نقش مهمی در کنترل فیزیولوژیک عمل‌کرد اسپرم پستانداران به‌طور مثال در ظرفیت‌پذیری اسپرم و یا هم‌جوشی اسپرم با تخمک دارند (۱۵). آنتی‌اکسیدانت‌ها با مهار واکنش‌های زنجیرهای اکسیداتیو و ایجاد تعادل بین مواد اکسیدانتی و آنتی‌اکسیدانتی موجب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شوند. در حالت طبیعی پلاسمای منی دارای مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانتی برای مهار ROS و محافظت علیه هر نوع آسیب وارده به‌اسپرم است. برای جلوگیری از تنش اکسیداتیو ناشی از استرس‌های وارده در جریان فرآیند انجماد–یخ‌گشایی و مراحل مختلف نگه‌داری اسپرم انواع آنتی‌اکسیدانت‌ها استفاده شده است (۱۵). در مطالعات گذشته از ویتامین‌های A، E و C به‌عنوان ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانتی یاد شده است (۱۶-۱۸). رتینول یکی از ویتامین‌های محلول در چربی است که می‌تواند نقش بسیار مهمی در تکامل و فیزیولوژی اسپرم دارد (۱۹). پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی ویتامین A و کاروتنوئیدها اولین‌بار توسط موناگان و اشمیت شرح داده شد (۲۰). سازمان بهداشت جهانی گزارش داد که ویتامین A هر یک از مشتقات آن می‌توانند از لیپیدها در برابر فساد محافظت کنند (۲۱). تاکنون مطالعات محدودی در خصوص اضافه نمودن رتینول به رقیق‌کننده اسپرم انجام‌گرفته است. مایا سوینا و همکاران (۱۹) گزارش کردند افزودن رتینول به‌محیط رقیق‌کننده اسپرم اپیدیدمی گاو در شرایط نگه‌داری اسپرم به‌مدت سه ساعت (۵، ۴۱ درجه سانتی‌گراد) سبب افزایش زنده‌مانی تحرک و کاهش تنش گرمایی شد و هم‌چنین رتینول در شرایط تنش اکسیداتیو می‌تواند موجب تثبیت غشای آکروزوم شد (۱۹). محققین دیگری نیز گزارش کردن استفاده از رتینول در محیط IVM بلوغ تخمک (متافاز۲) را بهبود می‌بخشید و هم‌چنین بیان کردند که رتینول در تخمک‌های تحت فشار حرارت از بلوغ هسته‌ای محافظت می‌کند و اثرات حفاظتی آن-در تنش دمایی نشان داده شده است (۲۲). ویتامین A به‌صورت رتینول برای باروری و

اسپرماتوژنز طبیعی جنس نر نیاز است (۲۳). رتینول و رتینوییک‌اسید، شروع و حفظ اسپرماتوژنز و تمایز سلول‌های زایای موش نابالغ را در سیستم کشت اندام و هم‌چنین تمایز سلول‌های زایای موش صحرایی نر نابالغ را در محیط *In vivo* و *In vitro* تقویت می‌کند (۲۴، ۲۵). ویتامین A برای ساختار طبیعی و عمل‌کرد بیضه (۲۶) در سلول‌های اسپرم انسان، خرگوش و گاو نر ضروری است (۲۷، ۲۸). در سلول‌های اسپرم گاو ۹۰ درصد از کل ویتامین A در غشای آکروزومی وجود دارد (۲۷). تاکنون گزارشی دررابطه با تاثیر افزودن ویتامین A در محیط رقیق‌کننده منی بر فراسنجه‌های اسپرم طی سردسازی، انجماد و یخ‌گشایی صورت نگرفته است. هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی تاثیر افزودن ویتامین A به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت بر بهبود کیفیت فراسنجه‌های اسپرم قوچ در مرحله سردسازی تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و طی انجماد و یخ گشایی است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در واحد گوسفندداری ایستگاه خلعت پوشان، مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز واقع در جاده باسمنج انجام گرفت.

جمع‌آوری منی: نمونه‌های منی از چهار قوچ بالغ قزل (۲ تا ۴ ساله) باشایستگی ژنتیکی برتر (براساس شجره‌نامه و همین‌طور قوچ‌های دارای کیفیت اسپرم مناسب) جمع‌آوری شدند. درمجموع ۲۰ انزال (پنج انزال برای هر قوچ) دوبار در هفته از قوچ‌ها با استفاده از واژن مصنوعی، در طول فصل غیر تولیدمثل (بهار) جمع‌آوری شد. بلافاصله پس از جمع‌آوری، انزال‌ها تا زمان ارزیابی در آزمایشگاه در فلاسک حاوی آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌ها در صورت مطلوب بودن (حجم ۰/۷۵ میلی‌لیتر. تحرک ۸۰ درصد، مورفولوژی غیرطبیعی ۱۰ درصد و رنگ طبیعی و بدون آلودگی) برای ازبین‌بردن اثرات فردی باهم مخلوط شده و برای مراحل بعدی آزمایش آماده شدند.

تهیه رقیق‌کننده: در پژوهش حاضر از رقیق‌کننده تریس (تریس ۲۷/۱ گرم در لیتر، اسیدسیتریک ۱۴ گرم در لیتر، گلوکز ۱۰ گرم در لیتر، فشار اسمزی ۳۲۰ میلی‌اسمول بر کیلوگرم و دارای pH=۷/۲) استفاده شد و میزان ۷ درصد گلیسرول و ۱ درصد لسیتین به‌عنوان محافظت‌کننده از سرما استفاده شد. و تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت سیگما-آلمان تهیه شده است.

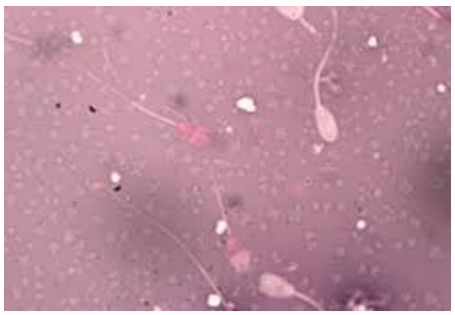
افزودن تیمار، سردسازی تعادل دمایی و انجماد: بعد از آماده‌کردن رقیق‌کننده، سطوح ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومول ویتامین A (Product Number: 5.00849, Catalogue Number: 500849, CAS Number: 68-26-8) ابتدا در اتانول حل شدند و سپس ویتامین A در رقیق کننده تریس اضافه شده و برای این‌که اثر اتانول حذف شود در تیمار شاهد نیز به‌همان مقدار که در تیمارهای دارای ویتامین A ، اتانول وجود داشت اضافه شد. و سپس اسپرم به‌نسبت ۱:۲۰ به‌لوله‌های آزمایشی اضافه شد و لوله‌ها در داخل ظروف حاوی آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفته و به‌یخچال که قبلا دمای آن روی ۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود، منتقل شدند. پس از دو ساعت سردسازی و تعادل و رسیدن دمای نمونه‌ها به ۴ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌های منی از نظر فراسنجه‌های تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشا پلاسمایی و ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها برای انجماد ابتدا در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شدند، پایوت‌ها به‌مدت ۷ دقیقه در فاصله ۴ سانتی‌متر از سطح نیتروژن مایع قرارگرفته و بعد در نیتروژن مایع غوطه‌ور شده و تا زمان ارزیابی در داخل تانک ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شدند (۱۵). برای ارزیابی‌ها، پایوت‌ها از ازت مایع ازت خارج شده و در داخل بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه یخ گشایی شدند و سپس فراسنجه‌های تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشا پلاسمایی، ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی و میزان مالون‌دی‌آلدهید مایع منی اندازه گیری شد (۲۹).

ارزیابی تحرک اسپرم: پس از یخ‌گشایی مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی را روی لام قرار داده و بعد از پوشاندن با لامل، روی صفحه میکروسکوپ گذاشته و بااستفاده از نرم‌افزار کاسا (CASA, Video Test Sperm 3.1 Russia) (جدول یک) باکمک میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ×۲۰ و شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم، فراسنجه‌های TM(تحرک کل)، PM (تحرک پیش‌رونده)، BCF (فرکانس حرکت جانبی)، ALH (بیش‌ترین دامنه حرکت جانبی)، VAP (سرعت اسپرم در خط مستقیم)، VCL (سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده)، VSL (سرعت پیش‌رونده اسپرم) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۳۰).

جدول ۱: مشخصات تنظیمات سیستم CASA مدل Video Test Sperm 3.1

پارامتر	تنظیمات
نرخ فریم (هرتز)	۵۳
فریم حاصل شده	۳۰
حداقل کنتراست	۵۰
Threshold	۸۹
اندازه سلول (پیکسل)	۲
حداقل VSL	۱۲
حداقلVCL	۴۰
حداقلVAP	۲۰
بزرگنمایی میکروسکوپ	۲۰
دما	۳۷

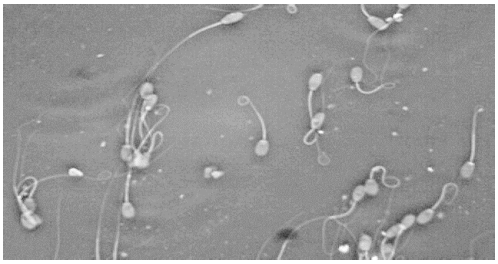
ارزیابی زنده‌مانی اسپرم: برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. بدین منظور ۱۰ میکرو لیتر نمونه منی رقیق‌شده از هرگروه تیماری را (طی سردسازی و پس از یخ‌گشایی) برروی یک لام قرارگرفته و با ۲۰ میکرومولار از رنگ ائوزین-نیگروزین مخلوط شدند. سپس توسط یک لام دیگر نمونه رنگ‌شده برروی لام گسترش‌یافته و پس از خشک شدن توسط میکروسکوپ فاز کنتراست (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) با بزرگ‌نمایی ×۴۰۰ و شمارش ۲۰۰ حداقل اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده (رنگ نشده) و مرده (رنگ شده) تعیین شدند (شکل ۱) (۳۱).



شکل ۱: زنده‌مانی اسپرم به‌وسیله تست ائوزین نیکروزین

ارزیابی مورفولوژی اسپرم: برای ارزیابی اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی از تست هانکوک استفاده شد، بدین منظور ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه را به میکروتیوب‌های حاوی ۱۵۰ میکرولیتر محلول هانکوک که شامل فرمالین ۳۷ درصد (۶۲/۵ میلی‌لیتر)، محلول نمکی (محلول سالین) (۱۵۰ میلی‌لیتر)، محلول بافر فسفات (۱۵۰ میلی‌لیتر) و آب دوبار تقطیر (۵۰۰ میلی‌لیتر)، افزوده شده و سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و توسط یک لامل پوشانده شد. باشمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ×۴۰۰ (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) درصد اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه شد (۳۲).

سلامت غشا پلاسمایی اسپرم: برای ارزیابی سلامت غشا اسپرم از آزمون هاست (HOST) استفاده شد. برای این منظور ۱۰ میکرو لیتر از مایع منی به ۱۰۰ میکرولیتر محیط هایپواسموتیک هاست (۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات سدیم، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی‌اسمول) اضافه شد. قرارگرفتن اسپرم قوچ در محیطی با فشار اسمزی پایین‌تر (هایپواسمول) می‌تواند باعث تمایز اسپرم‌های با غشا سالم از اسپرم‌هایی با غشا آسیب‌دیده شد. بدین‌صورت که دم اسپرم‌های سالم پس از مواجهه با این محیط متورم شده و به‌شکل پیچ‌خورده درمی‌آید (۳۳). به‌منظور انجام این آزمایش، ۱۰ میکرومولار از نمونه اسپرم یخ‌گشایی شده با ۱۰۰ میکرومولار از محلول هایپواسمول فوق درون یک میکروتیوب مخلوط شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری بادمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ۵ میکرومولار از محلول فوق برروی یک لام قرارگرفته و درصد اسپرم‌های با دم متورم و پیچ‌خورده با شمارش ۲۰۰ اسپرم و بزرگ‌نمایی ×۴۰۰ با میکروسکوپ فاز کنتراست (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) تعیین شد (شکل ۲) (۱۵).



شکل ۲: بررسی یک‌پارچگی غشا اسپرم به‌وسیله تست هاست

مالون‌دی آلدهید: غلظت مالون‌دی‌آلدهید، به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید در نمونه‌های مایع منی، بااستفاده از واکنش اسید تیوباربیتوریک اندازه‌گیری شد (۳۰). بدین منظور، ابتدا به‌منظور رسوب پروتئین‌ها، ۱ میلی‌لیتر از محلول هر گروه تیماری بعد از یخ‌گشایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۲ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک، در یک لوله استریل مخلوط شده و سپس جهت جلوگیری از وقوع پراکسیداسیون لیپیدی در طی زمان انجام آزمایش، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول هیدروکسی تولوئن بوتیله شده یا (BHT دو درصد در اتانول) به‌همراه ۱ میلی‌لیتر EDTA به‌محلول موردنظر افزوده شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه بادور g×۱۲۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی را برداشته و با ۱ میلی‌لیتر از محلول اسید تیوباربیتوریک ۰/۶۷ درصد در یک فالکن مخلوط کرده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (T80 UV/VIS PG Instruments Ltd, UK) اندازه‌گیری شدند (۳۰).

آنالیز آماری

این طرح با ۵ تیمار (۴ سطح آنتی‌اکسیدانتی به‌همراه گروه شاهد) در ۵ تکرار طی دو مرحله انجام شد. داده‌های به‌دست آمده برای پارامترهای درصد تحرک کل، تحرک پیش‌رونده زنده‌مانی، پاسخ به‌محلول HOST، هانکوک طی سردسازی و داده‌های تحرک کل و پیش‌رونده، فراسنجه‌های کنتیکی اسپرم، زنده‌مانی، پاسخ به‌محلول HOST، هانکوک و غلظت مالون‌دی‌آلدهید بعد از انجماد به‌وسیله رویGLM نرم‌افزار (۹.۳) SAS در قالب طرح کاملا تصادفی مورد آنالیز قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی استفاده شد. مدل آماری این طرح عبارت است از:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Y_{ij} = شاهده ij ام
μ = میانگین جمعیت
T_i = اثر تیمارها
e_{ij}= اثر عوام ناشناخته ij ام

نتایج

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که افزودن سطوح ویتامین A در محیط رقیق‌کننده طی سردسازی مایع منی تا ۴ درجه سانتی‌گراد هرچند باعث بهبود فراسنجه‌های مورد ارزیابی شد اما نتوانست تاثیر معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در افزایش تحرک، زنده‌مانی سلامت غشا و کاهش اسپرم‌هایی با مورفولوژی ناسالم بگذارد.

جدول ۲: تاثیر سطوح مختلف ویتامین A بر فراسنجه‌های حرکتی و زنده‌مانی اسپرم قوچ قزل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (میانگین±SEM)

متغیر	کنترل	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	SEM	P-value
TM (%)	۷۸/۷۱^{a}	۷۹/۱۰^{a}	۷۹/۸۱^{a}	۸۰/۰۰^{a}	۷۹/۶۳^{a}	۰/۸۱	۰/۱۷
PR (%)	۵۸/۲۰^{a}	۵۸/۴۰^{a}	۵۹/۰۰^{a}	۶۰/۲۰^{a}	۵۸/۴۰^{a}	۰/۰۹	۰/۱۰
زنده‌مانی (%)	۸۶/۸۲^{a}	۸۷/۲۱^{a}	۷۹/۹۸^{a}	۸۶/۲۰^{a}	۸۵/۸۳^{a}	۰/۸۱	۰/۸۱
سلامت غشا (%)	۷۶/۲۰^{a}	۷۶/۸۰^{a}	۷۷/۸۰^{a}	۷۹/۸۰^{a}	۷۷/۶۰^{a}	۰/۱۷	۰/۸۱
اسپرم ناسالم (%)	۵/۸۸^{a}	۵/۸۶^{a}	۵/۰۵^{a}	۴/۹۹^{a}	۵/۶۱^{a}	۰/۸۵	۰/۰۹

TM: جنبایی کل، PM: جنبایی پیش‌رونده

نتایج جدول شماره ۳ نشان می‌دهد که افزودن ویتامین A تاثیرات سودمندی در تحرک اسپرم قوچ بعد از انجماد و یخ‌گشایی دربر داشته است، براساس نتایج حاصل از جدول دو نشان داد افزودن سطوح ۱۵ میکرومول ویتامین A در محیط انجماد سبب افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در تحرک کل شد و هم‌چنین سطوح ۱۰ و ۱۵ میکرو مول سبب افزایش تحرک پیش‌رونده به‌صورت معنی‌داری شد ($p<۰/۰۵$). در رابطه با فراسنجه‌های کینتیکی اسپرم بعد از انجماد سطح ۱۵ میکرومول توانست فراسنجه‌های VAP، VSL و BCF را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش دهد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳: تاثیر افزودن سطوح مختلف ویتامین A ویژگی‌های حرکتی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ قزل (میانگین±SEM)

متغیر	کنترل	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	SEM	P-Value
TM (%)	۵۴/۶۰^{b}	۵۵/۲۰^{b}	۵۸/۰۰^{ab}	۶۱/۴۰^{a}	۵۸/۰۰^{ab}	۱/۰۶	۰/۰۰۱
PR (%)	۲۷/۰۰^{c}	۲۹/۲۰^{c}	۳۲/۴۰^{ab}	۳۴/۴۰^{a}	۲۹/۸۰^{bc}	۰/۶۹	<۰/۰۰۱
VAP(µm/s)	۵۹/۲۳^{b}	۶۱/۹۲^{b}	۶۲/۸۸^{ab}	۶۷/۷۶^{a}	۶۲/۱۴^{b}	۱/۱۸	۰/۰۱۱
VSL(µm/s)	۵۴/۱۸^{b}	۵۵/۸۹^{b}	۵۸/۴۵^{ab}	۶۲/۶۵^{a}	۵۷/۸۴^{ab}	۱/۴۰	۰/۰۰۴
ALH(µm)	۴/۵۱^{a}	۴/۷۹^{a}	۴/۴۱^{a}	۴/۹۴^{a}	۴/۸۰^{a}	۰/۳۱	۰/۷۴
VCL(µm/s)	۱۰۹/۴۸^{a}	۱۱۴/۷۸^{a}	۱۱۴/۴۹^{a}	۱۱۷/۱۶^{a}	۱۱۰/۹۵^{a}	۱/۸۹	۰/۰۶
BCF(Hz)	۲۴/۲۰^{b}	۲۴/۷۲^{ab}	۲۵/۲۱^{ab}	۲۷/۳۷^{a}	۲۵/۲۳^{ab}	۰/۶۶	۰/۰۳۱

میانگین‌ها با حروف ناهمسان (a,b,c) بین تیمارها در هر سطر بیان‌گر تفاوت معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).

اثرات افزودن سطوح مختلف ویتامین A در محیط انجمادی بر زنده‌مانی و سلامت غشا پلاسمایی اسپرم پس از یخ‌گشایی در جدول ۴ نشان داده شد است، نتایج حاصل نشان می‌دهد که افزودن سطح ۱۰ و ۱۵ میکرو مول از ویتامین A به‌رقیق‌کننده توانست میزان زنده‌مانی و سلامت غشا پلاسمایی اسپرم را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش بدهد، هم‌چنین افزودن سطح ۱۵ میکرومول ویتامین A توانست میزان اسپرم‌هایی با ریخت شناسی ناسالم را بعد از انجماد و یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد به‌صورت معنی‌داری کاهش بدهد ($p<۰/۰۵$).

درارتباطه به‌میزان مالون‌دی‌آلدهید مایع منی پس از یخ‌گشایی نتایج حاصل از جدول ۴ نشان می‌دهد که اضافه کردن سطح ۱۵ میکرومولار ویتامین A توانست به‌طور معنی‌داری میزان غلظت مالون‌دی‌آلدهید را به‌صورت معنی‌داری کاهش بدهد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۴: تاثیر افزودن سطوح مختلف ویتامین A بر صفات زنده‌مانی، یک‌پارچگی غشا پلاسمایی، میزان مورفولوژی غیرطبیعی و سطح مالون‌دی‌آلدهید طی انجماد و یخ‌گشایی (میانگین±SEM)

متغیر	کنترل	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	SEM	P-Value
زنده‌مانی(%)	۶۵/۴۰^{c}	۶۷/۷۱^{bc}	۷۱/۴۳^{ab}	۷۴/۲۰^{a}	۷۰/۴۵^{abc}	۱/۳۴	۰/۰۰۲
سلامت غشا(%)	۵۲/۹۰^{b}	۵۳/۴۴^{ab}	۵۵/۲۰^{ab}	۵۶/۹۴^{a}	۵۴/۵۲ ^{abc}	۰/۹۴	۰/۰۰۳
اسپرم ناسالم (%)	۱۸/۰۵^{a}	۱۷/۸۶^{ab}	۱۶/۰۵^{ab}	۱۴/۹۳^{b}	۱۷/۲۱^{ab}	۰/۵۸	۰/۰۰۵
مالون دی آلدهید ((nmol/ml)	۵/۲۱^{a}	۵/۱۷^{a}	۴/۶۳^{ab}	۴/۳۷^{b}	۴/۷۵^{ab}	۰/۱۸	۰/۰۱۵

میانگین‌ها با حروف ناهمسان (a, b, c) بین تیمارها در هر سطر بیان‌گر تفاوت معنی‌داری است ($p<۰/۵$)

بحث

به‌طورکلی، گزارش شده است که ذخیره کردن مایع منی با سردسازی و انجماد باعث کاهش ظرفیت باروری اسپرم همراه با تحرک زنده‌مانی اسپرم می‌شود و درنتیجه به‌خاطر تجمع گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) منجر به‌مرگ سلول‌های اسپرم می‌شود. وجود مقادیر بالای اسید چرب غیراشباع در غشای اسپرم پستانداران باعث حساسیت هرچه بیش‌تر آن‌ها در برابر افزایش رادیکال‌های آزاد می‌کند و باعث وارد شدن آسیب‌هایی به‌اسپرم طی سردسازی و انجماد می‌کند. افزایش میزان ROS همراه با کاهش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی منجر به‌عدم تعادل اکسیداسیون (Redox) می‌شود که می‌تواند زنده‌مانی، تحرک، غشای لیپیدی و اندامک‌های داخلی مثل میتوکندری را تحت تاثیر قرار بدهد و درنهایت میزان باروری را کاهش بدهد. برای مقابله با مضرات افزایش غلظت ROS بیش‌ازحد فیزیولوژیکی در طول انجماد اسپرم از آنتی‌اکسیدانت‌ها به‌صورت گسترده‌ای در گونه‌های مختلف استفاده می‌شود (۳۴). شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌توانند تاثیر منفی استرس اکسیداتیو پایدار را در طی انجماد اسپرم در گونه‌های مختلف کاهش می‌دهد (۳۵).

در مطالعه حاضر باافزودن سطوح بهینه ویتامین A به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت به‌محیط سردسازی و انجماد اسپرم قوچ توانست میزان زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم را به‌طور چشم‌گیری افزایش دهد که این نتایج هم‌سو با مطالعات پیشین است Maya-Soriano, Taberner (۲۲) بیان کردن که افزودن ۶ میلی‌مول رتینول به‌محیط رقیق‌کننده اسپرم گاو هنگام نگه‌داری به‌مدت سه ساعت در دماهای متفاوت (۴، ۲۱ و ۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد) سبب افزایش زنده‌مانی، غشای پلاسمایی اسپرم‌هایی نسبت به گروه شاهد شد هم‌چنین سبب کاهش اسپرم‌هایی با غشا اکروزومی غیرنرمال شد که دلیل آن را خاصیت جاروب کنندگی ROS در رتینول دانستند، همین‌طور Tvrda, Mackovich (۳۶) گزارش دادند که افزودن لیکوپن به‌عنوان پیش سازی از ویتامین A به‌محیط انجمادی اسپرم گاو طی انجماد و یخ‌گشایی به‌مقدار قابل توجهی میزان

پراکسیداسیون لیپید و آسیب‌های DNA را کاهش داد و باعث افزایش اسپرم‌هایی با غشای آکروزومی نرمال نسبت به گروه شاهد گردید (p<۰/۰۰۱). برخی از پیش‌سازهای ویتامین A به‌عنوان اجزای مهم دفاع آنتی‌اکسیدانتی دربرابر پراکسیداسیون لیپید در سلول‌های زنده شناخته‌شده‌اند (۳۷)، و از غشا پلاسما در برابر پراکسیداسیون لیپید محافظت می‌کند (۳۸). گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون چربی‌ها سبب اختلال در غشا میتوکندری، کاهش میزان ATP و آسیب آکسونم اسپرم شده و درنهایت باعث کاهش حرکت پیش‌رونده اسپرم خواهد شد (۳۹) و هم‌چنین کاهش ATP سبب اختلال در عمل‌کرد غشا می‌شود (۴۰).

نتایج این پژوهش حاکی از این است که ویتامین A باعث افزایش معنی‌داری در فراسنجه‌های تحرک شد که نتایج حاصل هم‌سو با مطالعات محققین بیان کردند که افزودن ۶ میلی‌مول رتینول به‌محیط رقیق‌کننده اسپرم گاو سبب افزایش فراسنجه‌های BCF در دماهای مختلف نگه‌داری نسبت به‌گروه شاهد و هم‌چنین باعث افزایش VSL طی ۳ ساعت نگه‌داری در دمای ۴۱/۵ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد و VCL در دمای ۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد شد (۲۲) و هم‌چنین محققین پیشین نیز گزارش دادند هم‌بستگی مثبتی بین محتوای رتینول در پلاسمای منی و تحرک اسپرم وجود دارد (۴۱) و همین‌طور دیگر محققین گزارش کردند که افزودن ۱/۵ میلی‌مول لیکوپن (پیش ساز رتینول) به‌محیط رقیق‌کننده اسپرم گاو به‌صورت معنی‌داری سبب افزایش فراسنجه‌های تحرک پس انجماد و یخ‌گشایی شد و همین‌طور فعالیت میتوکندری اسپرم بعد از انجماد و یخ‌گشایی در سطح بالاتری از گروه شاهد بود و باعث کاهش میزان ROS تولیدی در نمونه منی منجمد شده شد (۳۶).

انجماد اسپرم با تغییرات axonemal همراه است، که منجر به‌اختلال در رفتار حرکت اسپرم و پتانسیل غشای میتوکندری، تخلیه ATP، واکنش آکروزوم زودرس و افزایش تغییرات مورفولوژیکی می‌شود (۴۲). گزارش شده است که ارتباطات مهمی بین تحرک اسپرم، پایداری ساختارهای غشایی و متابولیسم میتوکندری وجود دارد (۴۳) محققین دیگر نیز بیان کردن که لیکوپن به‌عنوان پیش‌ساز ویتامین A در رقیق‌کننده اسپرم قوچ توانست از اثرات مخرب معمول انجماد بر تحرک اسپرم، مورفولوژی، یک‌پارچگی آکروزوم و بقای سلول جلوگیری می‌کند (۴۲). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که افزودن ویتامین A به‌محیط رقیق‌کننده طی عمل‌آوری و انجماد سبب کاهش اسپرم با ریخت‌شناسی ناسالم شد که هم‌سو با نتایج محققین پیشین بود که بیان کردند که هم‌بستگی مثبتی بین محتوای رتینول که یکی از پیش‌سازهای ویتامین A است در پلاسمای با نرمال بودن اسپرم وجود دارد، زیرا سطح پایین‌تری از ویتامین A منجر به‌بالاتر بودن ناهنجاری‌های میانی اسپرم قوچ و پیچ‌خوردگی دم می‌شود که به‌شدت سبب اختلال در تحرک می‌شود (۴۴). همین‌طور محققین پیشین نیز بیان کردند که ویتامین A به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و رفع استرس اکسیداتیو نقش دارد. عینی و محمد پور در مطالعه خود گزارش دادند که ویتامین A اثر مفیدی در اسپرماتوژنز داشته و همین‌طور باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم موش شد که هم‌سو با نتایج پژوهش حاضر است که افزودن ویتامین A در محیط رقیق‌کننده طی انجماد و یخ‌گشایی توانست آسیب‌های انجمادی را کاهش بدهد و باعث افزایش فراسنجه تحرک شود (۴۵). مطالعات مختلفی بااستفاده از افزودن آنتی‌اکسیدانت‌های مختلف در رقیق‌کننده منی برای کاهش اثرات منفی پراکسیداسیون لیپیدی انجام شده است (۱۵، ۳۴، ۴۶).

تحقیقات نشان داده است که مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی، می‌تواند باعث تخریب کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها شد (۴۷). تحت شرایط تسلط پراکسیدانت‌ها بر آنتی اکسیدانت‌ها، تعادل گلوتاتیون پراکسیداز بر گلوتاتیون، به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو مختل می‌شود. که محققین گزارش دادند که افزودن ویتامین آنتی‌اکسیدانتی

E و C باعث تعادل بین گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون شد که نهایتا سبب بهبود فراسنجه‌های تحرکی، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی و حفظ یک‌پارچگی DNA شد که هم‌سو با نتایج این پژوهش بود که افزودن ویتامین A به‌محیط رقیق‌کننده توانست پراکسیداسیون لیپید را کاهش بدهد و در نتیجه سبب افزایش زنده‌مانی و تحرک شد.

بررسی‌های ما نشان داد که ویتامین A توانایی این را دارد که تاحدودی باعث تعادل اکسیداتیو در اسپرم شود و از تنش اکسیداتیو در نوسانات دمایی (سردسازی، انجماد و یخ‌گشایی) جلوگیری کند و همین‌طور ویتامین A توانایی جلوگیری از آسیب پراکسیداتیو به لیپیدهای اسپرم را در مقایسه با گروه شاهد دارد. ساختارهای غشای اسپرم قوچ حاوی سطوح بالای اسیدهای چرب اشباع نشده چندگانه، پروتئین‌های حاوی سولفیدریل و DNA به‌طور فوق‌العاده‌ای به فرآیند انجماد حساس هستند، کاروتنویئدها، نسبت GSH اکسید شده به‌احیا شده پس از فریز اسپرم قوچ کاهش می‌دهند (۳۶). عمل‌کرد مهم دیگر رتینوئیدها توانایی تنظیم دقیق تعادل ردوکس سلولی است. در سلول‌ها، اتصال رتینوئید به‌گیرنده‌های اسید رتینوئیک، رونویسی ژن‌های آنتی‌اکسیدانت، ازجمله سوپراکسید دیسموتاز (۴۸) و گلوتاتیون S ترانسفراز را تنظیم می‌کند (۴۹) که آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نقش بارزی در دفاع داخلی سلولی ایفا می‌کند (۵۰). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز پاک‌کننده آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن هستند که اولین ترکیبات در تشکیل زنجیره ROS هستند. آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز از آنزیم‌هایی با فعالیت پراکسیدازی است که نقش مهمی در جاروب کردن پراکسیداسیون‌ها دارد و سبب محافظت از سلول در برابر تنش اکسیداتیو می‌شود، هم‌چنین گلوتاتیون می‌تواند ویتامین‌های E و C اکسید شده را دوباره احیا کرده و آن‌ها را به‌ساختار اولیه آنتی‌اکسیدانتی برگرداند. میزان تولید ROS می‌تواند بیش از توانایی سیستم آنتی‌اکسیدانتی سلولی باشد و درنتیجه به‌سلول‌ها آسیب برساند. درحقیقت، مقدار بیش‌ازحد ROS می‌تواند باعث پراکسیداسیون محتوای اسید چرب اشباع نشده غشا اسپرم شود، منجر به‌کاهش تدریجی تحرک و ازبین‌رفتن سیالیت غشا پلاسمایی می‌شود (۵۱). مطالعات قبل گزارش شده است که ویتامین‌های A (رتینول) ، E (a-توکوفرول) و C (آسکوربات) به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت‌های اصلی برای محافظت دربرابر بیماری‌ها و فرآیندهای دژنراتیو ناشی از استرس اکسیداتیو عمل می‌کنند (۵۲). سیاچیو همکاران (۵۳) نشان داد که تجویز ویتامین A به‌موش‌ها غلظت‌های رتینول و رتینل استرها را در غشا سلول مغز و قلب افزایش می‌دهد و انجام این کار با افزایش مقاومت لیپیدهای غشایی دربرابر استرس اکسیداتیو همراه است.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که افزودن سطوح مختلف ویتامین A به‌رقیق‌کننده اسپرم قوچ طی سردسازی و تعادل دمایی در ۴ درجه سانتی‌گراد نتوانست تاثیر معنی‌داری در بهبود فراسنجه‌های مورد ارزیابی داشته باشد، از طرفی افزودن سطح ۱۵ میکرومول ویتامین A به‌محیط رقیق‌کننده اسپرم قوچ طی انجماد و یخ‌گشایی توانست باعث افزایش میزان تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشا پلاسمایی هم‌چنین کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید و اسپرم‌هایی با ریخت‌شناسی ناسالم به‌طور معنی‌داری شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بابت زحمات و یاری کارکنان ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. Lecewicz M, Strzeżek R, Majewska AM, Purpurowicz PS, et al. The effect of different concentrations of caffeine, pentoxifylline and 2’-deoxyadenosine on the biological properties of frozen-thawed canine semen. Annals of Animal Science. 2019; 19(3):733-746.

2. 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.
3. Ansari M, Rakha B, Akhter S, Akhter A, et al. Effect of glutathione on pre and post-freezing sperm quality of Indian red jungle fowl (Gallus gallus murghi). Theriogenology. 2021; 172: 73-79.
4. Evans G, Maxwell W. Frozen storage of semen. Salamon's artificial insemination of sheep and goats: Butterworths Wellington; 1987. p. 122-41.
5. Chatdarong K, Chaivechakarn A, Thuwanut P, Ponglowhapan S. Effects of cold storage prior to freezing on superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities, level of total reactive oxygen species and sperm quality in dogs. Reproduction in Domestic Animals. 2012;47(s6):274-7.
6. Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. Bioessays. 1994;16(4):259-67.
7. Asgari M, Khodaei Motlagh M, Kazemi Bonchenari M, Vahedi V. Antioxidant effect of carob seedextract (Ceratoniasiliqua L) on quality parameters Farahani ram sperm after freeze-thawing. Journal of Cell & Tissue. 2020;11(1):1-12.
8. Bucak MN, Tuncer PB, Sarıözkan S, Başpınar N, et al. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. Cryobiology. 2010;61(3):248-53.
9. LASSO JL, NOILES EE, ALVAREZ JG, STOREY BT. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. Journal of Andrology. 1994;15(3):255-65.
10. Sinha M, Sinha A, Singh B, Prasad R. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. Animal reproduction science. 1996;41(3-4):237-43.
11. Michael A, Alexopoulos C, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, et al. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. Theriogenology. 2007;68(2):204-12.
12. Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. Molecular human reproduction. 1997;3(3):203-13.
13. Pouya M, Khodaei Motlagh M, Kheltabadi Farahani AH, Mirzaei M. Effect of different levels of zinc sulfate of semen extender in Farahani ram breed sperm quality after freezing-thawing. Journal of Cell & Tissue. 2017;8(4):374-86.
14. Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, et al. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. Journal of andrology. 2005;26(1):15-24.
15. Nazari M, Daghigh Kia H, Ebrahimi M, Najafi A, et al. [Effect of 2, 4 dinitrophenol as a targeted antioxidant on Ghezel ram sperm on functional quality performance after freeze-thawing process of semen on non-breeding season]. Animal Sciences Journal. 2021;34(130):181-90.
16. Tamura T, Goldenberg R, Johnston K, Cliver S, et al. Serum concentrations of zinc, folate, vitamins A and E, and proteins, and their relationships to pregnancy outcome. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica Supplement. 1997;165:63-70.
17. El Beitune P, Duarte G, Vannucchi H, Quintana SM, et al. Serum vitamin A during pregnancy and effects on obstetrics and perinatal outcomes in HIV infected pregnant women. Archivos latinoamericanos de nutricion. 2004;54(4):419-27.
18. Scholl TO, Chen X, Sims M, Stein TP. Vitamin E: maternal concentrations are associated with fetal growth. The American journal of clinical nutrition. 2006;84(6):1442-8.

19. Maya-Soriano M, Taberner E, Sabés-Alsina M, López-Béjar M. Retinol might stabilize sperm acrosomal membrane in situations of oxidative stress because of high temperatures. Theriogenology. 2013;79(2):367-73.
20. Monaghan BR, Schmitt FO. The effects of carotene and of vitamin A on the oxidation of linoleic acid. Journal of Biological Chemistry. 1932;96:387-95.
21. Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. Free Radical Biology and Medicine. 1999;26(5-6):746-61.
22. Maya-Soriano M, Taberner E, López-Béjar M. Retinol improves in vitro oocyte nuclear maturation under heat stress in heifers. Zygote. 2013;21(4):377.
23. Hogarth CA, Griswold MD. Retinoic acid regulation of male meiosis. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity. 2013;20(3):217-23.
24. Gholamitabar Tabari M, Jorsaraei SGA, Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Ahmadi AA, et al. Evaluation of Novel Mouse-Specific Germ Cell Gene Expression in Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cell-Like Cells In Vitro with Retinoic Acid Treatment. Cellular reprogramming. 2018;20(4):245-55.
25. Arkoun B, Dumont L, Milazzo J-P, Way A, et al. Retinol improves in vitro differentiation of pre-pubertal mouse spermatogonial stem cells into sperm during the first wave of spermatogenesis. PloS one. 2015;10(2):e0116660.
26. Hogarth CA, Griswold MD. The key role of vitamin A in spermatogenesis. The Journal of clinical investigation. 2010;120(4): 956-62.
27. Gambhir K, Ahluwalia B. Vitamin A in bovine sperm acrosomes. Reproduction. 1975;43(1):129-32.
28. Virji N, Vahlquist A, Eliasson R. Vitamin A in human semen. Experientia. 1981;37(12):1267-8.
29. Najafi A, Kia HD, Mohammadi H, Najafi MH, et al. Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. Cryobiology. 2014;69(1):68-73.
30. Shamsolahi M, Daghigh Kia H. Effects of centrifugation and cholesterol-loaded with cyclodextrin in the soybean lecithin-based extender on the quality of the post-thaw sperm of Ghezel ram. Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal. 2019;13(3 (51) Autumn):245-57.
31. Najafi A, Kia HD, Hamishehkar H, Moghaddam G, et al. Effect of resveratrol-loaded nanostructured lipid carriers supplementation in cryopreservation medium on post-thawed sperm quality and fertility of roosters. Animal reproduction science. 2019;201:32-40.
32. Hancock J. The morphology of boar spermatozoa. Journal of the Royal Microscopical Society. 1956;76(3):84-97.
33. Espina-Ávila JA, Magaña-Monforte JG, Aké-Villanueva JR, Aké-López JR. Effect of the use of vitamin "E" in the diluent on the viability of ram sperm. Tropical Animal Health and Production. 2021;53(2):1-6.
34. Riesco MF, Alvarez M, Anel-Lopez L, Neila-Montero M, et al. Multiparametric Study of Antioxidant Effect on Ram Sperm Cryopreservation—From Field Trials to Research Bench. Animals. 2021;11(2):283.
35. Assunção CM, Mendes VRA, Brandão FZ, Batista RITP, et al. Effects of resveratrol in bull semen extender on post-thaw sperm quality and capacity for fertilization and embryo development. Animal Reproduction Science. 2021;226:106697.
36. Tvrda E, Mackovich A, Greifova H, Hashim F, et al. Antioxidant effects of lycopene on bovine sperm survival and oxidative profile following cryopreservation. Veterinární medicína. 2017;62(8):429-36.

37. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. Journal of andrology. 2005;26(6):654-60.
38. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. Archives of biochemistry and biophysics. 1989;274(2):532-8.
39. Daghigh Kia H, Nazari M. [Effect of combination of MitoQ as a targeted antioxidant and Pentoxifylline as a non-targeted in Lake based extender on functional quality of rooster sperm during chilled storage on 4◦C]. Journal of Animal Science Research. 2020;30(3):71-83.
40. Salamon S, Maxwell W. Storage of ram semen. Animal reproduction science. 2000;62(1-3):77-111.
41. Kao S-H, Chao H-T, Chen H-W, Hwang TI, et al. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. Fertility and sterility. 2008;89(5):1183-90.
42. Ball BA. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. Animal reproduction science. 2008;107(3-4):257-67.
43. Martinez-Pastor F, Johannisson A, Gil J, Kaabi M, et al. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. Animal reproduction science. 2004;84(1-2):121-33.
44. Abdulkareema T, Al-Habobyb A, Al-Mjameia S, Hobia A. Sperm abnormalities associated with vitamin A deficiency in rams. Small Ruminant Research. 2005;57(1):67-71.
45. Mohammad Eini A, Mohammadpour AA. Protective effects of Vitamin A on the testicular tissue of mice treated with Prednisolone. Applied Biology. 2020;10(40):71-82.
46. Nazari M. [A review study on the effect of various antioxidant supplements on maintaining and improving the performance of sperm parameters]. Iranian Journal of Biology. 2021.
47. Zhang J, Bao X, Zhang M, Zhu Z, et al. MitoQ ameliorates testis injury from oxidative attack by repairing mitochondria and promoting the Keap1-Nrf2 pathway. Toxicology and applied pharmacology. 2019;370:78-92.
48. Ahlemeyer B, Bauerbach E, Plath M, Steuber M, et al. Retinoic acid reduces apoptosis and oxidative stress by preservation of SOD protein level. Free Radical Biology and Medicine. 2001;30(10):1067-77.
49. Lo H-W, Ali-Osman F. Genomic cloning of hGSTP1* C, an allelic human Pi class glutathione S-transferase gene variant and functional characterization of its retinoic acid response elements. Journal of Biological Chemistry. 1997;272(52):32743-9.
50. Cocchia N, Pasolini M, Mancini R, Petrazzuolo O, et al. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. Theriogenology. 2011;75(7):1201-10.
51. Rossi T, Mazzilli F, Delfino M, Dondero F. Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. Cell and tissue banking. 2001;2(1):9-13.
52. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food and chemical toxicology. 1999;37(9-10):949-62.
53. Ciaccio M, Valenza M, Tesoriere L, Bongiorno A, et al. Vitamin A inhibits doxorubicin-induced membrane lipid peroxidation in rat tissues in vivo. Archives of biochemistry and biophysics. 1993;302(1):103-8.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Summer 2021; 12(2)

Study of different levels of Vitamin A supplementation in extender on sperm quality in cooling storing and cryopreservation condition in Ghezel ram

Nazari M[1] Ph.D., Daghighkia H[1*] Ph.D., Najafi A[2] Ph.D.,

1. Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

* Email corresponding author: daghighkia@tabrizu.ac.ir

Received: 4 Jun. 2021 Accepted: 22 Aug. 2021

Abstract

Aim: This study aimed to investigate the protective effects of different levels of vitamin A on ram sperm diluent during storage until equilibrium and before cryopreservation at 4 °C and freeze-thawing.

Material and Methods: In this study, 4 Ghezel rams were used for semen collection by the artificial vagina. After the initial evaluation, the samples with normal properties were pooled and after the dilution process, 0, 5, 15, and 20 µmol vitamin A were added to the samples and frozen after 2 hours of cooling. Parameters of motility, viability, plasma membrane integrity, and sperm morphology were evaluated in two steps (before and after cryopreservation) as well as malondialdehyde levels after freeze-thawing.

Results: The results showed that the addition of different levels of vitamin A to the extender during cooling at 4 °C had no significant effect on the evaluated parameters ($P < 0.05$). The results after freezing showed that a level of 15 µmol of vitamin A increased the total motility, progressive motility (PM), VAP, and VSL ($P < 0.05$). Plasma membrane integrity and viability increased significantly at the level of 15 µmol and also adding 15 µmol levels to the freezing medium decreased the amount of sperm with abnormal morphology and the amount of malondialdehyde compared to the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: According to the results of adding different levels of vitamin A, the level of 15 µmol has the best performance in improving the evaluated parameters and reduces oxidative stress during cryopreservation and thawing.

Keywords: Antioxidant, Oxidative stress, sperm, Vitamin A