مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۱۲، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰

تاثیر سطوح مختلف ویتامین C در رقیق‌کننده منی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز نجدی بعد از انجماد و یخ‌گشایی

مرتضی مموی .Ph.D*[1]، لیلا پاک‌نهاد .M.Sc[1]، جمال فیاضی .Ph.D[1]، حمیدرضا ایزدنیا .M.Sc[2]، امین کاظمی‌زاده .M.Sc[2]

۱- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، گروه علوم دامی، ملاثانی، اهواز، ایران
۲- مرکز تحقیقات کشاورزی صفی آباد دزفول، خوزستان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mamouei_m@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۸

چکیده

هدف: هدف این پژوهش، مقایسه اثر افزودن سطوح مختلف ویتامین C (صفر، ۱/۵، ۳، ۴/۵ و ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در رقیق‌کننده منی بر شاخص‌های کیفی اسپرم بز نجدی پس از انجماد-یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های منی توسط دستگاه الکتروجاکولیتور از ۴ راس بز نر با متوسط وزن ۵±۵۰ کیلوگرم، هفته‌ای دوبار جمع‌آوری شد. نمونه‌های اسپرم بعد از انجماد-یخ‌گشایی ازنظر تحرک باکمک سامانه آنالیز رایانه‌ای اسپرم (CASA)، درصد اسپرم‌های زنده و ناهنجار، سلامت غشا و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی نیز بعد از انجماد-یخ‌گشایی اندازه‌گیری شدند.

نتایج: نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که رقیق‌کننده‌ی اسپرم بز حاوی سطوح ۳ و ۴/۵ میلی‌گرم ویتامین C در مقایسه با گروه شاهد موجب بهبود تحرک کل، تحرک پیش‌رونده و درصد اسپرم‌های زنده شد ($p<۰/۰۵$). در سلامت غشای اسپرم سطح ۳ میلی‌گرم ویتامین C تفاوت معنی‌داری با شاهد و سطح ۱/۵ میلی‌گرم ویتامین C داشت ($p<۰/۰۵$)؛ اما با سطوح ۴/۵ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C اختلاف معنی‌داری نداشت. درصد اسپرم‌های ناهنجار تحت تاثیر سطوح مختلف ویتامین C قرار نگرفت ($p>۰/۰۵$). ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی اسپرم در سطوح ۴/۵ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C، بیش‌ترین مقدار را به‌خود اختصاص داد و تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد داشتند ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: مطابق با نتایج این پژوهش افزودن سطوح ۳ و ۴/۵ میلی‌گرم ویتامین C به رقیق‌کننده تریس بعد از انجماد اسپرم بز نجدی باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی اسپرم می‌شود.

واژگان کلیدی: اسپرم، انجماد-یخ‌گشایی، بز نجدی، رقیق‌کننده تریس، ویتامین C

مقدمه

انجماد منی پستاندارن، تحولی اساسی در نگه‌داری منی و حفاظت انجماد سلول اسپرم به‌وجود آورده و راهی برای حفظ پروتوپلاسم سلول جنسی می‌باشد که می‌تواند به‌حفظ DNA گونه‌ها در بخش دام‌پروری و آبزی‌پروری و حفظ تنوع‌زیستی کاربرد زیادی داشته باشد و بانک‌های ذخیره اسپرم می‌توانند همراه با دیگر فناوری‌های تولیدمثلی، در بهبود نژادها و حفاظت گونه‌های وحشی و بومی درحال انقراض، نقش مهمی داشته باشند. درواقع از دانش حفظ انجمادی اسپرم در تولیدمثل برای انتخاب جنس نر با ژن‌های برتر و توزیع ژن‌های برتر در گله‌ها، بدون درنظرگرفتن محدودیت زمانی و مکانی، حفظ گونه‌های درحال‌انقراض، حفظ بانک‌های ژنتیکی، کنترل بیماری‌ها و مطالعات روی فعالیت اسپرم و تاثیرات متقابل آن‌ها با گامت می‌توان استفاده کرد (۱).

انجماد اسپرم با اعمال تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عمل‌کردی در غشای اسپرم، میزان زنده‌مانی اسپرم بعد از یخ‌گشایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲). ارزیابی هریک از مراحل انجماد (رقیق‌سازی، تعادل و سردسازی، انجماد و یخ‌گشایی) می‌تواند به‌ساختار غشای پلاسمایی و عمل‌کرد طبیعی اسپرم آسیب رسانده و تحرک و باروری را کاهش دهند (۳، ۴). آسیب‌های وارد شده به‌اسپرم درحین انجماد شامل ایجاد بلورهای یخی، استرس اکسیداتیو، تغییرات اسمزی و سازمان‌دهی مجدد لیپید-پروتئین در غشای سلولی است (۵، ۶). تنش اکسیداتیو از مهم‌ترین عوارض ناشی از فرایند انجماد-یخ‌گشایی برای اسپرم است. غلظت عوامل آنتی‌اکسیدانتی مایع منی در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها طی فرایند انجماد-یخ گشایی ناکافی به‌نظر می‌رسد، زیرا در هنگام عمل‌آوری و رقیق‌کردن منی کاهش قابل توجهی می‌یابد (۷). اضافه کردن آنتی‌اکسیدانت‌های لازم برای محافظت از غشای سلول‌های اسپرم و جلوگیری از تشکیل پراکسیداسیون اکسیژن در زمان انجماد اسپرم لازم و ضروری است اثرات زیان بار رادیکال‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داده و سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی منی از قبیل تحرک و یک‌پارچگی غشا پس از یخ‌گشایی شود (۸، ۹، ۱۰). مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانت‌های موجود در مایع منی ویتامین‌های C و E می‌باشند (۱۱، ۱۲، ۱۳). ویتامین C یک ویتامین محلول در آب است که در غلظت‌های بهینه خاصیت آنتی‌اکسیدانتی دارد، این ویتامین در غلظت‌های پایین به‌صورت پیش‌آنتی‌اکسیدانت عمل می‌کنند، و منجر به‌تبدیل فلزات سه ظرفیتی به‌شکل‌های که می‌توانند با اکسیژن واکنش داده و باعث تولید آغازکننده‌های پراکسیداسیون می‌شود. ویتامین C به‌عنوان کوفاکتور برای حداقل ۸ آنزیم مورد نیاز است و هم‌چنین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت با رادیکال‌های آزاد واکنش نشان می‌دهد (۱۴). این ویتامین به‌عنوان اولین خط دفاعی آنتی‌اکسیدانتی در خون و پلاسمایی مایع منی مطرح بوده و موجب مهار روند اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها می‌شود (۱۵). در حدود ۶۵ درصد از ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی پلاسمای مایع منی افراد بارور مربوط به‌این ویتامین است زیرا غلظت آن در پلاسمایی مایع منی حدود ۱۰ برابر بیش‌تر از پلاسمای خون است (۱۶). ویتامین C با جذب رادیکال‌های آزاد از فعالیت رادیکال‌های پراکسیل جلوگیری می‌کند، و با این‌کار از آسیب به DNA اسپرم ممانعت به‌عمل می‌آورد (۱۱، ۱۶، ۱۲). هدف پژوهش حاضر بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانتی سطوح مختلف ویتامین C در فرایند نگه‌داری اسپرم بعد از انجماد-یخ‌گشایی و تاثیر آن بر پارامترهای کیفی مربوط به اسپرم بز نجدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

محل انجام پژوهش: پژوهش حاضر در ایستگاه دامپروری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در شهر ملاثانی در ۳۶ کیلومتری شمال شرقی اهواز انجام شد، این مکان دارای طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۵۲ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۱

درجه و ۳۶ دقیقه، می‌باشد. بزها مورد مطالعه در یک جایگاه مسقف نیمه باز با کف بتونی، در نزدیکی جایگاه بزهای ماده نگه‌داری می‌شدند. جایگاه دارای آخور و آبشخور دسته جمعی بوده، آب و خوراک در حد اشتها در اختیار دام‌ها قرار داشت.

شیوه‌ی اجرای طرح: در این آزمایش، از ۴ راس بز ۲ تا ۳ ساله نجدی با متوسط وزن ۵±۵۰ کیلوگرم استفاده شد. بزهای به‌مدت دو هفته برای اسپرم‌گیری به‌وسیله دستگاه الکترواجاکولیتور عادت داده شد و از این طریق نمونه‌های منی جمع‌آوری می‌شد. نمونه‌های منی بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه، هرنمونه ازنظر حجم منی، غلظت، جنبایی و مرفولوژی ارزیابی اولیه شد و فقط نمونه‌های که دارای میانگین حجم ۲-۰/۷۵ میلی‌لیتر، میزان غلظت به‌طور متوسط $۲/۵\times۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر، جنبایی بیش‌تر از ۷۵ درصد و تعداد اسپرم غیرطبیعی کم‌تر از ۱۰ درصد داشتند، برای آزمایش استفاده شدند. برای جلوگیری از اثرات متقابل بین نمونه‌ها و پراکنش‌های فردی منی‌های جمع‌آوری شده مخلوط شدند. سپس از رقیق کننده به‌نسبت ۱ به ۷ اضافه شده (یک قسمت نمونه مایع منی و هفت قسمت محلول رقیق کننده) و بعد به ۵ قسمت تقسیم و به‌آن‌ها سطوح مختلف ویتامین C (به‌صورت پودر آسکوربیک‌اسید تهیه شده از شرکت سیگما) افزوده شد. تیمارها شامل سطوح مختلف ویتامین C (صفر، ۱/۵، ۳، ۴/۵، ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) می‌باشد.

انجماد اسپرم: جهت انجماد نمونه‌ها در یک یونولیت آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، و به مرکز تولید مواد ژنتیکی دام و طیور خوزستان در ایستگاه درآویزه وابسته به جهاد سازندگی استان خوزستان منتقل شد، و کار انجماد اسپرم در آن جا صورت می‌گرفت. بعد از ارزیابی اولیه و اندازه‌گیری pH، نمونه‌های آزمایشی در پایوت ۰/۵ میلی‌متری بسته‌بندی شد و به‌مدت ۲ ساعت به‌یخچال ۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. پس از طی دوره تعادل، پایوت‌ها در فاصله ۴ سانتی‌متری از سطح ازت مایع به‌مدت ۱۵ دقیقه در معرض بخار ازت مایع منجمد و سپس در ازت مایع غوطه‌ور و برای نگه‌داری به تانک ازت منتقل شدند.

یخ‌گشایی اسپرم: برای یخ‌گشایی منی، پس از خارج کردن پایوت‌های حاوی منی از ازت، پایوت‌ها را به‌مدت ۳۰ ثانیه داخل آب قرار داده و سپس محتوی پایوت‌ها به‌داخل لوله‌های میکروتیوپ تخلیه شدند. نمونه‌های منی تحت ارزیابی فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل درصد تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشا، ناهنجاری‌های مرفولوژیکی اسپرم‌ها قرار گرفته شد. به‌منظور افزایش در دقت کار، این آزمایش ۳ بار با فواصل زمانی ثابت و با ۴ تکرار انجام شد. قسمتی از نمونه‌ها که برای انجام آزمایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام کنار گذاشته شده بود جهت جدا شدن پلاسمایی منی سانتریفوژ شدند و تا زمان اندازه‌گیری میزان توان آنتی‌اکسیدانتی تام در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار صورت گرفت.

آماده‌سازی محلول‌ها و رقیق کننده‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده: ویتامین C (به‌صورت پودر آسکوربیک‌اسید تهیه شده از شرکت سیگما)، تریس، فروکتوز، سیتریک‌اسید (منوهیدرات)، ائوزین و نیگروزین از شرکت مرک و روغن ایمرسیون تهیه شد.

رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ: این رقیق‌کننده به‌عنوان رقیق‌کننده پایه در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت شامل: تریس ۳۰/۷ (گرم/لیتر)، سیتریک‌اسید ۱۶/۴ (گرم/لیتر)، فروکتوز ۱۲/۶ (گرم/لیتر)، زرده تخم‌مرغ ۱۵ درصد، گلیسرول ۵ درصد و جنتامایسین ۰/۶ (گرم/لیتر). برای تهیه بافر تریس (۱۰۰ میلی‌لیتر)، ۳/۰۷ میلی‌گرم تریس، ۱/۶۴ میلی‌گرم سیتریک‌اسیدمنوهیدرات و ۱/۲۶ میلی‌گرم فروکتوز را به ۸۰ میلی‌متر آب مقطر اضافه کرده و پس از مخلوط شدن pH آن به ۷ رسانده شد و سپس زرده تخم‌مرغ به‌میزان ۱۵ درصد (حجم/حجم) به‌رقیق‌کننده اضافه شد. برای اضافه کردن زرده تخم‌مرغ ابتدا پوسته تخم‌مرغ با آب شسته و به‌وسیله دستمال کاغذی آغشته به الکل پاک، ضدعفونی و خشک شده. پس از شکستن

تخم‌مرغ و جداکردن سفیده، زرده تخم‌مرغ با تا کردن و فشار دادن کاغذ صافی در ظرف استریل ریخته شد. سپس زرده‌ها به‌کمک هم‌زن شیشه‌ای استریل خوب به‌هم زده شد تا مخلوط شوند و در آخر گلیسرول به‌آن اضافه می‌شود.

اسپرم‌گیری: پیش از شروع عملیات آزمایشی طرح، بزها به‌مدت دوهفته به‌اسپرم‌دهی با استفاده از دستگاه الکترواجاکولاتور عادت داده شدند. دراین روش ابتدا بزهای مقیده شده را خوابانده و پس از تمیز نمودن محیط اطراف بیضه و آلت تناسلی و نیز چیدن موهای پوشاننده‌ی غلاف، شرایط لازم جهت اسپرم‌گیری فراهم شد. سپس الکترود دستگاه را به پارافین آغشته نموده و پس از خارج نمودن مدفوع حیوان، آن را تا عمق ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر وارد رکتوم نموده تا مرکز انزال و غدد ضمیمه‌ی جنسی را که در امتداد مهره‌های L2، L3 و L4 قرار دارند، تحریک نماید. تحریک با ولتاژ کم (۲ ولت) آغاز شد و به‌تدریج افزایش (حداکثر ۸ ولت) یافت. پس‌از هربار افزایش، ولتاژ به صفر برگردانده می‌شد و پس از ۲۰-۱۰ ثانیه استراحت، ولتاژ اعمال شده و پس از رسیدن به ولتاژ ۸، انزال انجام می‌شد و منی انزال شده در فالکون‌های مدرج بزرگ هم‌دما، جمع‌آوری میشد.

تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها: برای بررسی درصد تحرک پیش‌رونده سریع، تحرک پیش‌رونده کند، درصد اسپرم‌های فاقد حرکت و سایر مشخصه‌های حرکتی ازجمله سرعت حرکت در مسیر خطی و منحنی، زاویه حرکت و غیره، یک قطره اسپرم زیر میکرسکوپ نوری متصل به‌مانتیتور و برنامه CASA مشاهد شد. مدل دستگاه مورد استفاده در این مطالعه HFTCASA:6.50(Computer Aided Semen Analysis) بود.

درصد اسپرم‌های زنده و مرده: برای این منظور از روش رنگ‌آمیزی نمونه‌های منی توسط ائوزین-نیگروزین (ساخت شرکت مرک آلمان) استفاده شد. یک قطره نمونه منی رقیق شده را برروی لام گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از افزودن مخلوط رنگ آماده به‌آن، توسط لام تمیز دیگری با زوایه ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد درجه از آن، گسترش تهیه شد. پس‌از تهیه گسترش، لام را روی یک صفحه گرم قرار داده تا خشک شود و پس از خشک شدن گسترش، لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰× و با استفاده از روغن ایمرسیون مورد ارزیابی قرار گرفت. اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را جذب کرده و صورتی رنگ دیده شدند؛ درحالی‌که اسپرم‌های زنده، رنگ ائوزین را به‌خود نگرفته و بی‌رنگ باقی ماندند. حداقل تعداد ۲۰۰ اسپرم در میدان‌های میکروسکوپی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته و درصد اسپرم‌های زنده و مرده برآورد شد.

درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم‌ها: برای ارزیابی مورفولوژیکی اسپرم‌ها، از نمونه‌های آماده شده برای ارزیابی اسپرم‌های زنده و مرده استفاده شد. حداقل تعداد ۲۰۰ اسپرم در میدان‌های میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰× مورد ارزیابی قرار گرفته و سپس ناهنجاری‌های اسپرم‌های مشاهده شده برحسب درصد بیان شد.

سلامت غشا: مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسپرم یخ‌گشایی با ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک دارای فشار اسمزی ۱۰۰ میلی‌اسمولار که حاوی فرکتوز (۹ گرم/لیتر) و سیترات سدیم (۴/۹ گرم/لیتر) بود مخلوط شد، سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل ۳ قطره از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد، حداقل تعداد ۲۰۰ اسپرم در میدان میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس درصد اسپرم‌های دارای غشا یک‌پارچه محاسبه شد.

ارزیابی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی: برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام، ابتدا نمونه‌های منی در حمام بن‌ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند، بعد از جمع‌آوری، جهت جداسازی پلاسمای منی در هرزمان، بلافاصله نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی را از رسوب جدا کرده و در میکروتیوپ‌ها قرار داده و جهت اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام، میکروتیوپ‌های حاوی نمونه پلاسما در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و به آزمایشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند. فعالیت آنتی‌اکسیدانتی تام مایع سمینال به‌روش (FRAP: Ferric Reducing

Ability of Plasma) اندازه‌گیری شد. اساس این روش برمبنایی توانایی آنتی‌اکسیدانت‌های مایع منی در احیا یون فریک به‌یون فرو است که نشان دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های تام می‌باشد. آزمایش FRAP با استفاده از متد Benzie و Strain (۱۷) قدرت آنتی اکسیدانت مایع سمینال (TCA)، اندازه‌گیری و نتایج به‌صورت میکرومولار یون فریک در هر لیتر مایع منی بیان شد. به‌همین منظور ابتدا محلول FRAP به‌قرار زیر تهیه شد: میزان ۱۰ میلی‌لیتر بافر استات با ۱ میلی‌لیتر از ماده تری‌پیریدیل تریازین (TPTZ) محلول در کلریدریک‌اسید (۴۰ میلی‌مول در لیتر) مخلوط شد، سپس به محلول فوق ۱ میلی‌لیتر محلول کلریدفریک (۲۰ میلی‌مول در لیتر) اضافه شد. (تمام مواد از شرکت سیگما Sigma خریداری شدند). این روش توانایی آنتی‌اکسیدانت‌های مایع منی را در کاهش یون فریک به‌یون فرو نشان می‌دهد. پس از تهیه محلول کار، داخل هر چاهک حدود ۱/۵ میلی‌لیتر محلول FRAP اضافه شد و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری انکوبه شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول استاندارد با غلظت‌های مشخص و ۵۰ میکرولیتر از آب مقطر به‌هریک از چاهک‌های مربوطه اضافه شد و مجددا در بن ماری به‌مدت ۱۰ دقیقه حرارات داده شدند و بعد از خارج نمودن کیت‌های آزمایشی از بن‌ماری و تشکیل کمپلکس رنگی، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و مقدار FRAP به‌دست آمده با استفاده از استاندارد Trolox به‌واحد equivalent/LμmolTrolox تبدیل شدند و براساس میکرومول بر میلی‌لیتر بیان شد.

آنالیز آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار INSTAT-3 و آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شده و نمودارها ازطریق برنامه EXCEL رسم شدند. $p<۰/۰۵$ معنی‌دار بودن داده‌ها تلقی شد و هر آزمایش دست‌کم سه مرتبه تکرار شد. داده‌ها نشان‌دهنده means ± SD از سه آزمایش جداگانه است.

نتایج

اثر سطوح مختلف ویتامین C برتحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشا و ناهنجاری مورفولوژیکی اسپرم بز نجدی پس از انجماد-یخ‌گشایی در جدول ۱ بیان شد؛ نتایج نشان داد که اثر ویتامین C بر تحرک کل، تحرک پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). نتایج مربوط به تحرک اسپرم نشان داد که سطوح ۳ و ۴/۵ میلی‌گرم ویتامین C اختلاف معنی‌داری با سطوح شاهد و سطح ۱/۵ میلی‌گرم ویتامین C دارد. سطوح شاهد و ۱/۵ میلی‌گرم ویتامین C تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ($p>۰/۰۵$)، هم‌چنین سطح ۶ میلی‌گرم ویتامین C تفاوت معنی‌داری با سطوح ۱/۵ و ۴/۵ میلی‌گرم ویتامین C نداشت ($p>۰/۰۵$). سطح ۳ میلی‌گرم ویتامین C تفاوت معنی‌داری با سطوح ۶ میلی‌گرم ویتامین C نشان داد ($p<۰/۰۵$). زنده‌مانی اسپرم در سطوح ۳، ۴/۵ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C نسبت به‌تیمار شاهد و سطح ۱/۵ میلی‌گرم ویتامین C تفاوت معنی‌داری نشان دادند ($p<۰/۰۵$). هیچ‌یک از سطوح ۳، ۴/۵ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C تفاوت معنی‌داری باهم نشان ندادند ($p>۰/۰۵$). سلامت غشا اسپرم در سطح ۳ میلی‌گرم ویتامین C نسبت به‌تیمار شاهد و سطح ۱/۵ میلی‌گرم ویتامین C میانگین بالاتری داشته و تفاوت معنی‌داری را با این سطوح نشان داد ($p<۰/۰۵$)؛ البته سطح ۳ میلی‌گرم ویتامین C تفاوت معنی‌داری با سطوح ۴/۵ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C نشان نداد ($p>۰/۰۵$). تیمار شاهد با سطوح ۴/۵ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C تفاوت معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$)، اما با سطح ۱/۵ میلی‌گرم ویتامین C تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$)؛ سطوح ۱/۵، ۴/۵ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C نسبت به هم‌دیگر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ($p>۰/۰۵$).

جدول ۱: اثر ویتامین C (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر فراسنجه‌های کیفی منی بز نجدی پس از انجماد-یخ‌گشایی

صفات اسپرم (درصد)	شاهد (صفر)	۱/۵	۳	۴/۵	۶
تحرک	۲۸/۷۵^{d}±۳/۱۴	۳۵/۷۵^{dc}±۱/۴۹	۵۷/۵۰^{a}±۳/۲۲	۴۸/۲۵^{ab}±۳/۱۴	۴۱/۰۰^{bc}±۳/۱۴
اسپرم زنده	۳۵/۷۵^{b}±۲/۲۵	۴۰/۲۵^{b}±۶/۶۳	۵۶/۵۰^{a}±۵/۸۶	۵۵/۲۵^{a}±۳/۱۴	۵۴/۰۰^{a}±۳/۱۴
سلامت غشا	۵۱/۲۵^{c}±۴/۲۶	۶۰/۲۵^{bc}±۳/۶۶	۷۳/۷۵^{a}±۴/۷۳	۷۰/۰۰^{ab}±۳/۱۴	۶۹/۰۰^{ab}±۳/۱۴
ناهنجاری اسپرم	۲۲/۷۵±۵/۷۲	۲۳/۲±۲/۴۸	۱۵/۲۵±۱/۱۰	۱۴/۵۰±۳/۱۴	۲۰/۵۰±۳/۱۴

حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی تفاوت میانگین سطوح در هر ردیف می‌باشد (p<۰/۰۵).

تاثیر سطوح مختلف ویتامین C بر انواع تحرک اسپرم بز نجدی پس از انجماد و یخ‌گشایی در سیستم آنالیز کامپیوتری CASA در جدول ۲ آورده شده است. ویتامین C برتحرک پیش‌رونده سریع در سطح ۳ میلی‌گرم ویتامین C اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت (p<۰/۰۵). ویتامین C برتحرک پیش‌رونده کند نیز تاثیر گذار بوده است و همان‌طور مشاهده می‌شود سطوح ۳، ۴/۵ و ۶ میلی‌گرم با گروه شاهد و سطح ۱/۵ دارای اختلاف معنی‌داری است (p<۰/۰۵). ولی سطوح ۴/۵ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C با یک‌دیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (p>۰/۰۵). ویتامین C برتحرک بدون پیش‌رونده تاثیر معنی‌داری نداشته است (p>۰/۰۵).

جدول ۲: اثر ویتامین C (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر انواع تحرک اسپرم بز نجدی پس از پس از انجماد- یخ‌گشایی در سیستم آنالیز کامپیوتری (CSAS)

صفات اسپرم (درصد)	شاهد (صفر)	۱/۵	۳	۴/۵	۶
پیش‌رونده سریع	۴/۰۵^{c}±۰/۵۲	۶/۰۲^{bc}±۱/۲۷	۱۰/۴۳^{a}±۰/۴۹	۸/۷۲^{ab}±۱/۴۶	۷/۶۲^{ab}±۱/۴۷
پیش‌رونده کند	۱۶/۰۸^{c}±۰/۶۳	۱۸/۴۷^{c}±۰/۵۱	۳۵/۱۸^{a}±۱/۰۹	۳۲/۴۸^{ab}±۱/۰۹	۲۷/۲۶^{b}±۴/۲۵
بدون پیش‌رونده	۶/۲۰±۱/۸۶	۹/۳۷±۱/۹۰	۱۱/۶۳±۲/۹۲	۸/۰۲±۳/۵۴	۶/۱۸±۳/۱۲

حروف لاتین غیرمشابه نشان دهنده‌ی تفاوت میانگین سطوح در هر ردیف می‌باشد (P<۰/۰۵).

برخی ویژگی‌های حرکتی مربوط به اسپرم در سیستم آنالیزی کامپیوتری CASA در جدول ۳ نشان داده است؛ سطوح ۳ و ۴/۵ میلی‌گرم ویتامین C، سرعت در مسیر منحنی، سرعت در طول مسیر خود و سرعت در مسیر مستقیم اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد دارند (p<۰/۰۵).

جدول ۳: مقایسه‌ی ویژگی‌های حرکتی مربوط به CSAS در بین سطوح آزمایشی ویتامین C (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

صفات اسپرم (درصد)	شاهد (صفر)	۱/۵	۳	۴/۵	۶
جابجایی جانبی سر (µm)	۰/۶۲^{b}±۰/۰۶	۰/۷۳^{b}±۰/۰۷	۱/۴۹^{a}±۰/۱۱	۰/۸۹^{b}±۰/۱۷	۰/۶۴^{b}±۰/۰۲
سرعت در مسیر منحنی (µm/s)	۱۰/۷۸^{c}±۰/۷۳	۱۱/۹۵^{c}±۱/۱۶	۲۶/۶۹^{a}±۲/۹۱	۱۸/۲۶^{b}±۲/۹۱	۰/۳۳^{c}±۰/۳۴
سرعت در مسیر مستقیم (µm/s)	۵/۰۰^{c}±۰/۵۲	۶/۰۰^{c}±۰/۷۶	۱۳/۳۷^{a}±۱/۳۵	۹/۱۶^{b}±۱/۳۵	۶/۰۹^{c}±۰/۲۸
سرعت درطول مسیر خود (µm/s)	۳/۵۵^{c}±۰/۲۷	۴/۳۷^{c}±۰/۵۸	۹/۱۷^{a}±۰/۹۵	۶/۴۳^{b}±۰/۹۵	۴/۳۵^{c}±۰/۲۳

حروف لاتین غیرمشابه نشان دهنده‌ی تفاوت میانگین سطوح در هر ردیف می‌باشد (p<۰/۰۵).

همان‌طور که در جدول ۴ نشان داده شده است سطوح مختلف ویتامین C تاثیر معنی‌داری بر هیچ‌یک از ناهنجاری‌های سر، گردن و دم نداشته است (p>۰/۰۵).

جدول ۴. اثر ویتامین C (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر انواع تحرک اسپرم بز نجدی پس از انجماد-یخ‌گشایی در سیستم آنالیز کامپیوتری (CSAS)

انواع ناهنجاری (درصد)	شاهد (صفر)	۱/۵	۳	۴/۵	۶
دم	۱۵/۵۰±۳/۴۲	۱۶/۷۵±۲/۵۹	۱۱/۰۰±۰/۴۰	۱۰/۰۰±۱/۴۷	۱۲/۵۰±۲/۸۴
سر	۵/۲۵±۱/۷۵	۵/۰۰±۰/۷۰	۲/۲۵±۰/۷۵	۳/۰۰±۱/۴۱	۵/۰۰±۱/۹۵
گردن	۲/۲۵±۱/۲۵	۱/۲۵±۰/۲۵	۲/۰۰±۰/۷۰	۱/۵۰±۰/۲۸	۲/۵±۱/۷۳

نتایج اثر ویتامین C بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام منی بز نجدی در جدول ۵ آورده شده است؛ باتوجه به‌نتایج بیش‌ترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام مربوط به‌سطح ۶ میلی‌گرم ویتامین C بود که با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵)، تیمار شاهد و سطح ۱/۵ میلی‌گرم ویتامین C با سطوح ۴/۵ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C اختلاف معنی‌داری داشته (p<۰/۰۵)، اما با سطح ۳ میلی‌گرم ویتامین C این اختلاف معنی‌داری نمی‌باشد (p>۰/۰۵)، اختلاف معنی‌داری در ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام در سطوح ۳، ۴/۵ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

جدول ۵. اثر ویتامین C (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر انواع بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام پلاسمای منی بز نجدی پس از انجماد-یخ‌گشایی

صفات اسپرم	شاهد (صفر)	۱/۵	۳	۴/۵	۶
ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام (Li/mμ)	۷۶۶/۰۰^{b}±۳۶/۳۳	۹۱۷/۵۰^{b}±۵۰/۶۸	۹۹۱/۵۰^{ab}±۶۷/۰۵	۱۲۷۷/۰۰^{a}±۱۴۱/۶۰	۱۲۹۸/۷۵^{a}±۱۵۳/۹۱

حروف لاتین غیرمشابه نشان دهنده‌ی تفاوت میانگین سطوح در هر ردیف می‌باشد (p<۰/۰۵).

بحث

در پژوهش حاضر استفاده از ویتامین C در رقیق‌کننده منی باعث بهبود فراسنجه‌های تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم بز نجدی پس از انجماد-یخ‌گشایی شد؛ تحرک، درصد اسپرم زنده و سلامت آکروزوم اسپرم عوامل تعیین کننده در کیفیت اسپرم پس از یخ‌گشایی می‌باشند (۲). تنش‌های می‌توانند باعث آسیب‌های متعددی در ساختار اسپرم در فرایند انجماد-یخ‌گشایی شوند که در نتیجه‌ی آن غشای پلاسمایی، سیتوپلاسم و نیز ساختار ژنومی اسپرم‌ها به‌شدت آسیب‌دیده و درنهایت ممکن است باعث کاهش سلامت غشای پلاسمایی و آکروزمی، تحرک، تعداد اسپرم زنده و باروری شود (۱۸). ویتامین C به‌عنوان اولین خط دفاعی آنتی‌اکسیدانتی در خون و پلاسمای مایع اسپرمی مطرح بوده و موجب مهار اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها می‌شود. در حدود ۶۵ درصد ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی پلاسمای منی افراد بارور مربوط به‌این ویتامین است (۱۵)، زیرا غلظت آن در پلاسمای منی حدود ۱۰ برابر پلاسمای خون است (۱۶). ویتامین C به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدانتی شناخته شده است که می‌توانند در بهبود خصوصیات اسپرم موثر باشد (۱۳). هم‌چنین ویتامین C در مایع اپیدیدم و پلاسمای منی چند گونه حیوانی ازجمله قوچ وجود دارد و یک نقش محافظتی در برابر رادیکال‌های آزاد داشته و باعث نگه‌داری غشای اسپرماتوزوئید در مقابل اکسیداسیون می‌شود (۱۹). در راستای نتایج حاضر علوی و همکاران (۸) گزارش کردند که ویتامین C در سطح ۴/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر تحرک پیش‌رونده و درصد اسپرم‌های زنده بز کردی بعد از انجماد باعث بهبود معنی‌داری شد. در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد که سطوح ۳ و ۴/۵ میلی‌گرم ویتامین C در رقیق کننده‌های انجماد بز نجدی می‌تواند به‌طور معنی‌داری باعث بهبود کیفیت اسپرم بز پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی شد. ویتامین C با کاهش آسیب سلولی ازطریق جذب گونه‌های فعال رادیکال آزاد می‌تواند باعث عمل‌کرد بهینه‌ی اسپرم در رقیق کننده شود. هم‌چنین به‌نظر می‌رسد ویتامین C از فعالیت رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند که با این‌کار از آسیب DNA اسپرم جلوگیری می‌شود (۲۰). موافق با پژوهش حاضر آرشامی و همکاران (۲۱) گزارش کردند که افزودن ویتامین C به‌مایع اسپرم گاو از تخریب سلول‌های اسپرم حداقل برای مدت ۲۴ ساعت در محیط برون‌تنی جلوگیری و سبب بهبود کیفیت اسپرم شد. سونمز و همکاران (۲۲) تاثیر غلظت‌های مختلف ویتامین C را در محیط، بر پایه تریس جهت انجماد منی قوچ بررسی نمودند و نتایج تجربی آن‌ها نشان داد باافزایش سطح ویتامین C تحرک اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی در گروه‌های تیماری مختلف افزایش یافت که با مطالعه حاضر مطابقت داشت. در این مطالعه ویتامین C باعث بهبود انواع فراسنجه‌های تحرک شد؛

جوهانسون و همکاران (۲۳) نشان دادند در یک آزمایش با هدف بررسی سطوح مختلف ویتامین C بر انجماد اسپرم گاو سطح ۴/۵ میلی‌گرم ویتامین C باعث افزایش تحرک پیش‌رونده اسپرم شد، که با نتایج حاضر موافق بود. در راستای نتایج حاضر علوی و همکاران (۲۴) گزارش کردند که ویتامین C در سطح ۴/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی تحرک پیش‌رونده بز کردی بعد از انجماد تاثیر معنی‌داری دارد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد سطوح بالای ۱/۵ میلی‌گرم ویتامین C باعث بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام می‌شود؛ در طول دوره ذخیره‌سازی اسپرم، آسیب‌های ناشی از اکسیداسیون مواد یکی از علل مهم کاهش قدرت و تحرک باروری اسپرم می‌باشد. اسپرم نسبت به‌ترکیبات فعال اکسیژن (ROS:Reactive oxygen species)حساس است، چراکه غشایی پلاسمایی آن حاوی مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع است (۲۵، ۲۶). باتوجه به سیتوپلاسم محدود اسپرم، آنزیم‌های محافظتی آن خیلی‌کم است (۲۷، ۲۸). زمانی که تولید ROS بیش‌ازحد توان آنتی‌اکسیدانتی منی باشد موجب اختلال در عمل‌کرد اسپرم می‌شود (۲۹، ۲۵، ۵). در مقابل این آسیب‌های اکسیداتیوی، پلاسمای منی دارای یک منبع غنی از آنتی‌اکسیدانت‌ها آنزیمی ازقبیل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، ردوکتاز و آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی ازقبیل ویتامین E، ویتامین C، پیروات، گلوتاتیون وغیره تحت‌عنوان ظرفیت آنتی‌اکسیدانت‌های تام (TCA: total antioxidant capacity) می‌باشد که هریک با مکانسیم‌های خاصی نقشی اساسی در حفظ اسپرم ها در برابر حملات ROS و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد دارند (۲۷، ۳۰، ۳۱). بنابراین در این پژوهش برای بیش‌تر روشن کردن نقش ویتامین C افزوده شده به‌منی بز نجدی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانت تام (TCA مایع منی اندازه‌گیری شد. غلظت بالای ویتامین C در پلاسمای منی احتمالا به‌نقش آن در حفظ اسپرم از حملات ROS و جلوگیری ازآسیب اکسیداتیو DNA می‌باشد (۳۲). ویتامین C قادر است به‌طور کاتالیتیکی انتقال فعال یون‌های فلزی اکسید کننده و رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد به‌این‌ترتیب که در ابتدا ویتامین C خود اکسید می‌شد و رادیکال‌های آزاد اسکوربات (AFR: Ascorbate Free Radical) را تشکیل می‌دهد (۳۳)، برخلاف دیگر رادیکال‌های آزاد، AFR نسبتا غیرفعال است به‌طوری‌که می‌تواند طی واکنش‌های نامتجانس مجددا به‌ویتامین C و دهیدورآسکوربیک اسید (DHAA: Dehydroascorbate) تبدیل شد و درنتیجه از گسترش واکنش‌های شکست زنجیره‌ای جلوگیری می‌کند (۳۴). این یافته‌ها اهمیت آنتی‌اکسیدانت ویتامین C را در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد نشان می‌دهد. بنابراین این افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام را می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانتی ویتامین C ارتباط داد. درهمین راستا گزارش شده است که افزودن ویتامین C موجب افزایش قدرت تحرک، بلوغ و زنده‌ماندن اسپرم خرگوش شده است (۱۳). بین کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام پلاسمای سمینال با کاهش کیفیت اسپرم ارتباط نزدیکی وجود دارد، آسیب ایجاد شده به‌علت تولید بیش‌ازحد رادیکال‌های آزاد در غشای اسپرم منجر به‌کاهش تحرک اسپرم، غیرفعال شدن آنزیم‌های گلیکولیتیک و آسیب غشای آکروزمی، اکسید شدن DNA و درنهایت باعث ناتوانی در باروری می‌شود (۸، ۱۱، ۱۰). بنابراین ویتامین C در کاهش رادیکال‌های آزاد نقش موثری داشته و موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام می‌شود که اثر مثبتی بر کیفیت منی بز نجدی بعد از انجماد و یخ‌گشایی دارد. اخیرا در مطالعه اریان و همکاران (۳۵) که به‌بررسی تاثیرات گیاه خارخاسک روی کیفیت اسپرم انجماد شده بز پرداختند نشان دادند که استفاده از خارخاسک (میزان بالای ویتامین C به‌عنوان آنتی‌اکسیدانتی قوی و منحصربه‌فرد آن) توانست باعث افزایش تحرک، زنده‌مانی، فعالیت غشای اسپرم و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی اسپرم هم‌چنین منجر به‌کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدهید شد، که با کل یافته‌های به‌دست آمده از این پژوهش مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی از پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که باافزودن سطوح مختلف ویتامین C به‌رقیق‌کننده منی بز نجدی، استفاده از دوزهای بالاتر ویتامین C (ترجیحا ۳ و ۴/۵ میلی‌گرم) سبب بهبود اغلب فراسنجه‌های کیفی اسپرم بعد از انجماد-یخ‌گشایی شد. هم‌چنین توانست ظرافیت آنتی‌اکسیدانتی تام را افزایش دهد؛ لذا استفاده از دوزهای بالاتر ویتامین C در رقیق‌کننده اسپرم باعث بهبود عمل‌کرد اسپرم بعد از فرایند انجماد-یخ‌گشایی می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که ویتامین C می‌تواند ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی مایع منی را افزایش دهد، و احتمالا از این طریق باعث بهبود کیفیت اسپرم بعد از فرایند انجماد-یخ‌گشایی شده است.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت فراهم نمودن امکانات پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Maxwell WM, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review. Reprod Fert Develop. 1993; 5(6): 613-638.
2. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim Reprod Sci. 2000; 62(1-3): 3-22.
3. Andreea A, Stela Z. Role of antioxidant additives in the protection of the cryopreserved semen against free radicals. Rom Biotechnol Lett. 2010; 15(3): 33-41.
4. Ismail AA, Abdel-Khalek AKE, Khalil WA, Yousif AI. et al. Effects of mint, thyme, and curcumin extract nanoformulations on the sperm quality, apoptosis, chromatin decondensation, enzyme activity, and oxidative status of cryopreserved goat semen. Cryobiol. 2020; 97: 144-152.
5. Baghshahi H, Riasi A, Mahdavi AH, Shirazi A. Antioxidant effects of clove bud *(Syzygium aromaticum)* extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. Cryobiol. 2014; 69(3): 482-487.
6. Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier NA. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. J Androl. 2000; 21(1): 1-7.
7. Surai PF, Blesbois E, Grasseau I, Chalah T, et al. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem Molecul Biol. 1998; 120(3): 527-533.
8. Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. Theriogenol. 2002; 57(7): 1801-1808.
9. Farshad A, Hosseini Y. The cryoprotective effects of amino acids supplementation on cooled and post-thaw Markhoz bucks semen quality. Small Ruminant Res. 2013; 114(2-3): 258-263.
10. Merati Z, Farshad A, Farzinpour A, Rostamzadeh J, et al. Anti-apoptotic effects of minocycline on ram epididymal spermatozoa exposed to oxidative stress. Theriogenol. 2018; 114: 266-272.
11. Fanaei H, Khayat S, Halvaei I, Ramezani V, et al. Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples. J Reprod med. 2014; 12(2): 103.
12. Mangoli E, Talebi AR, Anvari M, Taheri F, et al. Vitamin C attenuates negative effects of vitrification on sperm parameters, chromatin quality, apoptosis and acrosome reaction in neat and prepared normozoospermic samples. Taiwanese Jof Obstetri Gynecol. 2018; 57(2): 200-204.

13. Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. Anim Reprod Sci. 2003; 76(1-2): 99-111.
14. Packer JE, Slater T, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. Nature. 1979; 278(5706): 737-738.
15. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. Fertil Steril. 1999; 72(3): 484-495.
16. Hu JH, Tian WQ, Zhao XL, Zan, LS, et al. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. Anim Reprod Rci. 2010; 121(1-2): 72-77.
17. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 1996; 239(1): 70-76.
18. Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Anim reprod sci. 2000; 62(1-3): 113-141.
19. Chinoy NJ. Ascorbic acid levels in mammalian tissues and its metabolic significance. Comp Biochem Physiol. 1972; 42(4): 945-952.
20. Neill JM, Olds-Clarke P. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. Gamete Research. 1987; 18(2): 121-140.
21. Arshami J, Esmailzadeh H, Nasiri M.M, Hashemi Attar M. Evaluation of the effects of vitamins E and C on sperm characteristics in vitro. RJMS. 2006; 9 (2): 75-85.
22. Sonmez M, Demirci E. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. Turkish J Vet Anim Sci. 2004; 28(5): 893-899.
23. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. Anim Reprod Sci. 2000; 62(1-3): 143-172.
24. Alavi SMJ, Kohram H, Zeinoaldini S, Naijian HR. The effects of different concentrations of ascorbic acid on freezability of Kordi goat spermatozoa. Iran Vet J. 2014; 10 (3): 75-85.
25. Amini S, Masoumi R, Rostami B, Shahir MH. et al. Effects of supplementation of Tris-egg yolk extender with royal jelly on chilled and frozen-thawed ram semen characteristics. Cryobiol. 2019; 88: 75-80.
26. Gambera L, Serafini F, Morgante G, Focarelli R, et al. Sperm quality and pregnancy rate after COX-2 inhibitor therapy of infertile males with abacterial leukocytospermia. Hum reprod. 2007; 22(4): 1047-1051.
27. Arslan HO, Herrera C, Malama E, Siuda M, et al. Effect of the addition of different catalase concentrations to a TRIS-egg yolk extender on quality and in vitro fertilization rate of frozen-thawed bull sperm. Cryobiol. 2019; 91: 40-52.
28. Lackner JE, Herwig R, Schmidbauer J, Schatzl G, et al. Correlation of leukocytospermia with clinical infection and the positive effect of antiinflammatory treatment on semen quality. Fertil Steril. 2006; 86(3): 601-605.
29. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Int J Fertili Steril. 2003; 79(4): 829-843.
30. Maneesh M, Jayalekshmi H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. Indian J Clinical Biochem. 2006; 21(2): 80-89.
31. Merati Z, Farshad A. Supplementary role of vitamin E and amino acids added to diluent on goat sperm freezability. Cryobiol. 2021; 100(1): 151-157.

32. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. Proc Natl Acad Sci Unit States Am. 1991; 88(24): 11003-11006.

33. Burton GW, Ingold KU. Mechanisms of antioxidant action: preventive and chain-breaking antioxidants. CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine. 1989; 2: 29-43.

34. Patriarca M, Menditto A, Morisi G. Determination of ascorbic acid in blood plasma or serum and in seminal plasma using a simplified sample preparation and high-performance liquid chromatography coupled with UV detection. J liq chrom. 1991; 14(2): 297-312.

35. Ariyan F, Farshad A, Rostamzadeh J. Protective effects of *Tribulus terrestris* and Cinnamomum zeylanicum extracts and trehalose added to diluents on goat epididymal sperm freezability. Cryobiol. 2021; 98: 172-180.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2021; 12(3) *Original Article*

The effect of different levels of vitamin C to dilution Najdi goat semen on quality after freezing- thawing

Mamouei M[1*] Ph.D., Paknahad L[1] M.Sc., Fayyazi J[1] Ph.D., Izadnia HR[2] M.Sc., Kazemizadeh A[1] M.Sc.,

1. Department of Animal Science, Faculty of Animal Sciences and Food Technology, Khuzestan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mollasani, Ahvaz, Iran
2. Faculty member of Safiabad Agricultural Research Center, Dezful, Khuzestan, Iran

* Email corresponding author: mamouei_m@yahoo.com

Received: 22 Apr. 2021 Accepted: 19 Sep. 2021

Abstract

Aim: The aim of this study was the effect of adding different levels of vitamin C (0, 1.5, 3, 4.5 and 6 mg / ml) after freezing in semen diluent on the quality parameters of Najdi goat sperm.
Material and Methods: Semen samples were collected twice a week from 4 male goats with an average weight of 50 ±5 kg by electroojaculator. The sperm samples after cryopreservation were analyzed for sperm motility and velocity characteristics using computerized sperm analysis system (CASA), percentage of sperm survival and abnormal sperm, membrane health and antioxidant capacity.
Results: The results showed that the levels of 3 and 4.5 mg of vitamin C in diluent of goat sperm containing improved total motility, progressive motility and percentage of sperm survival in comparison with the control group ($P<0.05$). In sperm membrane health, the level of 3 mg of vitamin C was significantly different from the control and the level of 1.5 mg of vitamin C ($P <0.05$); But there was no significant difference with levels of 4.5 and 6 mg of vitamin C. The percentage of abnormal sperm was not affected by different levels of vitamin C ($P <0.05$). Sperm antioxidant capacity at the levels of 4.5 and 6 mg of vitamin C, had the highest value and had a significant difference compared to the control treatment ($P <0.05$).
Conclusion: According to the results of this study, adding 3 and 4.5 mg levels of vitamin C to Tris diluent Najdi goat sperm improves sperm quality parameters and sperm antioxidant capacity after freezing.
Keywords: Sperm, Freezing-thawing, Najdi goat, Tris diluent, Vitamin C