نشریه علوم دامی ایران
دوره ۴۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳ (ص۸-۱)

تأثیرات سطوح گوناگون ویتامین E در رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم اسبچهٔ خزر طی فرایند سردسازی

ایمان یوسفیان[۱]، احمد زارع شحنه[۲*]، مهدی ژندی[۳]، مجید بحرینی[۴]، غزاله ایزدپناه[۵]، رضا نوعی[۶] و مجتبی امام‌وردی[۷]
۱. ۲. ۳. ۵. ۶. ۷. دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و استادیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشجوی دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۴. دکتری حرفه‌ای، مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور
(تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۲۷ - تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱۸)

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر غلظت‌های گوناگون ویتامین E (VitE) بر کیفیت اسپرم اسبچهٔ خزر پس از نگهداری منی در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد بود. پس از جمع‌آوری منی، حدوداً ۹۰ درصد پلاسمای آن به‌وسیلهٔ سانتریفیوژ با نیروی ۶۰۰×g حذف شد. پلیت‌ها با هم مخلوط و به ۴ گروه مساوی تقسیم شدند. سپس با رقیق‌کننده‌های حاوی غلظت‌های صفر (شاهد منفی)، ۵، و ۱۰ میلی‌مول VitE و DMSO (شاهد مثبت، به‌عنوان حلال VitE) رقیق شدند تا غلظت نهایی ۵۰×۱۰^{۶} اسپرم در هر میلی‌لیتر به‌دست آید. برای هر تیمار جنبایی، زنده‌مانی، یک‌پارچگی غشا، ناهنجاری کل، و پراکسیداسیون لیپیدی در زمان‌های صفر، ۶، ۲۴، و ۴۸ ارزیابی شد. نتایج نشان داد افزودن VitE بر جنبایی کل و پیش‌رونده تأثیر نداشت (P>۰/۰۵). یک‌پارچگی غشا و زنده‌مانی در تیمار حاوی ۵ میلی‌مول VitE در زمان ۴۸، به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵). طی مدت نگهداری اسپرم، ناهنجاری کل بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). پراکسیداسیون لیپید در زمان ۴۸، در تیمار حاوی ۵ میلی‌مول VitE به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد کمتر بود (P<۰/۰۵). از بین غلظت‌های بالا، غلظت ۵ میلی‌مول VitE موجب حفظ کیفیت اسپرم اسبچهٔ خزر طی نگهداری سرد می‌شود.

کلیدواژگان: پراکسیداسیون لیپید، سردسازی، کیفیت اسپرم، منی اسبچهٔ خزر، ویتامین E.

مقدمه

ذخیرهٔ منی نریان، روش مهمی در تولید مثل صنعت اسب است. برای استفاده از منی مایع در اسب‌ها، حفظ جنبایی و باروری اسپرم طی ذخیرهٔ کوتاه‌مدت (کمتر از ۷۲ ساعت) در ۵ درجهٔ سانتی‌گراد شایان توجه است (Ball *et al.* 2001a). تلاش‌هایی برای بهبود نگهداری منی سرد با تغییر در رقیق‌کننده‌ها، همچنین افزودن ترکیبات خاص به آن‌ها به‌منظور حفظ یک‌پارچگی غشا، جلوگیری از تنش اکسیداتیو، یا حفظ جنبایی اسپرم صورت گرفته است (Ball *et al.* 2001a). نتیجهٔ این مطالعات، موفقیت‌های متنوعی را در بهبود و حفظ جنبایی اسپرم یا باروری منی سرد داشته است. از پیامدهای طبیعی متابولیسم اکسیداتیو تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)[1] است که تحت شرایط نگهداری سرد به اسپرم آسیب می‌رسانند (Maxwell & Stojanov 1996). پراکسید هیدروژن (H_2O_2) مهمترین ROS مسئول ازدست‌دادن جنبایی اسپرم است (Ball *et al.* 2001a). تنش اکسیداتیو به کاهش سریع جنبایی اسپرم اسب بدون تغییر قابل تشخیص در پراکسیداسیون لیپید و یک‌پارچگی غشا، یک‌پارچگی کروزوم، یا عملکرد میتوکندری می‌انجامد (Ball *et al.* 2001a). اسپرم‌های غیر طبیعی، به‌خصوص آن‌هایی که قطرهٔ سیتوپلاسمی یا ناهنجاری‌های قسمت میانی دارند، می‌توانند تولید پراکسید هیدروژن را افزایش دهند (Ball *et al.* 2001b).

تلفن: ۰۹۱۲۳۶۱۴۲۵۹
E-mail: azareh@ut.ac.ir
1. Reactive Oxygen Species

حساسیت اسپرم به تنش اکسیداتیو، به تفاوت‌های فردی در ترکیب اسیدهای چرب غشا، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم (Macías García *et al.* 2011)، و توانایی اسپرم برای تولید ROS (Da Silva *et al.* 2010) نسبت داده شده است. ROS در مقادیر فیزیولوژیکی، مسئول حفظ فرایندهای گوناگونی در اسپرم چون ظرفیت‌دارشدن، واکنش اکروزوم، هایپراکتیویشن[1]، و ادغام اسپرم با تخمک است (Almeida & Ball 2005). تولید بیش از حد ROS موجب آسیب ساختاری به غشا و کاهش زنده‌مانی اسپرم می‌شود (Vasconcelos Franco *et al.* 2013). تنش اکسیداتیو با کاهش سطح ATP درون‌سلولی، جنبایی اسپرم را کاهش می‌دهد و با آغاز پراکسیداسیون لیپید، موجب ازدست‌دادن سیالیت غشا و توانایی باروری اسپرم می‌شود (Ball 2008). برای خنثی‌کردن پیامدهای مضر ROS و محافظت از اسپرم انزال‌شده، پلاسمای منی منبعی بالقوه از حذف‌کننده‌های ROS، همچون سیستم‌های آنزیمی مانند سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، و آنتی‌اکسیدان‌هایی چون اسیداسکوربیک و ویتامین E است (Vasconcelos Franco *et al.* 2013). حذف تقریباً ۹۰ درصد پلاسمای منی در طول دورهٔ فراوری منی اسب، به‌علت حذف آنتی‌اکسیدان‌ها، ممکن است حساسیت اسپرم را به تنش اکسیداتیو افزایش دهد (Ball 2008). با افزایش شواهدی که نشان می‌دهد ROS بالقوه، توانایی آسیب به مواد ژنومی و غشای اسپرم را دارد، مهم است بدانیم که آیا با مکمل‌سازی رقیق‌کننده با آنتی‌اکسیدان‌های گوناگون بهبودی در بقا و باروری منی سردشده صورت می‌گیرد. الفا توکوفرول یا ویتامین E، سیستمی سلولی محافظ علیه آسیب اکسیداتیو است. ویتامین E آنتی‌اکسیدانی شاخه‌شکن[2] است (Dad *et al.* 2006). این ویژگی به خنثی‌کردن رادیکال‌های لیپید می‌انجامد (Chow 1991)، بنابراین بدون تأثیری بر تولید ROS، از اجزای غشا محافظت می‌کند (Sharma & Agarwal 1996). افزودن ویتامین E قبل از نگهداری منی اسب در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد، صرف نظر از وجود یا فقدان پلاسمای منی، تأثیر مثبتی را بر غشای پلاسمایی و حفظ جنبایی پیش‌رونده نشان داده است (Agueero *et al.* 1995). مطالعه‌ای نیز نشان داد افزودن ویتامین E و ویتامین C به رقیق‌کنندهٔ انجماد، باعث بهبود کیفیت اسپرم اسب پس از ذوب نمی‌شود (Baumber *et al.* 2005). اسبچهٔ خزر نژاد خاص ایران است و به‌عنوان یکی از ذخایر ژنتیکی ارزشمند کشور بسیار مهم است. با توجه به این‌که این نژاد جزء نژادهای در معرض انقراض است، تحقیقات تولید مثلی اهمیت خاصی دارند تا ضمن تکثیر طبیعی اسب‌های خزر اقدام به تکثیر سریع‌تر آن‌ها از طریق مصنوعی شود تا جمعیت آن به حد مطلوب برسد (Dardari & Mehraban 2001). از آنجا که مطالعه‌ای که تأثیرات آنتی‌اکسیدانی ویتامین E را بر کیفیت اسپرم اسبچهٔ خزر بررسی کند، یافت نشد، بنابراین هدف این مطالعه بررسی افزودن ویتامین E به رقیق‌کننده روی یک‌پارچگی غشای پلاسمایی، پارامترهای جنبایی، و پراکسیداسیون لیپید طی نگهداری اسپرم اسبچهٔ خزر در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد است.

مواد و روش‌ها

ویتامین E از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA) و پودر شیر بدون چربی و گلوکز از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شد. منی با استفاده از واژن مصنوعی مدل میسوری (Missouri model; Minitüb, Tiefenbach, Germany) از سه سر نریان اسبچهٔ خزر جمع‌آوری شد. بی‌درنگ پس از جمع‌آوری، قسمت ژله‌ای از طریق صافی، فیلتر، و جدا شد. پس از ارزیابی اولیهٔ منی از نظر رنگ، حجم، و جنبایی، منی با نسبت ۱:۱ با رقیق‌کنندهٔ کنی[3] (قبلاً در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شده بود) رقیق شد. تنها از انزال‌هایی که جنبایی آن‌ها بیش از ۷۰ درصد بود، برای نگهداری در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد استفاده شد. حدوداً ۹۰ درصد پلاسمای منی پس از سانتریفیوژ با نیروی ۶۰۰×g به‌مدت ۱۰ دقیقه، حذف، و غلظت اسپرم با لام هموسایتومتر تعیین شد. پلیت اسپرم برای

1. Hyperactivation
2. Chain-Breaking
3. Kenney Extender

دستیابی به غلظت نهایی ۵۰×۱۰^{۶} sperm/ml دوباره رقیق و به چهار قسمت براساس تیمارها (بدون ویتامین E (شاهد منفی)، بدون ویتامین E و حاوی ۰/۸ درصد DMSO [1] به‌عنوان حلال ویتامین E (شاهد مثبت)، ۵ میلی‌مول ویتامین E، و ۱۰ میلی‌مول ویتامین E) تقسیم شد. سپس، تیمارها در یخچالی با دمای ۴-۶ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. در زمان‌های صفر ، ۶، ۲۴، و ۴۸ ساعت پس از سردسازی، تیمارها در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه گرم شدند و جنبایی اسپرم (با سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم)[2]، زنده‌مانی (ائوزین- نگروزین)، یک‌پارچگی غشا (تست هاس)، و میزان پراکسیداسیون لیپید (MDA)[3] ارزیابی شد (Salmani *et al.* 2013). این آزمایش به‌صورت چرخشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار در زمان‌های گوناگون سردسازی صفر، ۶، ۲۴، و ۴۸ ساعت و ۵ تکرار روی سه سر اسبچهٔ خزر انجام شد. داده‌های حاصل با رویهٔ Mixed نرم‌افزار SAS 9.1 آنالیز شد. مدل استفاده‌شده به شرح ذیل است، که در آن Y_{ijkl} برابر با مشاهدات (خصوصیات کمّی و کیفی اسپرم)، μ میانگین کل، A_i اثر i اُمین سطح تیمار (i=1, 2, 3,4)، Bj اثر اُمین سطح زمان (j=1, 2, 3, 4)، Ttij اثر متقابل تیمار و زمان، و eijkl تأثیرات باقی‌مانده بود.

$$Y_{ijkl}=\mu+T_i+t_j+Tt_{ij}+e_{ijkl}$$

مقایسهٔ میانگین تیمارها با آزمون میانگین حداقل مربعات[4] صورت گرفت و نتایج به‌صورت میانگین مربعات خطا گزارش شد. داده‌های درصدی با فرمول ArcSin x تبدیل شد و سپس مقایسات میانگین بین تیمارها صورت گرفت.

نتایج و بحث

جنبایی کل

با افزایش زمان نگهداری جنبایی کل اسپرم به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود (P<۰/۰۵). تفاوت معنی‌داری بین تیمارها طی ۴۸ ساعت نگهداری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). نتایج آنالیز در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. درصد جنبایی کل در اسپرم اسبچهٔ خزر (حداقل میانگین مربعات±انحراف معیار میانگین) در تیمارهای گوناگون، طی سردسازی

تیمار	مدت زمان نگهداری (ساعت)			
	۰	۶	۲۴	۴۸
شاهد منفی	۸۷/۶۹±۳/۷۳[a]	۸۶/۳۷±۳/۷۳[a]	۷۴/۱۷±۳/۷۳[b]	۵۱/۲۷±۳/۷۳[c]
شاهد مثبت	۸۷/۳۴±۳/۷۳[a]	۸۷/۱۹±۳/۷۳[a]	۷۳/۶۸±۳/۷۳[b]	۵۱/۸۹±۳/۷۳[c]
۵ میلی‌مول VitE	۹۰/۴۰±۳/۷۳[a]	۸۷/۶۳±۳/۷۳[a]	۷۶/۳۹±۳/۷۳[b]	۵۷/۶۷±۳/۷۳[c]
۱۰ میلی‌مول VitE	۸۹/۶۲±۳/۷۳[a]	۸۸/۹۰±۳/۷۳[a]	۷۰/۵۸±۳/۷۳[b]	۵۳/۹۳±۳/۷۳[c]

حروف نامشابه(a،b و c) بین تیمارها در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵). حروف نامشابه (A، B و C) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

جنبایی پیش‌رونده

با افزایش زمان نگه‌داری، جنبایی پیش‌روندهٔ اسپرم کاهش یافته بود (P<۰/۰۵). تفاوت معنی‌داری بین تیمارها طی ۴۸ ساعت نگهداری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). نتایج آنالیز در جدول ۲ نشان داده شده است. ذخیرهٔ اسپرم در خارج از سیستم طبیعی بدن برای مدت طولانی باعث کاهش جنبایی می‌شود (Amann & Graham 1993). جنبایی اسپرم ممکن است با مکانیسمی غیر از پراکسیداسیون لیپید، تحت تأثیر ROS قرار گیرد. در سیستم‌های سلول‌های سوماتیک، نشان داده شده است که پراکسید هیدروژن موجب اختلال در عملکردهای بیوشیمیایی مهم، شامل افزایش تشکیل سولفوهیدریل‌ها[5] اکسیدشدهٔ درون‌سلولی، تسریع در کاهش سطوح ATP[6]، و جریان گلیکولتیک می‌شود. این فرایندها قبل ازدست‌دادن یک‌پارچگی غشا یا افزایش پراکسیداسیون لیپید صورت می‌گیرد (Baumber *et al.* 2000).

1. Dimethyl Sulfoxide
2. Computer Assisted Sperm Analyzer
3. Malondialdehyde
4. Least Square Means
5. Sulfhydryls
6. Adenosine TriPhosphate

جدول ۲. درصد جنبایی پیش‌رونده در اسپرم اسبچهٔ خزر (حداقل میانگین مربعات±انحراف معیار میانگین) در تیمارهای گوناگون، طی سردسازی

تیمار	مدت زمان نگهداری (ساعت)			
	۰	۶	۲۴	۴۸
شاهد منفی	۵۱/۳۶±۳/۶۱[a]	۴۹/۲۱±۳/۶۱[ab]	۳۸/۸۲±۳/۶۱[b]	۲۸/۷۰±۳/۶۱[c]
شاهد مثبت	۴۹/۳۴±۳/۶۱[a]	۴۶/۴۱±۳/۶۱[a]	۳۹/۲۰±۳/۶۱[a]	۲۷/۹۸±۳/۶۱[b]
۵ میلی‌مول VitE	۵۰/۵۵±۳/۶۱[a]	۴۸/۷۶±۳/۶۱[a]	۴۱/۵۱±۳/۶۱[b]	۳۵/۴۷±۳/۶۱[b]
۱۰ میلی‌مول VitE	۵۲/۶۷±۳/۶۱[a]	۵۱/۳۴±۳/۶۱[a]	۳۷/۱۲±۳/۶۱[b]	۲۷/۷۴±۳/۶۱[b]

حروف نامشابه(a،b و c) بین تیمارها در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵). حروف نامشابه (A، B و C) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است(P<۰/۰۵).

ممکن است دلیل مهار جنبایی اسپرم با ROS، کاهش ATP باشد (Lamirande & Gagnon 1992). همچنین بدون انرژی مناسب و کافی، اسپرم جنبایی پیش‌رونده ندارد (da Silva Maia *et al.* 2009). ویتامین E به‌عنوان حذف‌کنندهٔ رادیکال‌های پروکسی‌لیپید[1] [LOO·] و آلکوکسیل[2] [LO·] عمل می‌کند (Breininger *et al.* 2005)، در نتیجه نمی‌تواند مقادیر پراکسید هیدروژن و آنیون سوپراکسید تولیدی را کاهش دهد و از آسیبی که این ROS بر میتوکندری و جنبایی وارد می‌کند، جلوگیری کند. در مطالعهٔ حاضر مشاهده شد که افزودن ویتامین E به رقیق‌کننده بر جنبایی کل، پیش‌رونده، و سایر فراسنجه‌های حرکتی[3] اسپرم تأثیر نداشت (P>۰/۰۵). افزودن ویتامین E به منی طی نگهداری در سایر مطالعات نتایج متفاوتی را نشان داده است. در مطالعه‌ای افزودن ویتامین E به رقیق‌کننده، اثر مثبتی بر جنبایی اسپرم اسب طی سردسازی نداشت (Ball *et al.* 2001a). در عین حال، مکمل‌سازی محیط انجماد با ویتامین E جنبایی اسپرم را در انسان و خرگوش بهبود می‌بخشد (Bansal & Bilaspuri 2009). همچنین افزودن ویتامین E به منی اسب، جنبایی اسپرم را طی ۲۴ ساعت نگهداری سرد بهبود داده است (Agueero *et al.* 1995). در بوقلمون، افزودن ویتامین E موجب بهبود جنبایی شده بود، درحالی‌که پس از افزودن ویتامین E به منی قوچ عدم حفظ و بهبود جنبایی اسپرم مشاهده شده است (Ball *et al.* 2001a).

یک‌پارچگی غشای پلاسمایی

با افزایش زمان نگهداری یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم کاهش یافته بود و این کاهش در زمان ۴۸ بیشتر قابل مشاهده است. تفاوتی بین تیمارها تا ۲۴ ساعت نگهداری مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، اما در زمان ۴۸، تیمار حاوی ۵ میلی‌مول ویتامین E در مقایسه با شاهد منفی (۴۸/۳۲±۳/۱۳ نسبت به ۳۸/۸۸±۳/۱۳) به‌طور معنی‌داری یک‌پارچگی غشای پلاسمایی بالاتر بود (P<۰/۰۵). نتایج آنالیز در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳.درصد یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم اسبچهٔ خزر (حداقل میانگین مربعات±انحراف معیار میانگین) در تیمارهای گوناگون، طی سردسازی

تیمار	مدت زمان نگهداری (ساعت)			
	۰	۶	۲۴	۴۸
شاهد منفی	۷۱/۸۸±۳/۱۳[a]	۷۱/۳۴±۳/۱۳[a]	۶۶/۲۶±۳/۱۳[a]	۳۸/۸۸±۳/۱۳[Bb]
شاهد مثبت	۷۲/۷۶±۳/۱۳[a]	۷۲/۱۰±۳/۱۳[a]	۶۶/۸۰±۳/۱۳[a]	۳۷/۸۲±۳/۱۳[Bb]
۵ میلی‌مول VitE	۷۳/۶۲±۳/۱۳[a]	۷۲/۹۶±۳/۱۳[a]	۶۸/۸۸±۳/۱۳[a]	۴۸/۳۲±۳/۱۳[Ab]
۱۰ میلی‌مول VitE	۷۳/۳۸±۳/۱۳[a]	۷۱/۶۶±۳/۱۳[a]	۶۷/۷۲±۳/۱۳[a]	۴۰/۳۸±۳/۱۳[ABb]

حروف نامشابه(a،b و c) بین تیمارها در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵). حروف نامشابه (A، B و C) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی دار است (P<۰/۰۵).

1. Lipid peroxyl
2. Alkoxyl
3. Kinematic

سردسازی و انجماد تغییر فازهای لیپیدی غشا را در اسپرم تحریک می‌کنند و به تغییر پایداری و ساختار غشا می‌انجامد که با صدمه به اسپرم و کاهش توانایی باروری همراه است (Wilhelm *et al.* 1996). تولید بیش از اندازهٔ رادیکال‌های آزاد به پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم می‌انجامد (Sarlos *et al.* 2002). ازدست‌دادن یک‌پارچگی غشا باعث افزایش نفوذپذیری غشا و توانایی‌نداشتن در تنظیم غلظت‌های درون‌سلولی یون‌های درگیر در کنترل حرکات اسپرم می‌شود (Baumber *et al.* 2000). ویتامین E مهارکنندهٔ پراکسیداسیون لیپید در غشاهای بیولوژیکی و از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های اولیهٔ محلول در چربی است. نقش اصلی ویتامین E به‌عنوان آنتی‌اکسیدانی شاخه‌شکن، حذف رادیکال‌های پروکسیل لیپید (که پراکسیداسیون لیپید را افزایش می‌دهند) است (La Falci *et al.* 2011). مکانسیم مهم تأثیرات پایدارکنندگی و حفظ یک‌پارچگی الفاتوکوفرول در غشای سلول، به‌علت تشکیل کمپلکس مولکولی با مولکول‌هایی مانند اسیدهای چرب آزاد و لیزوفسفولیپید است که طی هیدرولیز لیپیدهای غشا آزاد شده‌اند. از این طریق ویتامین E ویژگی شوینده‌مانند این مولکول‌ها را خنثی و از اختلال در پایداری و یک‌پارچگی غشا جلوگیری می‌کند (Zaniboni & Cerolini 2009). در مطالعهٔ حاضر افزودن ویتامین E با غلظت ۵ میلی‌مول به رقیق‌کنندهٔ کنی، به‌طور معنی‌داری موجب حفظ یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم طی ۴۸ ساعت نگهداری به‌صورت سرد شد (P<۰/۰۵).

در مطالعه‌ای، افزودن ویتامین E به رقیق‌کننده یک‌پارچگی غشای پلاسمایی اسپرم خوک را طی سردسازی بهبود داده بود (Breininger *et al.* 2005). تحت شرایط القاشدهٔ آزمایشگاهی پراکسیداسیون در منی پرندگان، افزودن ویتامین E از آسیب به فسفاتیدیل سرین، فسفاتیدیل اتانول‌امین، و فسفولیپیدها باندشده به اسیدهای چرب غیر اشباع اسپرم جلوگیری کرد (Cerolini *et al.* 2000). انجماد اسپرم گاو با ویتامین E، تأثیر محافظتی این آنتی‌اکسیدان را بر یک‌پارچگی غشای پلاسمایی نشان داد (O'Flaherty *et al.* 1997).

زنده‌مانی

در زمان‌های گوناگون نگه‌داری، زنده‌مانی اسپرم کاهش یافته بود و در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ در مقایسه با زمان صفر ساعت، زنده‌مانی کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). به‌طور کلی در تیمار حاوی ۵ میلی‌مول ویتامین E، در مقایسه باسایر تیمارها، زنده‌مانی به‌طور معنی‌دار بیشتر بود. تفاوتی بین تیمارها طی ۲۴ ساعت نگهداری مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، در صورتی‌که در ۴۸ ساعت پس از سردسازی، زنده‌مانی در تیمار حاوی ۵ میلی‌مول ویتامین E در مقایسه با تیمار شاهد منفی (۶۵/۸۹±۳/۴۸ نسبت به ۵۴/۴۴±۳/۴۸) به‌طور معنی‌داری بیشتر است (P<۰/۰۵). نتایج آنالیز در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۴. درصد زنده‌مانی اسپرم اسبچهٔ خزر (حداقل میانگین مربعات±انحراف معیار میانگین) در تیمارهای گوناگون، طی سردسازی

تیمار	مدت زمان نگهداری (ساعت)			
	۰	۶	۲۴	۴۸
شاهد منفی	۸۲/۸۱±۳/۴۸^{a}	۷۹/۲۷±۳/۴۸^{a}	۶۹/۳۹±۳/۴۸^{b}	۵۴/۴۴±۳/۴۸^{Bc}
شاهد مثبت	۸۱/۱۲±۳/۴۸^{a}	۷۹/۱۷±۳/۴۸^{ab}	۷۰/۸۱±۳/۴۸^{bc}	۵۷/۱۲±۳/۴۸^{ABc}
۵ میلی‌مول VitE	۸۳/۰۸±۳/۴۸^{a}	۸۰/۸۳±۳/۴۸^{a}	۷۷/۵۱±۳/۴۸^{a}	۶۵/۸۹±۳/۴۸^{Ab}
۱۰ میلی‌مول VitE	۸۳/۶۶±۳/۴۸^{a}	۸۰/۵۸±۳/۴۸^{ab}	۷۲/۲۵±۳/۴۸^{b}	۵۷/۱۰±۳/۴۸^{ABc}

حروف نامشابه(a،b و c) بین تیمارها در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵). حروف نامشابه (A، B و C) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

یک‌پارچگی فیزیکی و عملکردی غشای پلاسمایی اسپرم برای زنده‌مانی اسپرم ضروری است و با باروری ارتباط دارد (Satorre *et al.* 2012). بهبود معنی‌دار زنده‌مانی در نمونه‌های حاوی ۵ میلی‌مولار ویتامین E را می‌توان با تأثیر حداقلی ROS بر غشاهای اسپرم، به‌علت توانایی آنتی‌اکسیدانی ویتامین E توضیح داد (P<۰/۰۵).

ویتامین E با مهار واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون، آسیب به غشای سلول را کاهش می‌دهد (Bansal & Bilaspuri 2009).

بنابراین با حفظ یک‌پارچگی غشای اسپرم، زنده‌مانی افزایش می‌یابد. نتایج حفظ زنده‌مانی با افزودن ویتامین E در انسان (Verma & Kanwar 1999)، بوفالو (Singh *et al.* 1989)، و خوک (Brzezi ska-lebodzi ska *et al.* 1995) نشان داده شده است.

ناهنجاری

در مطالعهٔ حاضر افزودن ویتامین E تأثیر معنی‌داری بر ناهنجاری کل اسپرم نداشت (P>۰/۰۵). نتایج آنالیز در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۵. درصد ناهنجاری کل اسپرم اسبچهٔ خزر (حداقل میانگین مربعات±انحراف معیار میانگین) در تیمارهای گوناگون، طی سردسازی

تیمار	مدت زمان نگهداری (ساعت)			
	۰	۶	۲۴	۴۸
شاهد منفی	۱۰/۱۰±۰/۹۲	۱۰/۲۲±۰/۹۲	۱۱/۰۴±۰/۹۲	۱۲/۲۸±۰/۹۲
شاهد مثبت	۹/۸۸±۰/۹۲	۱۰/۲۸±۰/۹۲	۱۱/۱۴±۰/۹۲	۱۲/۱۰±۰/۹۲
۵ میلی‌مول VitE	۹/۶۴±۰/۹۲	۹/۹۸±۰/۹۲	۱۱/۰۴±۰/۹۲	۱۱/۹۸±۰/۹۲
۱۰ میلی‌مول VitE	۹/۷۰±۰/۹۲	۱۰/۵۰±۰/۹۲	۱۱/۳۰±۰/۹۲	۱۲/۱۹±۰/۹۲

حروف نامشابه(a،b و c) بین تیمارها در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵). حروف نامشابه (A، B و C) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

میزان پراکسیداسیون لیپید (MDA)

با افزایش زمان نگهداری میزان پراکسیداسیون لیپید به‌طور شایان توجهی افزایش یافته بود (P<۰/۰۵). تفاوت معنی‌داری بین تیمارها تا ۲۴ ساعت نگهداری اسپرم مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، در صورتی‌که در زمان ۴۸، تیمار حاوی ۵ میلی‌مول ویتامین E در مقایسه با شاهد (۳/۱۴±۰/۳۷) نسبت به ۴/۴۲±۰/۳۷)، میزان پراکسیداسیون لیپید به‌طور معنی‌داری کمتر بود (P<۰/۰۵). نتایج آنالیز در جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول ۶. میزان پراکسیداسیون لیپید (MDA) در اسپرم اسبچهٔ خزر (نانومول بر میلی‌لیتر؛ حداقل میانگین مربعات±انحراف معیار میانگین) در تیمارهای گوناگون، طی سردسازی

تیمار	مدت زمان نگهداری (ساعت)			
	۰	۶	۲۴	۴۸
شاهد منفی	۰/۱۹±۰/۳۷^{d}	۱/۸۴±۰/۳۷^{c}	۳/۳۰±۰/۳۷^{b}	۴/۴۲±۰/۳۷^{Aa}
شاهد مثبت	۰/۱۹±۰/۳۷^{d}	۱/۸۸±۰/۳۷^{c}	۳/۰۵±۰/۳۷^{b}	۴/۳۳±۰/۳۷^{Aa}
۵ میلی‌مول VitE	۰/۲۱±۰/۳۷^{c}	۱/۸۶±۰/۳۷^{b}	۲/۷۷±۰/۳۷^{ab}	۳/۱۴±۰/۳۷^{Ba}
۱۰ میلی‌مول VitE	۰/۲۰±۰/۳۷^{c}	۱/۷۷±۰/۳۷^{b}	۳/۲۳±۰/۳۷^{a}	۴/۲۱±۰/۳۷^{ABa}

حروف نامشابه(a،b و c) بین تیمارها در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵). حروف نامشابه (A، B و C) بین تیمارها در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

اسپرم اسب به علت داشتن مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای پلاسمایی به تنش اکسیداتیو حساس‌اند (Vasconcelos Franco *et al.* 2013). دانشمندان معتقدند که ویتامین E نخستین ترکیب سیستم آنتی‌اکسیدانی اسپرم و از محافظت‌کننده‌های مهم غشا علیه ROS و پراکسیداسیون لیپید است (Bucak *et al.* 2008). در مطالعهٔ حاضر ویتامین E با غلظت ۵ میلی‌مول به‌طور معنی‌داری میان پراکسیداسیون لیپید را بعد از ۴۸ ساعت کاهش داده بود (P<۰/۰۵). ویتامین E با خاصیت چربی‌دوستی می‌تواند درون غشا جایگزین شود و با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود رادیکال‌های پروکسی لیپید[1] [$LOO^{\cdot}$] و آلکوکسیل[2] [$LO^{\cdot}$] ایجادشده را خنثی و از پراکسیداسیون لیپید جلوگیری کند (La Falci *et al.* 2011). افزودن ویتامین E، پراکسیداسیون لیپید را در اسپرم اسب کاهش می‌دهد (Ball & Anthony 2002) که مطابق با نتایج ما است. نتایج مشابهی در انسان نیز گزارش شده است (Agarwal *et al.* 2004).

1. Lipid peroxyl
2. Alkoxyl

نتیجه‌گیری کلی

نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که ویتامین E در سطح ۵ میلی‌مول می‌تواند پراکسیداسیون لیپید را کاهش دهد و کیفیت اسپرم اسبچهٔ خزر را بعد از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد بهبود بخشد.

سپاسگزاری

این مطالعه با همکاری مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور انجام شد، بدین‌وسیله از آن‌ها قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Agarwal, A., Nallella, K.P., Allamaneni, S.S. & Said, T.M. (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reproductive Biomedicine Online 8, 616-627.
2. Agueero, A., Miragaya, M., Mora, N., Chaves, M., Neil, D. & Beconi, M. (1995). Effect of Vitamin E Addition in Equine Sperm Preservation. *Comunicaciones Biologicas*, 13, 343-356.
3. Almeida, J. & Ball, B.A. (2005). Effect of α-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 87, 321-337.
4. Amann, R. & Graham, J. (1993). Spermatozoal function. Equine Reproduction. Philadelphia: *Lea and Febiger,* p, 715-745.
5. Ball, B., Medina, V., Gravance, C. & Baumber, J. (2001a). Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. *Theriogenology,* 56, 577-589.
6. Ball, B.A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science,* 107, 257-267.
7. Ball, B.A. & Anthony, V. (2002). Detection of Lipid Peroxidation in Equine Spermatozoa Based Upon the Lipophilic Fluorescent Dye C11- BODIPY581/591. *Journal of Andrology*, 23, 259-269.
8. Ball, B.A., Vo, A.T. & Baumber, J. (2001b). Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. A*merican Journal of Veterinary Research,* 62, 508-515.
9. Bansal, A.K. & Bilaspuri, G.S. (2009). Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress. *Animal Science Papers and Reports*, 27, 5-14.
10. Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V. & Davies- morel, M.C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*, 21, 895-902.
11. Baumber, J., Ball, B.A. & Linfor, J.J. (2005). Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research,* 66, 772-779.
12. Breininger, E., Beorlegui, N.B., O'Flaherty, C.M. & Beconi, M.T. (2005) Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 63, 2126-2135.
13. Brzezi ska- lebodzi ska, E., lebodzi ski, A., Pietras, B. & Wieczorek, G. (1995). Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological Trace Element Research*, 47, 69-74.
14. Bucak, M.N., Ate ahin, A. & Yüce, A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Ruminant Research*, 75, 128-134.
15. Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P. & Noble, R. (2000). Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 58, 99-111.
16. Chow, C.K. (1991). Vitamin E and oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine 11, 215-232.
17. Da Silva, F., Marques, A. & Chaveiro, A. (2010). Reactive oxygen species: a double-edged sword in reproduction. O*pen Veterinary Science Journal*, 4, 127-133.
18. da Silva Maia, M., Bicudo, S.D., Azevedo, H.C., Sicherle, C.C., de Sousa, D.B. & Rodello, L. (2009). Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Ruminant Research*, 85, 85-90.
19. Dad, S., Bisby, R.H., Clark, I.P. & Parker, A.W. (2006). Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. F*ree Radical Research,* 40, 333-338.
20. Dardari, S. & Mehraban, J. (2001). Caspian horse. *Anthropology Research Publications*, (In Farsi).
21. La Falci, V.S.N., Yrjö-Koskinen, A.E., Fazeli, A., Holt, W. & Watson, P. (2011). Antioxidant combinations are no more beneficial than individual components in combating ram sperm oxidative stress during storage at 5° C. *Animal Reproduction Science*, 129, 180-187.
22. Lamirande, E. & Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 13, 368-378.
23. Macías García, B., González Fernández, L., Ortega Ferrusola, C., Salazar Sandoval, C., Morillo

Rodríguez, A., Rodríguez Martinez, H., Tapia, J., Morcuende, D. & Peña, F. (2011). Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 141-148.

24. Maxwell, W. & Stojanov, T. (1996). Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. Reproduction, Fertility and Development 8, 1013-1020.
25. O'Flaherty, C., Beconi, M. & Beorlegui, N. (1997) Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen□thawed bull spermatozoa. *Andrologia*, 29, 269-275.
26. Salmani, H., Nabi, M.M., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, M.B., Mohammadi-Sangcheshmeh ,A., Shakeri, M., Towhidi, A., Shahneh, A.Z. & Zhandi, M. (2013). Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Research*.
27. Sarlos, P., Molnar, A. & Kokai, M. (2002). Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. A*cta Veterinaria Hungarica*, 50, 235-245.
28. Satorre, M., Breininger, E. & Beconi, M. (2012). Cryopreservation with α-tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm. *Theriogenology*, 78, 1548-1556.
29. Sharma, R.K. & Agarwal, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48, 835-850.
30. Singh, P., Chand, D. & Georgie, G. (1989). Effect of vitamin E on lipid peroxidation in buffalo Bubalus bubalis L. *Indian Journal of Experimental Biology*, 27, 14.
31. Vasconcelos Franco, J.S., Chaveiro, A., Góis, A. & Moreira da Silva, F. (2013). Effects of α-tocopherol and Ascorbic Acid on Equine Semen Quality after Cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*.
32. Verma, A. & Kanwar, K. (1999). Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian Journal Andrology*, 1, 151-154.
33. Wilhelm, K., Graham, J. & Squires, E. (1996). Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology*, 46, 559-578.
34. Zaniboni, L. & Cerolini, S. (2009). Liquid storage of turkey semen: Changes in quality parameters, lipid composition and susceptibility to induced in vitro peroxidation in control, n-3 fatty acids and alpha-tocopherol rich spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 112, 51-65.