مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۶۶، شماره ۲، ۱۶۴-۱۶۱

اثر سطوح مختلف ویتامین‌های E و C بر کیفیت اسپرم رقیق‌شده قوچ تالشی در ذخیره‌سازی در دمای ۵ درجه سانتیگراد

مجید شهبازی اردشیر محیط* مهرداد محمدی

۱) گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت ـ ایران.

(دریافت مقاله: ۱ شهریور ماه ۱۳۸۹ ، پذیرش نهایی: ۳ آذر ماه ۱۳۸۹)

چکیده

در طول دوره ذخیره‌سازی اسپرم، آسیب ناشی از اکسیداسیون مواد یکی از علل مهم کاهش قدرت و تحرک و باروری اسپرم می‌باشد. در این تحقیق سطوح متفاوتی از ویتامین‌های E و C به عنوان آنتی اکسیدان در اسپرم رقیق‌شده قوچ تالشی مورد استفاده قرارگرفت و اثر محافظتی آنها بر روی صفات کیفی اسپرم مورد مقایسه قرارگرفت. به همین منظور یک آزمایش فاکتوریل دوعاملی شامل سطوح مختلف ویتامین‌های E، C و شاهد، به‌عنوان عامل اول و زمان‌های صفر و ۷۲ ساعت بعد از ذخیره‌سازی به‌عنوان عامل دوم در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار مورد استفاده قرارگرفت. سطوح ویتامین E شامل E۲، E۴ و E۶ بود که در آنها به ترتیب ۴،۲ و ۶ میلی گرم ویتامین E در هر ۱۰ میلی لیتر اسپرم رقیق‌شده مورد استفاده قرارگرفت و سطوح ویتامین C شامل C۰/۳، C۰/۶، C۰/۹ بود که در آنها به ترتیب ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی گرم ویتامین C در هر میلی لیتر اسپرم رقیق‌شده بکار رفت. در زمان شروع ذخیره‌سازی، بین سطوح مختلف ویتامین‌های E، C و شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p>0/05$) بعد از ۷۲ ساعت از نظر درصد اسپرم‌های متحرک بین سطوح ویتامین E با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار شد ($p>0/05$). زنده‌مانی اسپرم‌ها در E۴ و E۶ از بقیه سطوح به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p<0/05$) و بین E۲ و E۴ اختلاف معنی‌داری نبود ($p>0/05$). سلامتی غشای اسپرم در E۶ و E۲ از سایر گروه‌ها به صورت معنی‌داری بالاتر بود ($p<0/05$). بر اساس نتیجه این تحقیق، استفاده از ویتامین E به میزان ۶ میلی گرم در ۱۰ میلی لیتر از رقیق‌کننده بر پایه تریس بهترین اثر در کیفیت اسپرم قوچ تالشی در دمای ۵ درجه سانتیگراد را داشت.

واژه‌های کلیدی: قوچ تالشی، کیفیت اسپرم، آنتی اکسیدان، ویتامین E و ویتامین C.

مقدمه

تلقیح مصنوعی با منی سرد (۵ درجه سانتیگراد) و یا منجمد (۱۹۶ درجه سانتیگراد) به یک روش معمول در اصلاح نژاد گوسفند تبدیل شده است (۲). بر اساس آزمایش‌های انجام شده اسپرم قوچ را می‌توان تا ۴۸ ساعت پس از رقیق سازی در دمای ۵ درجه سانتیگراد ذخیره‌سازی نمود بدون اینکه اثرات نا مطلوبی بر روی قدرت تحرک و کیفیت غشای آن ایجاد شود (۱۳). با این حال به دلیل پایین بودن میزان رقت مایع منی قوچ، در زمان‌های طولانی تر (۷۲ ساعت) نمی‌توان منی قوچ‌ها را به خوبی نگهداری کرد و نگهداری قدرت تحرک و باروری اسپرم در زمان‌های طولانی تر و در دمای ۵ درجه سانتیگراد اهمیت قابل ملاحظه‌ای در استفاده از مایع منی دارد (۲). مشخص شده است که استفاده از بعضی مواد با خصوصیت آنتی اکسیدانی مانند کاتالاز و تورولوکس باعث حفاظت از قدرت باروری اسپرم می‌شود (۵). در طول دوره ذخیره‌سازی آسیب در اثر اکسیداسیون مواد یکی از علل مهم کاهش قدرت تحرک و باروری اسپرم می‌باشد. به منظور نگهداری اسپرم برای مدت‌های طولانی تر، سردکردن و محافظت از آن به یک محلول محافظت‌کننده نیاز است (۲). حفظ کیفیت اسپرم قوچ بیشتر مبتنی بر تغییر و جایگزین نمودن رقیق کننده‌ها و همچنین اضافه کردن ترکیبات ویژه می‌باشد (۱۶،۱۹،۲۰). ویتامین C (اسید اسکوربیک) یک نقش محافظتی در مقابل یونهای آزاد را داشته و باعث نگهداری غشای سلول در مقابل اکسیده‌شدن می‌شود (۱۳). براساس آزمایش‌هایی که بر روی اسب انجام شد نشان دادند که اضافه نمودن اسیداسکوربیک به منی نریان، قدرت تحرک اسپرم در طی ۹۶ ساعت ذخیره‌سازی نسبت به گروه شاهد بهبودی نیافت (۴). عملکرد ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان درون سلولی بیشتر مربوط به جذب اکسیژن آزاد واکنشی و هیدروپروکسیدازهای چربی و تبدیل آن‌ها به اشکال غیرواکنشی می‌باشد (۱۸). در تحقیق دیگری که با مکمل نمودن ویتامین E در منی قوچ انجام گرفت نشان دادند که ویتامین E تاثیر نگهدارنده در میزان قدرت تحرک و سلامتی غشاء اسپرم در منی منجمد شده داشت (۸). هدف از این مطالعه، بررسی چگونگی حفظ کیفیت اسپرم در زمان ذخیره‌سازی از طریق مکمل نمودن ویتامین‌های E و C در سطوح مختلف به منی رقیق شده و همچنین مقایسه بین این سطوح بود.

مواد و روش کار

۸ انزال از ۴ قوچ نژاد تالشی با میانگین سن ۳/۵ سال گرفته شد. جمع‌آوری منی بوسیله واژن مصنوعی و با استفاده از یک میش فحل و آماده جفت‌گیری صورت گرفت. بلافاصله بعد از جمع‌آوری منی، آنرا به نسبت ۱:۱۰۰ (۰/۱ میلی لیتر منی + ۱۰ میلی لیتر رقیق‌کننده) با رقیق‌کننده بر

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۱۳۱-۶۶۹۰۲۷۴ نمابر: ۰۱۳۱-۶۶۹۰۲۷۴ Email: ar_mohit@guilanac.ir

پایه تریس (آمینومتیل) که محتوی ۳/۲۷ گرم تریس، ۵ گرم گلوکز، ۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲۰ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ و ۵ میلی‌لیتر کلسترول بود رقیق شد که هم اسپرم و هم رقیق‌کننده در دمای ۳۷ درجه با هم مخلوط شده و بعد در دمای ۵ درجه سانتیگراد ذخیره‌سازی شد. قبل از ذخیری‌سازی، اسپرم‌های رقیق‌شده ابتدا به ۴ قسمت، و هرقسمت به ۷ نمونه تقسیم شدند به‌نحوی که ۷ نمونه شامل ۳ سطح ویتامین E، ۲mg (۲ E)، ۴mg (۴ E)، ۶mg (۶ E)، در هر ۱۰ میلی لیتر اسپرم رقیق شده و (۳ سطح ویتامین C, (۰/۳ mg/ml C ۰/۳)، (۰/۶ C mg/ml۰/۶)، ۰/۹C mg/ml۰/۹) و گروه شاهد (بدون ویتامین) بود. پس از تقسیم‌بندی فوق در زمان‌های صفر (۰) و ۷۲ ساعت پس از ذخیره‌سازی صفات مربوط به اسپرم شامل اسپرم‌های متحرک، سلامتی غشای اسپرم و درصد بقای اسپرم‌های زنده مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (۱۰).

میزان اسپرم‌های متحرک با استفاده از روش کرایدر مبتنی بر تخمین درصد اسپرم‌های متحرک در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ تعیین شد، که برای این منظور یک قطره از محلول رقیق‌کننده روی اسلاید ۳۷ درجه قرار گرفت و اسپرم‌های متحرک شمارش شدند (۹،۱۰).

برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده از روش کرایدر استفاده شد که برای این منظور یک قطره منی با یک قطره محلول رنگ‌آمیزی ائوزین، نگروزین (۰/۶ گرم ائوزین Y، ۱۰ گرم نگروزین و ۰/۹ گرم کلرید سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) مخلوط شد و پس از ۳۰ ثانیه، یک قطره کوچک از مخلوط روی اسلاید گذاشته شد و از آن گسترش تهیه گردید، پس از خشک‌شدن، گسترش مورد ارزیابی قرار گرفت به‌طوری‌که اسپرماتوزواهایی که سفید بودند (بدون رنگ) به‌عنوان اسپرم‌های زنده و آن‌هایی‌که رنگ قرمز یا صورتی داشتند بعنوان اسپرم‌های مرده تعیین شدند. برای اطمینان بیشتر تعداد ۲۰۰ اسپرماتوزوا از ۴ ناحیه مختلف هر اسلاید شمارش گردید (۹،۱۰).

برای اندازه‌گیری اسپرم‌های با غشای سیتوپلاسمی سالم از روش کرایدر استفاده شد که برای این منظور یک قطره منی به ۸ قطره محلول هیپواسموتیک (۱۳/۵ گرم فروکتوز، ۷/۳۵ گرم تری سیترات سدیم، آب مقطر خالص برای رساندن حجم به یک لیتر، ائوزین Y ۰/۵ درصد) اضافه شد و بعد از قراردادن در گرم‌خانه (به‌مدت ۴۵ دقیقه در ۳۸ درجه سانتیگراد) یک قطره از مخلوط روی اسلاید گذاشته شد و روی آن لامل قرار گرفت و گسترش تهیه شده از نظر آماس دم مورد ارزیابی قرار گرفت. اسپرم‌های با دم آماسی به عنوان اسپرم با غشای سیتوپلاسمی سالم و اسپرم‌های با دم‌های غیرآماسی به عنوان اسپرم با غشای آسیب‌دیده در نظر گرفته شد (۱۰).

این آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل ۷×۲ در یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام گرفت. جهت تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار SAS با استفاده از رویه ANOVA و جهت مقایسه میانگین‌ها از روش توکی استفاده گردید.

نتیجه

بین رقیق‌کننده‌ها با مقادیر متفاوت ویتامینهای E و C (آنتی اکسیدان) و همچنین گروه شاهد، در زمان شروع ذخیره‌سازی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). ۷۲ ساعت بعد از ذخیره‌سازی، از نظر قدرت تحرک اسپرم بین سطوح ویتامین E با سایر تیمارها شامل سطوح ویتامین C و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($p>0/05$). ولی از این نظر بین سطوح ویتامین C و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). (جدول ۱).

۷۲ ساعت بعد از ذخیره‌سازی، در قدرت زنده‌مانی اسپرمها نسبت به زمان شروع ذخیره‌سازی کاهش معنی‌داری مشاهده شد ($p>0/05$). قدرت زنده‌مانی اسپرم در E۴ و E۶ به طور معنی‌داری از بقیه سطوح و شاهد بالاتر بود ($p>0/05$) ولی بین E۲ و E۴ از این نظر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). از نظر قدرت زنده مانی اسپرم بین سطوح ویتامین C با یکدیگر و با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). (جدول ۱).

۷۲ ساعت بعد از ذخیره‌سازی، غشای سیتوپلاسمی سالم در همه گروه‌ها نسبت به ساعت شروع ذخیره سازی به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p>0/05$). در ۷۲ ساعت بعد از ذخیره سازی، اسپرم‌های دارای غشای سیتوپلاسمی سالم در رقیق کننده‌های حاوی ویتامین E به طور معنی‌داری از بقیه تیمارها بالا تر بود ($p>0/05$) اما بین سطوح مختلف ویتامین C با یکدیگر و همینطور با شاهد از این نظر اختلاف معنی‌دار نبود ($p>0/05$). (جدول ۱).

بحث

ویتامین C (اسید اسکوربیک) دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بوده و در مایع اپیدیدیم و پلاسمای منی چند گونه حیوانی و از جمله قوچ وجود دارد و یک نقش محافظتی در برابر رادیکال‌های آزاد داشته و باعث نگهداری غشای اسپرماتوزوئید در مقابل اکسیدشدن می‌شود (۱۳). تنش‌های ناشی از اکسیداسیون سبب آسیب به اسپرماتوزوئیدها شده و باروری را کاهش می‌دهند (۶،۱۷). در تحقیق حاضر، اضافه نمودن مقادیر مختلف ویتامین C به اسپرم رقیق شده تاثیری روی صفات کیفی اسپرم نداشته است و بین سطوح مختلف ویتامین C و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است نتایجی مشابه توسط Ball و همکاران در سال ۲۰۰۱ در اسب مشاهده شد آنها با اضافه نمودن ویتامین C به مایع منی اسب و در طی ۹۶ ساعت ذخیره سازی، تاثر معنی‌داری روی قدرت تحرک اسپرم مشاهده نکردند. Aurich و همکاران در سال ۱۹۹۷ نیز نتایج مشابهی در رابطه با عدم تاثیر ویتامین C بر روی کیفیت اسپرم اسب بدست آوردند. سانچز پارتید و همکاران با مکمل نمودن ویتامین C به مایع منی قوچ اثر مثبتی در کیفیت

جدول۱ـ نتایج مقایسه میانگین تیمارهای مختلف در زمان شروع و ۷۲ ساعت بعد از ذخیره‌سازی. *ستون‌ها با حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۵درصد می‌باشد.

صفت اندازه گیری شده	درصد تحرک اسپرم		درصد زنده مانی اسپرم		غشای سیتوپلاسمی سالم	
ساعت / تیمار	۰	۷۲	۰	۷۲	۰	۷۲
$E_{۶}$	۸۵a	۴۴/۸۷a	۹۱/۵a	۵۱/۵a	۸۴/۷۵a	۴۷/۱۲a*
$E_{۴}$	۸۴/۵a	۴۳/۵ab	۸۹/۵a	۴۹/۵ab	۸۳/۵a	۴۵/۳۷ab
$E_{۲}$	۸۵/۵a	۴۴/۱۲۵a	۸۸/۵a	۴۸/۷۵b	۸۴/۷۵a	۴۵/۶۲a
$C_{۰/۹}$	۸۴/۲۵a	۴۲/۱۲۵b	۸۸/۲۵a	۴۴/۱۲c	۸۶/۷۵a	۴۳/۳۷bc
$C_{۰/۶}$	۸۴a	۴۲/۰۰b	۸۹/۷۵a	۴۴/۸۷c	۸۴a	۴۲/۰۰c
$C_{۰/۳}$	۸۴/۵a	۴۲/۲۵b	۸۸/۷۵a	۴۴/۳۷c	۸۴a	۴۲/۰۰c
شاهد	۸۴a	۴۲/۰۰b	۸۷/۵a	۴۳/۷۵c	۸۴a	۴۲/۰۰c
SEM	۶/۰۷a	۲/۰۳	۷/۰۸	۵/۰۸	۴/۰۸	۴/۰۳

اسپرم مشاهده نکردند و حتی نتیجه گرفتند که مقادیر بیش از ۵۰ میکرومولار اسید اسکوربیک در مایع منی باعث کاهش خصوصیات کیفی اسپرم در مقایسه با گروه شاهد می‌شود و در تحقیق دیگری که توسط خردمند و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد آنها با اضافه نمودن ویتامین C به منی قوچ و در ذخیره سازی ۵ درجه سانتیگراد، تاثیر معنی داری بر کیفیت اسپرم مشاهده نکردند. با توجه به نتایج این آزمایش و مطالب فوق می توان نتیجه گرفت که ویتامین C اگر چه آنتی اکسیدانی محلول در آب است با این حال مکمل نمودن آن در مایع منی نمی تواند اثر محافظتی بر اسپرم داشته باشد شاید یکی از دلایل این امر خاصیت اسیدی این ویتامین و کاهش ph مایع منی بعد از مکمل نمودن آن باشد (۱۳). عملکرد ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان درون سلولی بیشتر مربوط به جذب اکسیژن آزاد واکنشی و هیدروپروکسیدازهای چربی و تبدیل آن‌ها به اشکال غیرواکنشی می‌باشد (۱۸). بنابراین فسفولیپیدهای غشاء را در برابر آسیب‌های ناشی از اکسیده‌شدن دوام می‌بخشد (۱۷). در این بررسی اضافه‌نمودن ویتامین E به منی ذخیره شده اثرات نگهدارنده ای را در کیفیت اسپرم داشت و سطوح ویتامین E روی کیفیت اسپرم دارای تاثیر معنی دار بود، که با نتایج بدست آمده توسط برخی از محققان قابل تطبیق است ولی با نتایج برخی دیگر مغایرت دارد. طبق پژوهش Ball و همکاران در سال ۲۰۰۱ ویتامین E به میزان معنی‌داری موجب تغییر قدرت تحرک در طول دوره ذخیره‌سازی اسپرم نریان در ۷۲ یا ۹۶ ساعت نشد. Aguero و همکاران در سال ۱۹۹۵ گزارش دادند که اضافه‌نمودن ویتامین E به منی اسب‌سانان میزان حفظ قدرت تحرک اسپرم را در طول ۲۴ ساعت ذخیره‌سازی در دمای سرد بهبود می‌بخشد، و در تحقیق دیگر که توسط Uperti و همکاران در سال ۱۹۹۷ انجام شد آنها نشان دادند که در قوچ‌ها اضافه‌نمودن ویتامین E به میزان حفظ قدرت تحرک اسپرم در منی ذخیره‌شده در ۱۵ درجه سانتیگراد آسیب زد. هم‌چنین در تحقیقی که توسط خردمند و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام گرفت، ویتامین E تاثیر نگهدارنده در میزان قدرت تحرک و سلامتی غشاء داشت. به نظر می‌رسد دلیل تفاوت احتمالی بین تحقیق حاضر و Uperti و همکاران در سال ۱۹۹۷ این است که در تحقیق یوپرتی و همکاران در سال ۱۹۹۷، ذخیره‌سازی منی در ۱۵ درجه سانتیگراد انجام شده که این امر باعث حفظ متابولیسم اسپرم به میزان بالا و در نتیجه کاهش کیفیت آن می‌گردد. از طرف دیگر در تحقیق انجام شده توسط Fernandezsantos و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی اسپرم رقیق شده گوزن مشخص شد که مکمل کردن آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند ویتامین E دارای اثرات مثبتی بر اسپرم هنگام انجماد و ذوب مجدد نبوده است بلکه مقادیر بیش از ۶/۴ میلی‌گرم در هر دسی لیتر باعث تاثیر منفی بر کیفیت اسپرم خواهد شد. آنها نتیجه گیری نمودند که مقادیر بیش از حد ویتامین E موجب تحریک اکسیداسیون نیز می‌شود. در تحقیق Maxwell و Stojanovo در سال ۱۹۹۶ آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، سیتوفورم و گلوتاتیون پراکسیداز (GP) با غلظت‌های گوناگون به رقیق‌کننده تریس و زرده تخم‌مرغ اضافه شدند و تاثیرات آن‌ها بر قدرت تحرک، میزان سلامت آکروزوم و باروری اسپرماتوزوای قوچ پس از رقیق‌شدن و ذخیره‌سازی مایع منی مورد ارزیابی قرار گرفت. همه آنتی‌اکسیدان‌ها قدرت تحرک و میزان سلامت آکروزوم اسپرماتوزوا را بهبود بخشیدند. اگرچه نرخ حاملگی به‌دست‌آمده در آزمایش تلقیح مصنوعی می تواند شاخص مطلوبی برای تعیین کیفیت منی باشد، اما ارزیابی قدرت تحرک اسپرم و میزان غشای سیتوپلاسمی سالم امکان برآوردهای مناسبتری از ظرفیت باروری را فراهم می‌نماید که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد.

با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش، و آنچه که از مقایسه این نتایج با کارهای انجام شده روی سایر دام‌ها بدست آمده می توان چنین نتیجه گرفت که هنگام ذخیره‌سازی در ۵ درجه سانتیگراد اضافه‌نمودن ویتامین E (به میزان ۶ میلی گرم در هر ۱۰ میلی لیتر) به منی قوچ در حفظ و نگهداری قدرت تحرک و غشای سیتوپلاسمی سالم و زنده‌مانی سلول اسپرم بیشترین اثر را داشته است.

References

1. Aguero, A., Miragaya, M.H., Mora, N.G., Chaves, M.G., Neild, D.M., Beconi, M.T. (1995) Effect of vitamin E addition on equine sperm preservation. Comm. Biol. 13: 343-356.
2. Arthur, G. H., Noakes, D.E., Pearson, H., Parkinson, T.J. (1996). Veterinary Reproduction and Obstetrics. (7th ad.). W. B. Saunders Co. London. UK.
3. Aurich, J.E., Schonherr, U., Hoppe, H., Aurich, C. (1997) Effects of antioxidants on and membrane integrity of chilled stored stallion semen. Theriogenology. 48: 185-192.
4. Ball, B.A., Medina, V., Gravance, C.G., Baumber, J. (2001) Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5ºC. Theriogenology. 56: 577-589.
5. daSilvaMaia, M., Bicudo, S. D., Azevedo, H. C., Sicherle, C. C., Bartoli-de-Sousa, D., Rodello, L. (2009) Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. Small Rum. Res. 85:85-90.
6. De Lamirande , E., Jiang, H., Zini ,A., Kodama, H., Gagnon C. (1997) Reactive oxygen species and sperm physiology .Review Reproduction. 2:48-54.
7. Fernandezsantos, M. R., Martinezpastor, F., Garciamacias, V., Esteso, M. C., Soler, A. J., Pas, P., Anel, L., Grade, J. J. (2007)Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (Cervus elaphus hispanicus)epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzimatic antioxidants .J. Androl. 28:294-305.
8. Kheradmand, A., Babaei, H., Abshenas, J. (2006) Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen. Iranian J. Vet. Res. 7:40-45.
9. Kreider, J.L., Tindall, W.C., Potter, G D. (1985) Inclusion of bovine serum albumin in semen extenders to enhance maintenance of stallion sperm viability.Theriogenology. 23:399-408.
10. Manual on Basic Semen analysis. (2002) NAFA and ESHRE-SIGA. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
11. Marti, J.I.., Marti, E., Cebrian-Perez, J.A., Muino-Blanco, T. (2003) Survival rate of antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. Theriogenology. 60: 1025-1037.
12. Maxwell, W.M., Stojanov, T. (1996) Liquid storage of ram semen in the absenc or presence of some antioxidants. Reprod. Fertil. Devt. 8: 1013-1020.
13. Mustafa, S., Esref, D. (2004) The effect of Ascorbic Acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol .Turk Journal. Vet. Anim. Sci. 28: 893-899.
14. Purdy , H.(2006)The post -thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5°C prior to cryopreservation. Anim. Rep. Sci. 93:114-123.
15. Sarlos, P., Molnar, A., Kokai, M., Gabor, G., Ratky, J. (2002) Evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. Acta. Vet. Hung. 50: 235-245.
16. Sanchez-Partida, L.G., Setchell, B.P., Maxwell, W.M. (1997) Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. Reprod. Fertil. Vet. 9: 689-696.
17. Sharma, R.K., Agarwal, A. (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology;48:835-50.
18. Smith, O. B., Akinbamijo, O. O. (2000) Micronutrients and reproduction in farm animals. Anim. Reprod. Sci. 60: 549-560.
19. Uperti, G.C., Jensen, K., Oliver, J.E., Duganzich, D.M., Munday, R., Smith, J.F. (1997) Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically defined diluent containing antioxidants. Anim. Reprod. Sci. 48: 269-278.
20. Watson, P.F., Anderson, W.J. (1983) Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. J. Reprod. Fertil. 69: 229-235.

J. Vet. Res. 66, 2:161-164, 2011

EFFECT OF DIFFERENT LEVELS OF VITAMINS E AND C ON QUALITY OF DILUTED SPERM OF TALESHI RAM DURING STORAGE AT 5°C

Mohit, A.*, Mohammadi, M., Shahbazi, M.

[1]*Department of Animal Science, College of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht- Iran.*

(Received 23 August 2010 , Accepted 24 November 2010)

Abstract:

During sperm storage, Oxidative damage is one of the major causes for the reduction of sperm motility and fertility. This experiment was conducted to compare the effects of different levels of vitamin E and C, as antioxidants on diluted sperm and their protective effects were compared on traits related to the quality of sperm. A two-variable factorial experiment in a completely randomized design(CRD) including seven levels of vitamins C, E and control group along with two levels of storage time was used in this study. The levels of vitamin E, were included E2 (2 mg), E4 (4 mg) and E6 (6 mg) per 10 ml diluted sperm and the levels of vitamin C, were included C0.3(0.3mg),C0.6 (0.6mg)and C0.9(0.9 mg)per 1ml diluted sperm. At initiation of storage there was no significant difference between levels of vitamins E , C and control group ($p>0.5$). After 72 hours of storage there was a significant difference between percentage of motile spermatozoa in different levels of vitamin E, with other treatments ($p<0.05$). The viability levels of E4 and E6 were significantly higher ($p<0.05$) however no significant difference was seen between viability of E2 and E4 ($p>0.05$). The levels of membrane integrity in E2 and E6 were higher significantly than other groups ($p<0.05$). According to the results of the present study, supplemented of vitamin E with 6 mg in 10 ml of the diluted sperm based on Tris has the best effect in the quality of sperm of Taleshi ram at 5°C.

Key words: Taleshi ram, Quality of sperm, Antioxidant, Vitamin E and Vitamin C.

***Corresponding author's email: ar_mohit@guilan.ac.i r, Tel: 0131-6690274, Fax: 0131-6690274**